

Aus dem Institut für Neurogenetik
der Universität zu Lübeck
Leiterin: Prof. Dr. med. Christine Klein

**Genetische und funktionelle Analyse
X-chromosomaler neurodegenerativer Erkrankungen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -

vorgelegt von
Thomas Georg Peter Michael Schmidt
aus Würzburg

Lübeck 2018

1. Berichterstatterin: Priv. Doz. Dr. Sc. (Universität Belgrad) Ana Westenberger

2. Berichterstatter/in: Priv. Doz. Dr. med. Kai Mortensen

Tag der mündlichen Prüfung: 25.02.2019

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 25.02.2019

-Promotionskommission der Sektion Medizin-

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	IV
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
1 EINLEITUNG	1
1.1 NEURODEGENERATION	2
1.2 X-CHROMOSOMALER ERBGANG	3
1.3 PROJEKT A: MOHR-TRANEBJAERG SYNDROM	6
1.4 PROJEKT B: BRUTON-SYNDROM UND PROGRESSIVE NEURODEGENERATION	8
1.5 PROJEKT C: BETA-PROPELLER-PROTEIN-ASSOZIIERTE NEURODEGENERATION	10
1.6 HYPOTHESEN UND ZIELE	12
1.6.1 <i>Projekt A:</i>	12
1.6.2 <i>Projekt B:</i>	12
1.6.3 <i>Projekt C:</i>	13
2 PATIENTEN, MATERIAL UND METHODEN	14
2.1 PATIENTEN	14
2.1.1 <i>Klinische Untersuchung der Patienten</i>	14
2.2 MATERIAL.....	15
2.2.1 <i>Geräte und Ausrüstung</i>	15
2.2.2 <i>Software</i>	16
2.2.3 <i>Chemikalien</i>	16
2.2.4 <i>Lösungen und Puffer</i>	18
2.2.5 <i>Kits und fertig-zum-Gebrauch Materialien</i>	19
2.2.6 <i>Oligonukleotide</i>	20
2.2.7 <i>Antikörper</i>	20
2.3 METHODEN.....	21
2.3.1 <i>Isolierung von Nucleinsäuren</i>	21
2.3.1.1 <i>DNA-Isolierung aus Fibroblasten-Zellkulturen</i>	21
2.3.1.2 <i>RNA-Isolierung aus Fibroblasten-Zellkulturen</i>	21

2.3.2	<i>Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</i>	21
2.3.2.1	Standard PCR	22
2.3.2.2	Sequenzierungsreaktion	23
2.3.2.3	cDNA-Synthese.....	24
2.3.2.4	Quantitative Echtzeit-PCR.....	26
2.3.3	<i>Gelelektrophorese</i>	27
2.3.3.1	Agarose-Gelelektrophorese.....	27
2.3.3.2	Kapillarelektrophorese und Sequenzierung	27
2.3.4	<i>Analyse der X-Chromosom-Inaktivierung</i>	28
2.3.5	<i>Zellkultur</i>	28
2.3.5.1	Fibroblastenkultur	28
2.3.5.2	Passagierung der Fibroblasten	28
2.3.5.3	Behandlung der Zellen mit Toxinen.....	29
2.3.5.4	Zellernte	29
2.3.6	<i>Messung der Proteinkonzentration</i>	29
2.3.7	<i>Mitochondriales Membranpotential</i>	29
2.3.8	<i>Mitochondriale Morphologie</i>	30
2.3.8.1	Immunzytochemie.....	30
2.3.8.2	Bildaufnahme der immunzytochemischen Färbungen	31
2.3.8.3	Bildverarbeitung und Bestimmung des Formfaktors	31
2.3.9	<i>Statistik</i>	31
3	ERGEBNISSE	32
3.1	PROJEKT A: BERICHT ÜBER ERSTEN FILIPINO MIT MOHR-TRANEBJAERG-SYNDROM.....	32
3.1.1	<i>Klinische Daten</i>	32
3.1.2	<i>Genetische Analyse</i>	34
3.2	PROJEKT B: XLA-PATIENT MIT HÖRMINDERUNG, DYSTONIE-PARKINSONISMUS UND PROGRESSIVER NEURODEGENERATION	35
3.2.1	<i>Klinische Daten</i>	35
3.2.2	<i>Genetische Analyse</i>	37
3.3	PROJEKT C: PATIENTIN MIT BETA-PROPELLER-ASSOZIIERTER NEURODEGENERATION	38
3.3.1	<i>Klinische Daten</i>	38
3.3.2	<i>Genetische Analyse</i>	39
3.3.2.1	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe	39

3.3.2.2	XCI-Messung.....	40
3.3.2.3	WDR45-Genexpression in Fibroblasten.....	41
3.3.3	<i>Funktionelle Untersuchung der Mitochondrien dermalen Fibroblasten.....</i>	<i>42</i>
3.3.3.1	Mitochondriale Morphologie.....	43
3.3.3.2	Mitochondriales Membranpotential.....	44
4	DISKUSSION.....	45
4.1	PROJEKT A: BERICHT ÜBER ERSTEN FILIPINO MIT MOHR-TRANEBJAERG SYNDROM.....	45
4.2	PROJEKT B: PATIENT MIT BRUTON-SYNDROM UND HÖRMINDERUNG, DYSTONIE-PARKINSONISMUS UND PROGRESSIVER NEURODEGENERATION.....	46
4.3	PROJEKT C: PATIENTIN MIT BETA-PROPELLER-ASSOZIIERTER NEURODEGENERATION.....	48
4.3.1	<i>Genetische Analyse: eine Mutation im WDR45-Gen sowie ein verschobenes XCI-Verhältnis zugunsten des mutierten WDR45-Allels sind ursächlich für die Erkrankung von Patientin III.....</i>	<i>48</i>
4.3.2	<i>Funktionelle Analyse: WDR45-mutierte dermale Fibroblasten zeigen eine mitochondriale Funktionsstörung.....</i>	<i>49</i>
4.4	SCHLUSSFOLGERUNGEN – BEURTEILUNG DER ANNAHMEN.....	51
4.4.1	<i>Projekt A.....</i>	<i>51</i>
4.4.2	<i>Projekt B.....</i>	<i>51</i>
4.4.3	<i>Projekt C.....</i>	<i>52</i>
4.5	AUSBlick.....	53
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	54
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	56
7	ANHANG.....	67
7.1	VERWENDETE PRIMER.....	67
8	POSTER UND PUBLIKATIONEN.....	71
9	DANKSAGUNG.....	72
10	EIDESSTATTLICHE ERKLÄRUNG.....	73

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
A	Adenin
Arg	Arginin
<i>atg</i>	<i>Autophagy-related Genes</i>
bp	Basenpaar(e)
BPAN	Beta-Propeller-assoziierte-Neurodegeneration
BSA	Bovines Serumalbumin
<i>BTk</i>	Bruton Tyrosinkinase
C	Cytosin
cDNA	<i>complementary DNA</i> (komplementäre DNA)
CT	Computertomographie
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
DDON	Deafness-Dystonia-Optic-Neuronopathie Syndrome (Taubheit-Dystonie-Optische Neuronopathie-Syndrom)
del	Deletion
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMEM	<i>Dulbecco 's Modified Eagles Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
FBS	Fetales Bovines Serum
FKS	fetales Kälberserum
G	Guanin
Gln	Glutamin
Glu	Glutamat
Gly	Glycin
h	Stunde
HAM-D	Hamilton-Skala
ins	Insertion
IVIG	Intravenöse Immunglobuline
JC-1	5,5',6,6'-Tetrachloro-1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Iodid
M	Stoffmengenkonzentration
Met	Methionin
min	Minute
MMST	Mini-Mental-Status-Test

MoCA	<i>Montreal Cognitive Assessment-Test</i>
mRNA	<i>messenger RNA</i>
MRT	Magnetresonanztomographie
MTS	Mohr-Tranebjaerg-Syndrom
NBIA	<i>Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation</i> (Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn)
OMIM	<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>
ORPHA	Orphanet-Datenbank
p	kurzer Arm eines Chromosoms
PBS	Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> (Polymerase-Kettenreaktion)
PFA	Paraformaldehyd
<i>PINK1</i>	<i>PTEN induced putative kinase</i>
q	langer Arm eines Chromosoms
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
RT-PCR	<i>real time polymerase chain reaction</i> (quantitative Echtzeit-Polymerase-Kettenreaktion)
SDS	Sodium Dodecylsulfat
SNP	<i>Single nucleotide polymorphism</i> (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SVA	<i>(short interspersed nuclear element, variable number of tandem repeats, and Alu composite)</i>
T	Thymin
<i>TAF1</i>	<i>TATA-Box Binding Protein Associated Factor 1</i>
<i>Taq.</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	TRIS-Borat-EDTA
<i>TIMM8A</i>	Translokase der inneren Mitochondrienmembran 8 Homolog A
TRIS	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	<i>Unit</i> (Maß für die katalytische Aktivität)
UniProt	<i>Universal Protein Database</i>
Vol.	Volumen
<i>WDR45</i>	WD Repeat Domain 45
<i>WIPI4</i>	<i>WD repeat protein interacting with phosphoinositides 4</i>
WT	Wildtyp
XCI	X-Chromosom-Inaktivierung
XDP	X-chromosomales Dystonie-Parkinson Syndrom
XLA	X-linked Agammaglobulinemia (Bruten Syndrom oder Agammaglobulinämie Typ Bruton)

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.1: <i>Beispiel eines X-chromosomal-dominanten Erbgangs.</i>	3
Abbildung 1.2: <i>Beispiel eines X-chromosomal-rezessiven Erbgangs.</i>	4
Abbildung 1.3: <i>Beispiel eines X-chromosomal-dominanten Erbgangs mit nicht zufälligem XCI-Verhältnis.</i>	5
Abbildung 3.1: <i>Stammbaum der Familie I.</i>	32
Abbildung 3.2: <i>Fotografisch dokumentierte Dystonie von Patient I.</i>	33
Abbildung 3.3: <i>Mutationsanalyse Familie I.</i>	34
Abbildung 3.4: <i>Stammbaum der Familie II.</i>	35
Abbildung 3.5: <i>T1- und T2-gewichtete MRT.</i>	36
Abbildung 3.6: <i>Mutationsanalyse auf cDNA-Ebene Familie II.</i>	37
Abbildung 3.7: <i>BPAN-typische Stereotypien.</i>	38
Abbildung 3.8: <i>MRT zeigt Eisenablagerung in den Basalganglien einer Patientin mit BPAN.</i>	39
Abbildung 3.9: <i>Mutationsanalyse der Patientin III.</i>	39
Abbildung 3.10: <i>Mutationsanalyse der Patientin III auf cDNA-Ebene.</i>	40
Abbildung 3.11: <i>Agarose-Gelelektrophorese für PCR mit allelspezifischen Primern.</i>	41
Abbildung 3.12: <i>Verringerte Genexpression von WDR45 bei Patientin III.</i>	42
Abbildung 3.13: <i>Erhöhter Anteil an fragmentierten Mitochondrien dermalen Fibroblastenzellen der Patientin III (WDR45).</i>	43
Abbildung 3.14: <i>Reduziertes Membranpotential dermalen Fibroblasten der Patientin III (WDR45).</i>	44
Abbildung 4.1: <i>Illustration des Locus Xq22.1 mit den benachbarten Genen TIMM8A und BTK</i>	47

Tabellenverzeichnis

Tabelle 1 Reaktionsansatz einer Standard-PCR	22
Tabelle 2 Schematischer Ablauf einer Standard-PCR.....	22
Tabelle 3 Reaktionsansatz der PCR für die Sequenzierung	24
Tabelle 4 PCR-Bedingungen für die Sequenzierungsreaktion	24
Tabelle 5 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese, Mix 1	25
Tabelle 6 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese, Mix 2.....	25
Tabelle 7 <i>Primer</i> der Restriktionsstelle im Androgenrezeptor-Gen für den XCI-Assay	67
Tabelle 8 <i>Primer</i> für <i>TIMM8A</i>	67
Tabelle 9 <i>Primer</i> für <i>BTK</i>	67
Tabelle 10 <i>Primer</i> für cDNA <i>BTK</i>	68
Tabelle 11 <i>Primer</i> für den XDP-spezifischen Haplotyp	69
Tabelle 12 <i>Primer</i> für Allelspezifische RT-PCR: <i>WDR45</i>	70

1 Einleitung

Gegenstand der vorliegenden Arbeit sind drei Projekte, die jeweils eine seltene X-chromosomal-vererbte neurodegenerative Erkrankung untersuchen.

Projekt A befasst sich mit den klinischen Aspekten und der genetischen Grundlage des Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (auch Taubheit-Dystonie-Optische Neuronopathie-Syndrom, Englisch: *Deafness-Dystonia-Optic Neuronopathy Syndrome* (DDON)).

Projekt B untersucht die klinischen Aspekte und genetische Grundlage einer sehr seltenen Symptom-Konstellation aus Bruton-Syndrom (auch: Agammaglobulinämie Typ Bruton, Englisch: *X-linked Agammaglobulinemia* (XLA)) mit Dystonie und Taubheit.

Projekt C beschäftigt sich mit den klinischen Aspekten, der genetischen Grundlage und mit der funktionalen Analyse pathologischer Veränderungen der Beta-Propeller-assoziierten Neurodegeneration (BPAN), welche zur Gruppe der NBIA (Englisch: *Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation*, Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn) gezählt wird.

Im Folgenden werden kurz die Begriffe Neurodegeneration (s. Abschnitt 1.1) und X-chromosomaler Erbgang (s. Abschnitt 1.2) erläutert, die für die drei Projekte jeweils von Relevanz sind.

In den Abschnitten 1.3, 1.4 und 1.5 werden anschließend jeweils die Krankheitsbilder mit Definition, typischer klinischer Manifestation, genetischer Grundlage und relevanter Pathologie vorgestellt.

In Abschnitt 1.6 werden schließlich die Hypothesen und Ziele der vorliegenden Arbeit formuliert.

1.1 Neurodegeneration

Der Begriff Neurodegeneration setzt sich aus dem Präfix „Neuro-“ (das Nervengewebe betreffend, i.e. Neuronen) und dem Nomen Degeneration (Verfall von Zellen, Geweben, Organen) zusammen. Neurodegeneration bezeichnet im wörtlichen Sinn also streng genommen jegliche primär die Neuronen beeinträchtigende Pathologie. Folglich stellen neurodegenerative Erkrankungen einen Zustand dar, der zu fortschreitender/progressiver Hirnschädigung führt.

Neurodegenerative Erkrankungen stellen eine große Gruppe (mehrere hundert) neurologischer Störungen dar mit einer sehr heterogenen klinischen Erscheinung und zugrunde liegenden Pathologie, wobei letztere jeweils eine spezifische Hirnregion und dort ein spezifisches funktionell-anatomisches System betrifft (Przedborski et al., 2003). Den größten Risikofaktor für neurodegenerative Erkrankungen stellt das Alter dar (Tanner, 1992; Przedborski et al., 2003), in der Regel treten sie dementsprechend im fortgeschrittenen Erwachsenenalter auf. Typische klinische Merkmale sind ein allmählicher, meist asymmetrischer Beginn, ein langsam progressiver klinischer Verlauf, das zum Teil familiär gehäufte Auftreten und die Progredienz mit zunehmendem Alter (Rohkamm, 2008).

Die Ursache der meisten neurodegenerativen Störungen ist unbekannt; jedoch geht man davon aus, dass wahrscheinliche pathologische Mechanismen die Akkumulation toxischer Proteine oder den Verlust der Mitochondrienfunktion beinhalten.

Lediglich ein sehr kleiner Anteil (weniger als 5 %) der neurodegenerativen Erkrankungen wird durch genetische Mutationen verursacht. In dieser Untergruppe tritt die Erkrankung meist vergleichsweise früher im Leben auf (zum Teil bereits im Kindesalter) und kann einen deutlich schwereren und progressiveren klinischen Verlauf nehmen.

1.2 X-chromosomaler Erbgang

Alle drei in der vorliegenden Arbeit untersuchten neurodegenerativen Erkrankungen werden durch genetische Mutationen verursacht und werden in allen drei Fällen X-chromosomal vererbt, weshalb an dieser Stelle der X-chromosomale Erbgang kurz dargestellt werden soll.

X-chromosomale Vererbung bedeutet, dass die krankheitsverursachende Mutation auf dem X-Chromosom lokalisiert ist. Bei X-chromosomal-**dominanter** Vererbung erkrankt jedes Individuum, welches Träger des betroffenen X-Chromosoms ist, egal ob heterozygot (ein gesundes und ein krankes X-Chromosom) oder homozygot (beide X-Chromosome tragen die krankheitsverursachende Mutation) bei der Frau oder hemizygot beim Mann (das eine X-Chromosom beim Mann, 46 XY, trägt die krankheitsverursachende Mutation). Bei heterozygot-betroffenen weiblichen Individuen verläuft die Erkrankung häufig milder und variabler als bei männlichen entsprechend hemizygot-betroffenen Individuen. X-chromosomal-dominante Erkrankungen kommen deutlich häufiger bei Frauen vor als bei Männern, was daran liegt, dass diese bei männlichem Chromosomensatz in den meisten Fällen bereits pränatal einen letalen Ausgang haben. Ein Beispiel einer Familie mit einer X-chromosomal-dominant vererbten Erkrankung zeigt der Stammbaum in Abbildung 1.1.

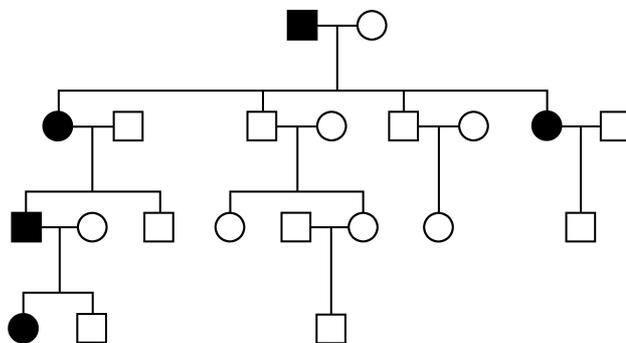


Abbildung 1.1: Beispiel eines X-chromosomal-dominanten Erbgangs.

Bei X-chromosomal-dominanter Vererbung sind sowohl männliche als auch weibliche Mitglieder einer Familie betroffen. Kinder einer betroffenen Frau erkranken zu 50 % unabhängig ihres Geschlechts. Ein betroffener Mann gibt das merkmalttragende X-Chromosom an all seine Töchter, nicht jedoch an seine Söhne. Kreise stehen für weibliche Familienmitglieder und Quadrate markieren männliche Mitglieder. Schwarze Symbole – betroffene Individuen; weiße Symbole – nicht betroffene Individuen.

Liegt ein X-chromosomal-**rezessives** Vererbungsmuster vor (Abbildung 1.2), erkrankt nur die homozygote Frau und der hemizygot Mann; heterozygote Frauen erkranken nicht, wenn das betroffene X-Chromosom nicht aktiviert ist.

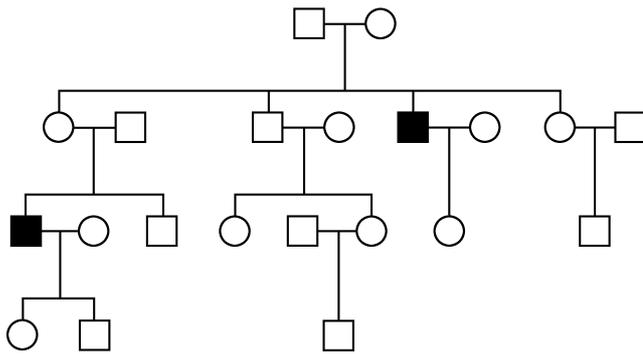


Abbildung 1.2: Beispiel eines X-chromosomal-rezessiven Erbgangs.

Betroffen sind vor allem männliche Individuen, deren Eltern meist keine Symptome zeigen (nicht betroffener/erkrankter Vater und das krankheitsverursachende Allel tragende, jedoch asymptotische Mutter). Eine Übertragung des krankheitsverursachenden Allels von Vater zu Sohn ist nicht möglich. Kreise stehen für weibliche Familienmitglieder und Quadrate markieren männliche Mitglieder. Schwarze Symbole – betroffene Individuen; weiße Symbole – nicht betroffene Individuen.

Um die Dosis der X-chromosomalen Gene zwischen den Geschlechtern auszugleichen, wird in jeder Zelle, in der zwei X-Chromosomen vorkommen, eines der beiden inaktiviert. Die X-Chromosom-Inaktivierung (XCI) ist normalerweise ein zufällig ablaufender Prozess. In der allgemeinen weiblichen Bevölkerung beträgt das XCI-Verhältnis also im Mittel 50 : 50 (Gauß'sche Normalverteilung), d. h. gleich viele Zellen exprimieren entweder das vom Vater oder das von der Mutter stammende X-Chromosom. Etwa 15 % der erwachsenen Frauen befinden sich an beiden Enden der Gauß'schen Glockenkurve und haben damit ein nicht zufälliges XCI-Verhältnis (≥ 80 : ≤ 20), neigen also dazu, das eine oder das andere X-Chromosom stärker zu exprimieren (Amos-Landgraf et al., 2006). So ist es möglich, dass etwa bei einer Verschiebung des XCI-Verhältnisses von 99 : 1 eine heterozygote Trägerin eines krankheitsverursachenden Allels bei X-chromosomal-dominantem Erbgang nicht erkrankt, wenn sich das betroffene Allel auf dem nur zu 1 % exprimiertem X-Chromosom befindet (s. Abbildung 1.3, Patientin markiert mit Stern). Gibt diese – zwar betroffene – aber nicht erkrankte Frau das „kranke“ X-Chromosom an ihre Tochter, kann diese im Falle von normalem, also zufälligem XCI-Verhältnis erkranken (s. Abbildung 1.3). Im umgekehrten Fall, wenn also die Mehrheit der Zellen einer heterozygot betroffenen Frau das mutierte Allel exprimieren, zeigt eine solche Patientin in der Regel einen ausgeprägteren Phänotyp einer X-chromosomal-dominanten Erkrankung.

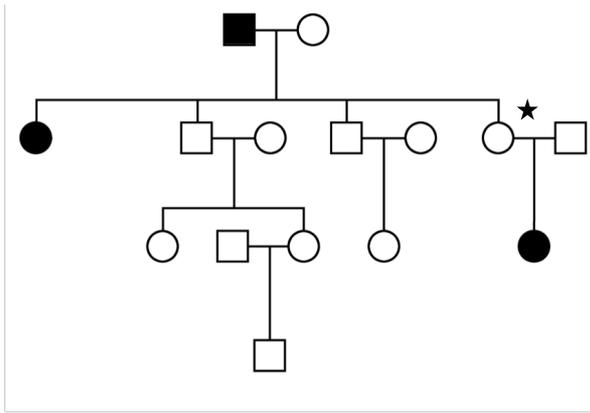


Abbildung 1.3: Beispiel eines X-chromosomal-dominanten Erbgangs mit nicht zufälligem XCI-Verhältnis.

Das mit Stern markierte Individuum ist eine obligate Trägerin des X-chromosomal-dominanten Allels jedoch nicht erkrankt durch ein nicht zufälliges, verschobenes XCI-Verhältnis. Kreise stehen für weibliche Familienmitglieder und Quadrate markieren männliche Mitglieder. Schwarze Symbole – betroffene Individuen; weiße Symbole – nicht betroffene Individuen

1.3 Projekt A: Mohr-Tranebjaerg Syndrom

Das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (MTS, ORPHA#52368), auch Taubheit-Dystonie-Optische Neuronopathie-Syndrom genannt (Englisch: *Deafness-Dystonia-Optic Neuronopathy Syndrome* (DDON); OMIM#304700), ist eine seltene X-chromosomal rezessiv-vererbte, progressive, neurodegenerative Erkrankung. MTS wurde 1960 das erste Mal von *Mohr und Mageroy* beschrieben und 1992 von *Tranebjaerg et al.* näher beschrieben (Mohr und Mageroy, 1960; Tranebjaerg et al., 1992). Es betrifft fast ausschließlich männliche Individuen, bei betroffenen Frauen können Symptome in milderer Form auftreten (Ha et al., 2012).

Die Prävalenz von MTS ist unbekannt (<1 : 1.000.000), bislang (Stand 2018) sind 98 Erkrankte aus insgesamt 40 Familien mehrerer Populationen bekannt (Tranebjaerg, persönliche Kommunikation).

Klinisch präsentiert sich die Erkrankung typischerweise mit bereits in der Kindheit auftretendem Hörverlust, sowie im Jugendalter hinzukommender Dystonie, Minderung des Sehvermögens ab dem frühen Erwachsenenalter und kognitiver Beeinträchtigung (Ha et al., 2012). Pathogenetisch lässt sich das MTS den Mitochondriopathien zuordnen.

Das einzige für die Krankheit pathognomonische Symptom ist der Hörverlust, welcher sensorisch-neural bedingt ist und ungefähr im Alter von 18 Monaten prä- oder postlingual auftritt (Tranebjaerg, 2003/2013). Die im Jugendalter meist dazukommende langsam progressive Dystonie tritt fokal oder generalisiert auf und wird als *Gegenhalten* beschrieben (diffuser Widerstand gegen Bewegung der Extremitäten). Bei neuronopathischem Befall (Nervenzellkörperuntergang) des optischen Systems, verläuft dieser für einige Jahre subklinisch (Ujike et al., 2001) und wird meist erst ab dem 20. Lebensjahr manifest in Form von Photophobie und reduzierter Sehschwäche, welche langsam progressiv bis hin zur völligen Erblindung meist im 30. Bis 40. Lebensjahr führt (Tranebjaerg et al., 2001). Neuropsychologische Symptome, wie Verhaltensauffälligkeiten und eine milde geistige Behinderung, können bereits im Kindesalter auftreten. Im weiteren Verlauf können paranoide Eigenschaften hinzukommen, ab dem 40. Lebensjahr entwickelt sich in vielen Fällen eine Demenz.

MTS wird durch Mutationen im *TIMM8A*-Gen verursacht (OMIM#300356; Tranebjaerg et al., 1995; Jin et al., 1996; Tranebjaerg et al., 2001; Roesch et al., 2004).

Das *TIMM8A*-Gen ist auf Xq22.1 lokalisiert und kodiert für die Translokase der inneren Mitochondrienmembran Homolog 8a (*TIMM8A*, auch Deafness/Dystonia Peptide 1 (DDP1)) (UniProt#O60220, Rothbauer et al., 2001).

Das Protein *TIMM8A* ist ein im mitochondrialen Membranzwischenraum lokalisiertes Chaperon, welches am Import und Einfügen von hydrophoben Transmembranproteinen aus dem Zytoplasma in die innere Mitochondrienmembran beteiligt ist (Köhler et al., 1999).

Pathogene Mutationen im *TIMM8A*-Gen führen zu einer mitochondrialen Funktionsstörung (Tranebjaerg, 2003/2013; Engl et al., 2012). Als pathogene Varianten wurden bislang sowohl kleine als auch große, teils das ganze Gen betreffende Deletionsmutationen, *nonsense*- und *missense*-Mutationen sowie Spleißvarianten beschrieben (Tranebjaerg, 2003/2013).

Bei mehreren vererbten Dystonie-Syndromen treten auch Parkinsonismus oder andere neurologische Defizite auf (Albanese et al., 2013). Von besonderer Relevanz in diesem Fall, da es sich bei der hier untersuchten Familie um eine philippinische handelt, ist das X-chromosomale Dystonie-Parkinson Syndrom (XDP, OMIM#314250), welches ausschließlich bei Individuen beschrieben wurde, welche von der philippinischen Insel Panay abstammen (Lee et al., 2011). Die Diagnose wird anhand der Symptomkombination aus Dystonie und Parkinsonismus und der genetischen Analyse auf einen spezifischen „XDP-Haplotypen“ gestellt (Domingo et al., 2015). Bei dem „XDP-Haplotyp“ handelt es sich um sieben ausschließlich bei XDP-Patienten beschriebene Mutationen, lokalisiert auf Xq13.1 in der Nähe des *TAFI*-Gens (Németh et al., 1999; Nolte et al., 2003; Makino et al., 2007).

1.4 Projekt B: Bruton-Syndrom und progressive Neurodegeneration

Das Bruton-Syndrom (auch Agammaglobulinämie Typ Bruton; Englisch: X-linked Agammaglobulinemia (XLA; OMIM#300755; ORPHA#47) ist eine seltene, X-chromosomal rezessive Erkrankung des humoralen Immunsystems, die fast ausschließlich bei Männern und mit einer geschätzten Prävalenz von 3 - 6 : 1.000.000 auftritt (Smith et al., 2001, updated 2016). 1952 wurde XLA von Bruton als erste genetische Immundefizienz beschrieben, bei der es durch gestörte B-Zellreifung zu einer ausgeprägten Hypogammaglobulinämie und schließlich zur Agammaglobulinämie kommt (Bruton, 1952).

Durch die Agammaglobulinämie sind die Betroffenen sehr anfällig gegenüber bakteriellen Infektionen. Neugeborene mit XLA sind meist aufgrund plazentagängiger mütterlicher Immunglobuline für die ersten Lebensmonate gesund, innerhalb der ersten zwei Lebensjahre treten jedoch vermehrt bakterielle Infektionen auf, sodass meist bis spätestens zum fünften Lebensjahr die Diagnose einer Immundefizienz gestellt wird (Smith et al., 2001/2016; Conley und Howard, 2002; Winkelstein et al., 2006)). Die häufigsten Infektionen hierbei sind Otitiden, Konjunktividen, Infekte der Atemwege, Diarrhoen und Hautinfektionen (Smith et al., 2001/2016). Gegenüber den meisten viralen Infektionen sind XLA-Patienten nicht vermehrt anfällig; eine Ausnahme stellen schwere, chronische Infektionen durch Enteroviren dar, die sich in der Regel als Dermatomyositis oder Meningoencephalitis manifestieren (Wilfert et al., 1977; Smith et al., 2001/2016; Bearden et al., 2016).

Dank früher Diagnosestellung und der Entwicklung von Gammaglobulinpräparaten, mit welchen durch intravenöse Gabe (IVIg, intravenöse Immunglobuline) eine normale IgG-Plasmakonzentration erreicht werden kann, hat sich die Prognose in den letzten Jahrzehnten derart verbessert, dass Betroffene ein nahezu normales Leben führen können (Smith et al., 2001/2016; Howard et al., 2006).

XLA wird durch Mutationen im *BTK*-Gen (OMIM#300300) verursacht (Vihinen et al., 1999; Šedivá et al., 2007; Velickovic et al., 2004; Tóth et al., 2009). Das *BTK*-Gen befindet sich ebenfalls auf Xq22.1 in direkter Nachbarschaft zum *TIMM8A*-Gen und kodiert für die „Bruton Tyrosinkinase“ (uniprot#Q06187), welche an der B-Zell-Differenzierung beteiligt ist (Yang et al., 1997).

Bei etwa 3 – 5 % der *BTK*-Mutationsträger liegt eine Deletion von der Größe vor, die sowohl das *BTK*-Gen als auch das benachbarte *TIMM8A*-Gen betrifft, was in diesen Fällen nicht nur zur Ausbildung des Krankheitsbildes XLA führt, sondern sich auch das in Abschnitt 1.3 beschriebene Taubheit-Dystonie-Optische Neuronopathie-Syndrom bei den Betroffenen manifestiert (Richter et al., 2001; Šedivá et al., 2007; Smith et al., 2001/2016; Shaker et al., 2016).

Darüberhinaus sind jedoch auch Fälle beschrieben von *BTK*-Mutationsträgern mit XLA und IVIG-Therapie, die ein neurodegeneratives Syndrom bislang ungeklärter Ursache entwickelten (Winkelstein et al., 2006; Papapetropoulos et al., 2007; Ziegner et al., 2002).

1.5 Projekt C: Beta-Propeller-Protein-assoziierte Neurodegeneration

Beta-Propeller-Protein-assoziierte Neurodegeneration (Englisch: *Beta-propeller Protein-associated Neurodegeneration* (BPAN); OMIM#300984), auch Statische Enzephalopathie im Kindesalter mit Neurodegeneration im Erwachsenenalter genannt, ist eine X-chromosomal vererbte Erkrankung (Haack et al., 2012). Sie wird einer Gruppe von Erkrankungen zugeordnet, die als „Neurodegeneration mit Eisenablagerung im Gehirn“ (Englisch: *Neurodegeneration with Brain-Iron Accumulation* (NBIA)) zusammengefasst wird.

NBIA ist eine heterogene Gruppe monogenetischer Erkrankungen, deren Gemeinsamkeit Eisenablagerungen in definierten Bereichen des Gehirns sind; in der Regel im Globus pallidus, abhängig vom Typ der NBIA ist zudem auch das Kleinhirn oder die Substantia nigra betroffen (Hayflick et al., 2013; Rouault, 2013).

Die Prävalenz der NBIA zusammengenommen wird auf 1 – 9 : 1.000.000 geschätzt (ORPHA#385), wobei der Anteil der BPAN (ORPHA#329284) auf 1 – 2 % geschätzt wird (Gregory und Hayflick, 2013/2014). Bislang (Stand 2017) wurden 45 Individuen mit BPAN beschrieben (Gregory et al., 2017).

Klinisch präsentiert sich BPAN typischerweise mit einer globalen Entwicklungsverzögerung in der Kindheit und einer weiteren Verschlechterung im frühen Erwachsenenalter mit progressiver Dystonie, Parkinsonismus und Demenz (Haack et al., 2012; Hayflick et al., 2013; Nishioka et al., 2015).

BPAN wird durch Mutationen im *WDR45*-Gen (OMIM#300526) verursacht (Haack et al., 2012).

Obwohl das *WDR45*-Gen auf dem Chromosom X-Chromosom lokalisiert ist (Xp11) und somit bei weiblichen Betroffenen Gegenstand von XCI ist, präsentiert sich BPAN klinisch eher untypisch für eine X-chromosomal vererbte Erkrankung (Gregory et al., 2017). Es sind deutlich mehr Frauen betroffen und es zeigt sich bei männlichen und weiblichen Betroffenen derselbe charakteristische Phänotyp, was bei Männern durch somatischen Genotyp-Mosaik (sämtliche Zellen stammen zwar von einer befruchteten Eizelle ab, weisen jedoch einen unterschiedlichen Genotyp auf) und bei Frauen durch ein *funktionelles Mosaik* aufgrund eines verschobenen XCI-Verhältnisses (s. Abschnitt 1.2) bedingt ist (Haack et al., 2012; Saitsu et al., 2013; Gregory et al., 2017).

Krankheitsverursachende Mutationen resultieren vorhergesagterweise in nicht funktionierenden Proteinen (Haack et al., 2012), weshalb angenommen wird, dass sie für männliche Mutationsträger, die keinen somatischen Genotyp-Mosaik aufweisen, letal verlaufen (Arber et al., 2016).

Pathogene Varianten wurden in allen codierenden Exons (3 bis 12) von *WDR45* beschrieben, wobei alle Kategorien von Mutationen vertreten waren („nonsense“- und „missense“-Punktmutationen, Insertions- und Deletions-Rastermutationen sowie Spleiß-Mutationen) (Gregory et al., 2017).

Das *WDR45*-Gen (WD Repeat Domain 45) kodiert für das WIPI4-Protein der WIPI-Familie (WIPI: *WD repeat protein interacting with phosphoinositides*; WD: Aminosäuren Tryptophan (W) und Aspartat (D)) (UniProt#Q9Y484; Saitsu et al., 2013).

Vom WIPI4-Protein, charakterisiert als ein „beta-Propeller-Gerüst“, wird angenommen, dass es eine Rolle in der Autophagie von Zellen spielt, da es mit Phospholipiden und Autophagie-regulierenden Proteinen interagiert (Lu et al., 2011). Saitsu et al. zeigten, dass in Lymphoblastenzellen bei Patienten mit *WDR45*-Mutation die Bildung des Autophagosoms ab einem frühen Zeitpunkt beeinträchtigt abläuft (Saitsu et al., 2013).

Trotz der naheliegenden Relevanz von Autophagie für die nicht-teilungsfähigen Neurone (Nixon et al., 2013), stellt *WDR45* - als eines von vier für die Bildung des Autophagosoms essentiellen *atg18*-Homologen (*atg*: autophagy-related genes) - die erste beschriebene direkte genetische Verbindung zwischen defekter Autophagie und Neurodegeneration dar (Armi et al., 2014; Arber et al., 2016).

Die vorübergehende Präsenz von Autophagie-beteiligten Proteinen auf der äußeren Mitochondrienmembran legt einen Zusammenhang zwischen *WDR45*, Autophagosomen und mitochondrialer Funktion nahe (Hailey et al., 2010).

Die Proteine aus der Gruppe der NBIA-Proteine sind zum Teil involviert in der mitochondrialen Funktion (z.B. die Panthoten-Kinase 2 (PANK2)) und zum Teil im Lipid-Metabolismus (z.B. die kalzium-unabhängige Gruppe VI Phospholipase A2 (PLA2G6)) (Arber et al., 2016).

1.6 Hypothesen und Ziele

1.6.1 Projekt A:

Prämisse: Das Mohr-Tranebjaerg-Syndrom ist eine seltene X-chromosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, die durch Mutationen im *TIMM8A*-Gen verursacht wird. Charakteristische Symptome sind vor allem Taubheit mit Beginn im Kindesalter und Dystonie mit Beginn im frühen Erwachsenenalter.

Hypothese: Unser, von den Philippinen stammender Patient I mit Taubheit seit dem 3. Lebensjahr und Dystonie seit dem 14. Lebensjahr sowie sein ebenfalls erkrankter Bruder sind hemizygot Träger einer krankheitsverursachenden Mutation im *TIMM8A*-Gen, welche bei ihrer Großmutter mütterlicherseits ebenfalls, jedoch heterozygot vorliegt.

Ziel: Untersuchung des *TIMM8A*-Gens mittels Sanger-Sequenzierung bei Patient I, seinem Bruder und ihrer Großmutter.

1.6.2 Projekt B:

Prämisse: Patienten mit Bruton-Syndrom, einem seltenen, X-chromosomal rezessiv vererbten Immundefizienz-Syndrom und verursacht durch Mutationen im *BTK*-Gen, können dank IVIG-Behandlung ein fast normales Leben führen. Mutationen im direkt benachbarten *TIMM8A*-Gen führen zum Mohr-Tranebjaerg-Syndrom.

Hypothese: Unser, ebenfalls von Philippinen stammender Patient II mit einer seit dem Kindesalter bestehenden IVIG-behandelten Immundefizienz, sowie Taubheit seit dem 2. Lebensjahr und Dystonie seit dem 19. Lebensjahr ist Träger je einer krankheitsverursachenden Mutation im *BTK*- und im *TIMM8A*-Gen oder einer großen, beide Gene betreffenden Deletions-Mutation.

Ziel: Untersuchung des *BTK*- und des *TIMM8A*-Gens mittels Sanger-Sequenzierung bei dem Patienten II und seiner Mutter.

1.6.3 Projekt C:

Prämisse: BPAN wird durch Mutationen im *WDR45*-Gen verursacht, welches eine Rolle bei der Autophagie spielt. Autophagie-beteiligte Proteine sind vorübergehend an die äußere Mitochondrienmembran gebunden. Patientin III mit BPAN ist Trägerin einer krankheitsverursachenden Mutation im *WDR45*-Gen (eine heterozygote Deletion von drei Basenpaaren in Intron 8 (c.519+1_519+3delGTG)).

Hypothese 1: Die besonders starke Ausprägung des klinischen Phänotyps beobachtet bei Patientin III ist begründet durch ein verschobenes XCI-Verhältnis hin zu einer präferentiellen Expression des mutierten Allels.

Hypothese 2: Dermale Fibroblasten unserer Patientin III mit BPAN-verursachender *WDR45*-Mutation zeigen eine gestörte mitochondriale Funktion.

Ziel: Untersuchung des XCI-Verhältnisses peripherer Blutzellen von Patientin III sowie Untersuchung der mitochondrialen Funktion dermalen Fibroblasten von Patientin III mittels Bestimmung des *Formfaktors* sowie Messung des mitochondrialen Membranpotentials.

2 Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

Für alle drei Projekte dieser Arbeit wurde DNA zur genetischen Analyse aus venösem Blut der Patienten gewonnen. Im Rahmen des Projektes C wurden Fibroblasten aus der Haut von Patientin III gewonnen.

Alle in dieser Arbeit untersuchten Individuen gaben nach Aufklärung ihr schriftliches Einverständnis. Die Untersuchungen wurden von den lokalen Ethikkommissionen genehmigt.

Die Daten und Blut des philippinischen Patienten mit Mohr-Tranebjaerg-Syndrom (Patient I, Projekt A) wurden freundlicherweise vom Institute for Neurosciences, St. Luke's Medical Center, Quezon City, Philippinen übersandt. Die Daten und Blut des philippinischen Patienten mit Bruton-Syndrom und Neurodegeneration (Patient II, Projekt B) wurden freundlicherweise vom Department of Neurosciences, University of the Philippines – Philippine General Hospital, Manila, Philippinen übersandt. Die Daten, Blut und Hautbiopsien für dermale Fibroblasten der Patientin III (mit BPAN), Projekt C wurden freundlicherweise vom Zentrum für seltene Erkrankungen, UKSH Lübeck übersandt.

2.1.1 Klinische Untersuchung der Patienten

Die Erhebung der Anamnese, die Diagnostik sowie die Stellung der jeweiligen Diagnose wurde bei allen Patienten jeweils durch Bewegungsstörungsspezialisten durchgeführt. Neben der körperlichen Untersuchung umfasste die Diagnostik EEG, Liquorpunktion, Hirnstammaudiometrie, Fundoskopie und bildgebende Verfahren wie CT und MRT. Zusätzliche Untersuchungen und Skalen beinhalteten die Hamilton-Skala (HAM-D, Ermittlung der Schwere einer Depression, Cut-off-Werte: 10, 20 und 30 von 66 sprechen für leichte, mittlere bzw. schwere Depression), den *Montreal Cognitive Assessment*-Test (MoCA, Ermittlung der Schwere der kognitiven Einschränkung, 18-26, 11-17 und weniger als 10 von 30 Punkten für leichte, mittlere bzw. schwere kognitive Einschränkung) und den Mini-Mental-Status-Test (MMST, ebenfalls zur Ermittlung kognitiver Defizite, weniger als 20 von 30 und weniger als 10 von 30 Punkten sprechen für leichtes/mittleres bzw. schweres kognitives Defizit).

2.2 Material

Die wichtigsten verwendeten Materialien der drei Projekte sind im Folgenden mit dem jeweiligen Herstellername aufgelistet. Alle hier nicht gelisteten Materialien stammen von den Herstellern Invitrogen, Merck, Sarstedt, Sigma-Aldrich oder Roth.

2.2.1 Geräte und Ausrüstung

Brutschrank	Heraeus
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 mit ApoTome	Zeiss
Gefrierschränke, -20°C, -80°C	Diverse Hersteller
<i>Light Cycler (LightCycler 480)</i>	Roche-Diagnostics
Multi-Well-Platte	Costar
Neubauer Zählkammer	Hecht
Novex Midi Gel System	Invitrogen
Reinstwasseranlage Direct Q	Millipore
Sequenziergeräte (<i>3130xl Genetic Analyzer 4-Capillaries</i> und <i>3500xl Genetic Analyzer 6-Capillaries</i>)	Applied Biosystems
<i>Thermocycler (Mastercycler)</i>	Eppendorf
Tischzentrifuge	Biosan
UV-Detektor	Biostep
Videokamera	Biometra
Zellkulturflaschen	Sarstedt
Zellkulturschrank	Heraeus
Zellzähler	Invitrogen

Zentrifugationsröhrchen (*Centricon YM-10 device filter*) Millipore

Zentrifugen Heraeus

2.2.2 Software

Axio Vision 4.4 Zeiss

Bildverarbeitungsprogramm TotalLab

BioDocAnalyze Biometra

Gen5 1.05.11 BioTek Instruments

ImageJ 1.42 NIH

Image Lab 4.0.1 BioRad

LightCycler 480 Software Roche Diagnostics

Sequencing Analysis 5.3.1 Applied Biosystems

4Peaks 1.7.2 Mek&Tosj

GeneMapper Software 5 Applied Biosystems

2.2.3 Chemikalien

2-Mercaptoethanol (C₂H₆OS) Sigma-Aldrich

5,5',6,6'-Tetrachloro- Molecular Probes

1,1',3,3'tetraethylbenzimidazolylcarbocyanin Iodid
(JC1)

Accutase PAA Laboratories

Acrylamid/Bisacrylamid BioRad

Agarose Biozym

Ammoniumchlorid (NH₄Cl) Sigma-Aldrich

Antioxidans NuPAGE	Invotrogen
Bafilomycin	Sigma-Aldrich
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenol Blau	Sigma-Aldrich
Chlorwasserstoff (HCl)	Merck
Cycloheximid (C ₁₅ H ₂₃ NO ₄)	Alomone Labs
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Qbiogene
Dimethyl Sulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich
Dithiothreitol (DTT)	Merck
<i>Dulbecco's Modified Eagles Medium</i> (DMEM)	PAA Laboratories
Ethanol (C ₂ H ₅ OH)	J.T. Baker
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Merck
<i>ExoSAP-IT</i>	USB
Fetales Bovines Serum (FBS)	PAA Laboratories
Fetales Kälberserum (FKS)	PAA Laboratories
Formamid (HCONH ₂)	Sigma-Aldrich
Leupeptin	Sigma-Aldrich
<i>LightCycler</i> -Sonden	Roche Diagnostics
Methanol (CH ₃ OH)	J.T. Baker
Midori Green	Nippon Genetics
Natriumacetat (C ₂ H ₃ NaO ₂)	Merck
Natriumazid (NaN ₃)	Sigma Aldrich
Nonident P40 (Nonylphenylpolyethylenglykol, NP-40)	USB

OptiMEM® Medium	Invitrogen
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Paraquat (Methylviologen; C ₁₂ H ₁₄ Cl ₂ N ₂)	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin (100x) (P/S)	PAA Laboratories
Phosphatgepufferte Salzlösung (PBS)	PAA Laboratories
Sodium Dodecylsulfat (SDS)	Fluka
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase und Puffer	Qbiogene
Terminator-Mix v3.1	Applied Biosystemes
Tris-Borat-EDTA Puffer (TBE; 10x)	Sigma-Aldrich
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) (C ₄ H ₁₁ NO ₃)	BDH
Triton X-100 (C ₁₄ H ₂₂ O(C ₂ H ₄ O) _n (n = 9-10)) (TX-100)	Sigma-Aldrich
Trockenmilch	Roth
TrypLE	Gibco
<i>Tween</i> -20 (Polyoxyethylen(20)-sorbitan-monolaurat)	BioRad
Valinomycin (C ₅₄ H ₉₀ N ₆ O ₁₈)	Sigma-Aldrich
Ziegen-Serum	Sigma Aldrich

2.2.4 Lösungen und Puffer

Zusammensetzung:

Block-Puffer	1x PBS; 4 % Ziegen-Serum; 0,1 % BSA; 0,1 % TX-100; 0,05 % NaN ₃
Kulturmedium:	500 ml DMEM; 10 % (50 ml) FKS; 1 %

	(5ml) P/S
PFA-Lösung (4 %ig):	40 g PFA (Paraformaldehyd); 960 ml PBS
Proteinextraktionspuffer (RIPA-Puffer):	50 mM TRIS-HCl pH 7,6; 150 mM NaCl; 1 % NaDOC (Natriumdeoxycholat); 1 % NP-40; 0,1 % SDS
<i>Quenching</i> -Puffer	100 mmol/l TRIS-HCl; 4 mmol/l EDTA; pH 7,75
TBST (TRIS- <i>Buffered-Saline and Tween</i> 20)-Puffer:	50 mM TRIS; 150 mM NaCl; 0,1 % <i>Tween 20</i> ; pH 7,6
TRIS-Borat-EDTA (TBE)-Puffer:	890 mM TRIS; 890 mM Borsäure; 20 mM EDTA
Zell-Suspensions-Puffer	150 mmol/l KCl; 25 mmol/l Tris-HCl pH 7,6; 2 mmol/l EDTA pH 7,4; 10 mmol/l KPO ₄ pH 7,4; 0,1 mmol/l MgCl ₂ ; 0,1 % BSA

2.2.5 Kits und fertig-zum-Gebrauch Materialien

<i>ATP Bioluminescence Assay Kit HS II</i>	Roche Diagnostics
<i>BCA Protein Assay Kit</i>	Pierce
<i>BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit</i>	Applied Biosystems
<i>Bio-Rad D_c Protein Assay Kit</i>	BioRad
<i>Genetic Analyzer Capillary Array, 50 cm</i>	Applied Biosystems
HpaII	New England Biolabs
<i>Light Cycler DNA Master SYBR Green I</i>	Roche Diagnostics
POP-7 Polymer	Applied Biosystems

<i>QIAamp DNA mini Kit</i>	Qiagen
<i>RNeasy Protect Mini Kit</i>	Qiagen
Sequenzierpuffer 5x	Applied Biosystems
<i>Super Signal West Pico Chemiluminescent Substrate</i>	Thermo Scientific
<i>Superscript First-Strand Synthesis</i>	Invitrogen
<i>Zenon Immunolabelling Kit</i>	Invitrogen

2.2.6 Oligonukleotide

DNA-Längenstandard (100bp)	Invitrogen
Oligonukleotide (<i>Primer</i>)	MWG Biotech

2.2.7 Antikörper

Anti-GRP75	(1:10 ⁶)	Abcam
------------	----------------------	-------

2.3 Methoden

2.3.1 Isolierung von Nucleinsäuren

Für alle Experimente dieser Doktorarbeit wurde DNA und RNA aus humanem Blut oder Fibroblasten-Zellkulturen gewonnen. DNA und RNA aus Blut waren für die jeweiligen Versuche bereits im Labor vorhanden und mussten nicht erneut extrahiert werden.

2.3.1.1 DNA-Isolierung aus Fibroblasten-Zellkulturen

Die DNA-Isolierung aus Fibroblasten-Zellkulturen wurde dem Protokoll des Herstellers entsprechend mit dem *QIAamp DNA Mini Kit* durchgeführt. Zelllysat wurde hierbei auf eine Minisäule mit kieselgelhaltiger Membran gegeben, welche spezifisch DNA bindet. Nach mehreren Waschschrinen, die der Entfernung von PCR-Inhibitoren (u.a. Proteine, divalente Kationen) dient, wurde die DNA schließlich in Wasser eluiert.

2.3.1.2 RNA-Isolierung aus Fibroblasten-Zellkulturen

Die RNA-Isolierung aus Fibroblasten-Zellkulturen wurde dem Protokoll des Herstellers entsprechend mit dem *RNeasy Protect Mini Kit* durchgeführt. Analog zur DNA Isolierung (vgl. Abschnitt 2.3.1.1) wurde Zelllysat hierbei auf eine spezifisch RNA-bindende Kieselgelmembran gegeben. Nach mehreren Waschschrinen wurde RNA in RNase-freiem Wasser eluiert.

2.3.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymrase-Kettenreaktion (Englisch: Polymerase Chain Reaction (PCR)) ist eine enzymatische Methode zur Amplifikation von DNA *in vitro* (Saiki et al., 1985). Zwei zu den Randbereichen dieser Sequenz komplementäre chemisch-synthetisierte Oligonukleotide (Englisch: *Primer*) sichern hierbei die Spezifität der Amplifikation. Bei 95°C wird die doppelsträngige DNA in ihre Einzelstränge denaturiert. Anschließend wird die Temperatur auf etwa 55 – 62°C gesenkt, was zur Anlagerung der *Primer* (Englisch: *Annealing*) führt. (Je mehr Basen und je größer der GC-Anteil des Primers, eine desto höhere Temperatur wird für das *Annealing* benötigt; umgekehrt, je weniger Basen und je größer der AT-Anteil, eine desto niedrigere Temperatur wird benötigt).

Eine thermostabile Polymerase synthetisiert in einem dritten Schritt bei 72°C die Sequenz zwischen den beiden *Primern*. Durch vielfache Wiederholung dieser drei Schritte Denaturierung, *Annealing*, Extension wird die DNA-Zielsequenz exponentiell amplifiziert, was ausreichend hohe DNA Konzentrationen für weitere Analysen ermöglicht.

2.3.2.1 Standard PCR

Tabelle 1 und **Tabelle 2** zeigen nachfolgend den Reaktionsansatz bzw. den Schematischen Ablauf einer Standard-PCR.

Tabelle 1 Reaktionsansatz einer Standard-PCR

Substanz	Konzentration	Volumen	Konzentration im Ansatz
dH ₂ O		ad 15 µl	
Puffer	10x	1,5 µl	1x
dNTPs	1 mM	3,0 µl	0,2 mM
<i>Vorwärts-Primer</i>	10 µM	0,6 µl	0,4 µM
<i>Rückwärts-Primer</i>	10 µM	0,6 µl	0,4 µM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	0,07 µl	0,023 U/µl
DNA	~10 ng/µl	5,0 µl	~3,33 µg/µl

Tabelle 2 Schematischer Ablauf einer Standard-PCR

95°C	5 min	Initiale Denaturierung	
95°C	30 s	Denaturierung	} 35x
58°C	30 s	<i>Annealing</i>	
72°C	30 s	Extension	
72°C	10 min	Terminale Extension	
4°C		Endtemperatur	

Die *Annealing*-Temperatur wurde jeweils an die Struktur der *Primer*-Sequenzen angepasst. Die Extensionszeit wurde an die erwartete Länge des Produkts angepasst. Ausgegangen wurde hierbei von einer Synthese-Geschwindigkeit von 1 bp/min der Polymerase.

Mittels PCR wurden die Exone 2 - 19 des *BTK*-Gens amplifiziert (Exon 1 von *BTK* ist nicht codierend), sowie die in cDNA umgewandelte mRNA-Sequenz der Exone 14-19 von *BTK*. Desweiteren wurden die beiden Exone des *TIMM8A*-Gens und die Bereiche der sieben XDP-krankheitsspezifischen Mutationen amplifiziert.

Die *Primer*-Sequenzen und die zugehörigen *Annealing*-Temperaturen sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (s. Abschnitt 7.1).

2.3.2.2 Sequenzierungsreaktion

Um das zu sequenzierende PCR-Produkt für die Kapillarelektrophorese und Sequenzierung vorzubereiten, wurden 5 µl des PCR-Produkts mit 2 µl *ExoSAP* aufgereinigt. Dieser Enzym-Mix (Exonuklease I, eine Phosphatase und Puffer) wurde hinzugefügt, um überschüssige *Primer* und dNTPs aus der Probe zu entfernen.

Inkubation: 15 min 37°C Aufreinigung

15 min 80°C Inaktivierung der Enzyme

Die in dieser Arbeit verwendete Sequenzier-Methode basiert auf dem Prinzip der Didesoxymethode (auch Kettenabbruchmethode) nach Sanger *et al.* (Sanger, 1977). Hierfür wird ein PCR-Ansatz erstellt, der sowohl Desoxynukleotide (dNTPs) als auch fluoreszenzmarkierte 2',3' Didesoxynukleotide (ddNTPs) enthält. Während der Nukleotidextensionsphase kommt es immer dann, wenn zufällig ein ddNTP eingebaut wird zum Kettenabbruch, sodass während der PCR DNA-Fragmente mit jeder möglichen Basenlänge entstehen. Jeweils die terminale Base ist fluoreszenzmarkiert wodurch nach einer Kapillargelelektrophorese bei der eigentlichen Sequenzierung die exakte Basenabfolge bestimmt werden kann (vgl. Abschnitt 2.3.3.2).

Für die Kettenabbruch-PCR-Sequenzierungsreaktion wurde das *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit* verwendet. **Tabelle 3** und **Tabelle 4** zeigen nachfolgend den Reaktionsansatz bzw. die PCR-Bedingungen für die Sequenzierungsreaktion.

Tabelle 3 Reaktionsansatz der PCR für die Sequenzierung

Substanz	Konzentration	Volumen	Konzentration im Ansatz
dH ₂ O		ad 10 µl	
Puffer	5x	1,50 µl	0,75x
Primer	10 µM	0,50 µl	0,5 µM
Terminator Mix 3.1	20x	1,00 µl	2x
ExoSAP-Produkt	~5-10 ng/µl	2,00 µl	0,5 – 1,0 ng/µl

Tabelle 4 PCR-Bedingungen für die Sequenzierungsreaktion

96°C	5 min	Initiale Denaturierung	
96°C	10 s	Denaturierung	} 25x
60°C	1 min	<i>Annealing</i> und Extension	
4°C		Endtemperatur	

Die *Annealing*-Temperatur wurde entsprechend der Primer-Struktur gewählt.

Um für die Elektrophorese reine DNA zu erhalten, wurde im Anschluss an die Sequenzierungsreaktion das Produkt einer Natriumacetat-Fällung unterzogen. Hierfür wurde 3M Natriumacetat und 100% Ethanol verwendet. Ein weiterer Wasch-Schritt mit 70% Ethanol folgte. Die ausgefällte DNA wurde über Nacht bei 4°C in hochgradig deionisiertem Formamid (HiDi Formamid) gelöst. Anschließend wurden die DNA-Fragmente mittels Kapillarelektrophorese der Länge nach aufgetrennt und sequenziert (vgl. Abschnitt 2.3.3.2).

2.3.2.3 cDNA-Synthese

Um RNA aus Blut von Patient II und seiner Mutter sowie aus Fibroblasten-Zellkulturen von Patientin III zu sequenzieren (vgl. Abschnitt 2.3.3.2) und mittels Echtzeit-PCR zu analysieren (vgl. Abschnitt 2.3.2.4), wurde RNA revers in cDNA transkribiert. Hierfür wurde das *Superscript First-Strand Synthesis*-Kit nach Angaben des Herstellers verwendet. Oligo-Desoxythymidin (dT)-Primer banden hierbei an den Poly-A-Schwanz der mRNA und ermöglichten so die reverse Transkription.

Tabelle 5 und **Tabelle 6** zeigen nachfolgend die Reaktionsansätze für die cDNA-Synthese.

Tabelle 5 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese, Mix 1

Substanz	Konzentration	Volumen	Konzentration im Ansatz
dH ₂ O		ad 10 µl	
RNA	5 µg/µl	1 µl	0,5 µg/µl
dNTP-Mix	10 mM	1 µl	1 mM
Oligo- <i>Primer</i> (dT)	50 µM	1 µl	5 µM

Die Ansätze wurden denaturiert (5 min bei 65 °C) und für 1 min auf Eis gelagert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe des zweiten cDNA-Synthese Mixes.

Tabelle 6 Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese, Mix 2

Substanz	Konzentration	Volumen	Konzentration im Ansatz
dH ₂ O		ad 10 µl	
DTT	0,1 M	2 µl	0,02 M
MgCl ₂	25 mM	4 µl	10 mM
RT-Puffer	10x	2 µl	2x

Zu jedem Ansatz des ersten Mixes wurden 10 µl des zweiten Mixes hinzugegeben. Nach Mischen und Zentrifugation fand eine Inkubation für zwei Minuten bei 42 °C statt. Anschließend wurde die reverse Transkription durch Zugabe 1 µl reverser Transkriptase (*SUPERSCRIPT II RT*) zu jedem Ansatz gestartet: 50 min bei 42 °C // 15 min bei 70 °C.

Abschließend wurden die gewonnenen cDNA-*Templates* durch Zugabe von 1 µl RNase H für 20 Minuten bei 37 °C degradiert.

Die *Primer*-Sequenzen und die zugehörigen *Annealing*-Temperaturen sind im Anhang tabellarisch aufgelistet (s. Abschnitt 7.1).

2.3.2.4 *Quantitative Echtzeit-PCR*

Die quantitative PCR (qPCR) ermöglicht die Echtzeit-Beobachtung der DNA-Amplifikation und damit die Messung von DNA-Konzentrationen.

In dieser Arbeit wurde die qPCR angewendet, um die mRNA-Expression von Wildtyp und mutiertem *WDR45* in Fibroblastenkulturen der BPAN-Patientin zu messen.

Da mRNA sehr temperatursensibel ist und deshalb nicht direkt sequenziert werden kann, wurde aus Fibroblasten extrahierte RNA (vgl. Abschnitt 2.3.1.2) in cDNA umgeschrieben (vgl. Abschnitt 2.3.2.3), welche dann für die Echtzeit-PCR verwendet wurde.

Die Amplifikationen wurden in jeweils separaten Reaktionsansätzen je zwei Mal im LightCycler ausgeführt. Ein *SYBR-Green* basiertes *Kit* wurde gemäß den Angaben des Herstellers zur Durchführung der Echtzeit-PCR verwendet.

Der Fluoreszenzfarbstoff *SYBR-Green* bindet spezifisch an Doppelstrang-DNA, wobei die Fluoreszenz durch die Bindung steigt, was durch eine Messung im Fluorescein-Kanal die Beobachtung der PCR-Kinetik ermöglicht. Trägt man die Fluoreszenzaktivität auf der Ordinate gegen die PCR-Zyklusanzahl auf der Abszisse auf, erhält man die Kinetik in Form einer sigmoiden Kurve. Während der logarithmisch-linearen Phase kann die Amplifikation wie folgt beschrieben werden:

$$N=N_0(1+E_{\text{const}})^n$$

N - Anzahl der amplifizierten Moleküle

N_0 - Initiale Molekülanzahl

E - Amplifikationseffizienz

n - Anzahl der Zyklen

Da die Amplifikationseffizienz während der logarithmisch-linearen Phase konstant ist, kann anhand der oben genannten Formel und mithilfe einer Standard-Kurve die initiale DNA-Konzentration errechnet werden. Die Standard-Kurve wurde durch DNA-Standards bekannter Konzentration generiert. Ein Reaktionsansatz (15 μ l) enthielt 3 μ l Enzym/Puffer (*iTaq SYBR-Green Supermix*), 0,5 – 1,0 μ M der jeweiligen Vorwärts/Rückwärts-*Primer* und 15 ng cDNA.

Die Konzentration sowohl des mutierten- als auch des Wildtyp-codierten *WDR45*-Gens wurde relativ zu der Konzentration des Referenz-Gens *β -Actin* berechnet. Die Sequenzen der verwendeten *Primer* sind im Anhang aufgelistet (s. Abschnitt 7.1).

2.3.3 Gelelektrophorese

2.3.3.1 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Agarose-Gelelektrophorese lässt sich die Reinheit und Basenpaarlänge eines PCR-Produkts beurteilen. Agarose-Pulver wurde zu 1x TBE Puffer in erforderlichem Verhältnis gemischt und in einer Mikrowelle aufgeheizt bis es komplett gelöst war. Um die DNA nach der Elektrophorese unter UV-Licht sichtbar zu machen, wurde nach wenigen Minuten des Herunterkühlens Midori Green hinzugefügt (Konzentration 0,05 µg/ml). Nachdem die Lösung auf ungefähr 60°C heruntergekühlt war, wurde sie in eine vorbereitete Kammer mit ein oder zwei Kämme gegossen. Nach Aushärten des Gels bei Raumtemperatur wurden die Proben, versetzt mit 1/3 Vol. Bromphenolblau und ein Molekulargewichtsstandard (1000 bp-Leiter), in die Ladetaschen pipettiert. Die Elektrophorese wurde bei 120 V für ca. 20 – 40 min in 1x TBE-Puffer durchgeführt. Anschließend wurde unter UV-Licht Exposition die Reinheit und die erwartete Größe des PCR-Produkts beurteilt und jegliche Amplifikation in einer negativen Kontroll-Probe ausgeschlossen.

2.3.3.2 Kapillarelektrophorese und Sequenzierung

Bei der Kapillarelektrophorese werden die Produkte der Sequenzierungsreaktion (vgl. Abschnitt 2.3.2.2) elektrokinetisch in mit Polymer gefüllte Kapillaren injiziert. Durch Anlegung einer hohen elektrischen Spannung werden die negativ geladenen DNA Fragmente durch das Polymer in den Kapillaren Richtung positiver Elektrode bewegt. Kurz vor Erreichen der positiven Elektrode werden die Fluoreszenz-markierten DNA Fragmente, aufgetrennt nach ihrer Größe bis auf ein Basenpaar genau, durch einen Laserstrahl bewegt. Die dadurch emittierten Signale der Fluoreszenz-Farbstoffe werden von einem optischen System detektiert. Durch die Nukleotid-Spezifität der Fluoreszenz-Farbstoffe können alle vier DNA Basen gleichzeitig detektiert werden.

Zur Sequenzierung der DNA Fragmente wurden in dieser Arbeit der *Genetic Analyzer 3130xl* und der *Genetic Analyzer 3500xl* jeweils von Applied Biosystems verwendet. Für die Auftrennung wurde jeweils das POP-7-Polymer benutzt.

2.3.4 Analyse der X-Chromosom-Inaktivierung

Das Ausmaß der Verschiebung des XCI-Verhältnisses wird durch einen *Assay* (Allen et al., 1992) bestimmt, der auf der Benutzung des Hpa II-Restriktionsenzym beruht, welchem es unmöglich ist, methylierte DNA zu schneiden (inaktives X-Chromosom). Die Hpa II Restriktions-Stelle befindet sich im Exon 1 des Androgen-Rezeptor-Gens in der Nähe eines polymorphen *CAG-repeats*, durch welchen zwischen väterlichem und mütterlichem Allel unterschieden werden kann. Die Restriktions-Stelle des inaktivierten X-Chromosoms ist methyliert und die des aktivierten X-Chromosoms unmethyliert.

Vor und nach Verdau durch das HpaII-Enzym wurde die Region, welche die Hpa II-Restriktions-Stelle und das *CAG-repeat* beinhaltet mittels PCR amplifiziert. Nach dem Verdau durch HpaII kann nur das methylierte, nicht geschnittene, Allel des beschriebenen Androgen-Rezeptors Lokus' amplifiziert werden, welches das inaktivierte X-Chromosom repräsentiert. Anschließend wurden die Amplikone auf dem *Genetic Analyzer 3130xl* von Applied Biosystems genotypisiert. Für jede Probe wurde mindestens zweimal eine densitometrische Analyse mithilfe der GeneMapper 5 Software durchgeführt. Um die bevorzugte Amplifizierung des kürzeren Allels rechnerisch auszugleichen, wurde das Volumen des HpaII-verdauten kürzeren Allels durch das Verhältnis der Volumina der nichtverdauten Allele (kürzer/länger) geteilt.

2.3.5 Zellkultur

2.3.5.1 Fibroblastenkultur

Die Fibroblasten wurden in einem Brutschrank bei 37°C (95 % Luft, 5 % CO₂) in geeigneten Zellkulturflaschen kultiviert. Nährmedium war *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM), versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FKS) und 1 % Penicillin/Streptomycin, welches regelmäßig abgesaugt und erneuert wurde.

2.3.5.2 Passagierung der Fibroblasten

Bei einer Konfluenz von 80 % wurden die Fibroblasten passagiert. Das Kulturmedium wurde abgesaugt und die Zellen mit phosphatgepuffertes Salzlösung (PBS) gewaschen und anschließend zur Ablösung adhärenter Zellen mit *Accutase* bedeckt für 10 Minuten bei 37°C inkubiert. Die *Accutase* wurde durch Suspension der Fibroblasten in frischem Medium (*Accutase* : Medium - 1 : 5) inaktiviert. Nach Pelletierung durch Zentrifugation

bei 1000 rpm für 5 Minuten wurden die Zellen erneut in frischem Medium suspendiert und nach Bedarf ausplattiert oder für anschließende Versuche vorbereitet.

2.3.5.3 *Behandlung der Zellen mit Toxinen*

Um die Auswirkung von oxidativem Stress auf die mitochondriale Morphologie zu untersuchen, wurden Fibroblasten mit dem Hyperoxid produzierenden Paraquat behandelt (2 mM für 18 Stunden).

2.3.5.4 *Zellernte*

Um die Fibroblasten für weitere Experimente vorzubereiten, wurden sie wie in Abschnitt 2.3.5.2 erläutert durch *Accutase* gelöst, in Medium suspendiert und durch Zentrifugation bei 8000 rpm und 4°C für 5 Minuten pelletiert.

2.3.6 **Messung der Proteinkonzentration**

Die Proteinkonzentration wurde nach der Bicinchoninsäuremethode (BCA-Reaktion) mittels *BCA Protein Assay Kit*, gemäß der Herstellerangaben bestimmt. Bei der Wellenlänge von 562 nm wurde die Absorption von einem Plattenlesegerät gemessen. Die Proteinkonzentration der einzelnen Proben wurde anhand zuvor kalibrierter BCA-Standardkurve (0 – 1500 µg/ml) errechnet.

2.3.7 **Mitochondriales Membranpotential**

Zur Analyse des mitochondrialen Membranpotentials ($\Delta\Psi_m$) wurde das fluoreszenzensitive 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolcarbocyanin Iodid (JC-1) verwendet. Bei diesem lipophilen Kation ändert sich reversibel die Wellenlänge des von ihm emittiertem Lichts von 530 nm zu 590 nm, wenn sich das $\Delta\Psi_m$ erhöht. Pro *Well* einer 12-*Well*-Platte wurden ca. $3,5 \times 10^4$ Zellen ausplattiert. Ein *Well* pro Probe wurde für 15 Minuten bei 37 °C mit 1 µg/ml JC-1 in *OptiMEM* Medium behandelt. Um die basale Fluoreszenzemission zu ermitteln, wurde ein zusätzliches *Well* pro Probe mit dem Ionophor Valinomycin in Gegenwart von JC-1 behandelt. Pro Probe blieb ein *Well* unbehandelt und enthielt nur Medium, was als Leerwert diente. Die Fluoreszenz wurde bei 590 nm mit einem Plattenlesegerät detektiert. Im Anschluss wurden die Zellen durch

Zugabe von 200 μ l NaOH 100 mM je *Well* und Inkubation der Platte bei 4 °C über Nacht lysiert. Am nächsten Tag wurde die Proteinkonzentration jedes *Wells* bestimmt (vgl. Abschnitt 2.3.6). Das $\Delta\Psi_m$ wurde relativ zur Proteinkonzentration angegeben und wie folgt berechnet:

$$\Delta\Psi_m = \frac{FL_{\text{Probe}}/[\text{Protein}]_{\text{Probe}} - FL_{\text{Leerwert}}/[\text{Protein}]_{\text{Leerwert}}}{FL_{\text{Valinomycin}}/[\text{Protein}]_{\text{Valinomycin}} - FL_{\text{Leerwert}}/[\text{Protein}]_{\text{Leerwert}}}$$

FL_x – Fluoreszenzemission

$[x]$ – Proteinkonzentration

2.3.8 Mitochondriale Morphologie

Zur Beurteilung der Verzweigung des mitochondrialen Netzwerks bei Fibroblastenzellen unter basalen und unter Stressbedingungen wurden die Mitochondrien immunzytochemisch angefärbt.

2.3.8.1 Immunzytochemie

Fibroblasten wurden geerntet (vgl. Abschnitt 2.3.5.4) und ca 20.000 Zellen in 400 ml Kulturmedium auf Deckgläschen (5,3 cm²) ausplattiert. Für 18 Stunden wurden die Zellen nun unter basalen und Stressbedingungen (Paraquat, s. Abschnitt 2.3.5.3) im Brutschrank inkubiert. Die Inkubation beendend, wurde das reine Medium bzw. Medium mit Paraquat abgesaugt und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen auf den Deckgläschen fixiert. Dies geschah durch 15-minütige Inkubation mit 4 % PFA bei Raumtemperatur. Nach dreimaligem Waschen mit PBS wurden die Zellen für 60 Minuten bei Raumtemperatur in Block-Puffer inkubiert. Das *Ziegen-Block-Serum* im Block-Puffer dient der Verhinderung unspezifischer Bindung durch den ersten Antikörper. TX-100 lysiert die Membran und ermöglicht so das Eindringen des ersten Antikörpers in die Zellen. Nach erneutem Waschen mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem primären Antikörper Ratte-Anti-GRP75 bei 4 °C über Nacht. Am nächsten Tag erfolgte nach dreimaligem Waschen mit PBS die Inkubation mit dem sekundären Antikörper *Zenon immunolabelling Komplex-Ziege-Anti-Ratte 488* von Zenon für 60 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit PBS wurden die

Deckgläschen abschließend auf 8 μ l *Mounting Medium* mit DAPI H-1500 auf einem Objektträger platziert und über Nacht bei Raumtemperatur im Dunkeln getrocknet.

2.3.8.2 *Bilddaufnahme der immunzytochemischen Färbungen*

Die Fluoreszenz des *Zenon immunolabelling Komplex* am GRP75-Ak (Mitochondrien) und des DAPI H-1500 (Zellkerne) wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop Axiovert 40 von Zeiss detektiert. Fibroblastenzellen wurden zufällig für die Bilddaufnahme ausgewählt. Mit dem ApoTome-Modul und der Software AxioVision wurden fünf Schichten der jeweiligen Zelle als Bild aufgenommen. Dieser Bilder-Stapel und ein Summations-Bild der Zellschichten wurden für weitere Analysen gespeichert. Mindestens zehn Zellen jeder Probe wurden auf diese Weise abfotografiert und gespeichert.

2.3.8.3 *Bildverarbeitung und Bestimmung des Formfaktors*

Die Analyse der Bilddaten erfolgte mit dem Bildverarbeitungsprogramm Image J 1.42. Zuerst wurde der Schichtaufnahmen-Stapel zu einem Bild verrechnet. Nach Festlegung eines Schwellenwertes wurde dieses Bild in ein binäres Bild umgewandelt, welches nun als Grundlage zur Bemessung der Charakteristika der mitochondrialen Morphologie (Fläche und Umfang der Mitochondrien) diente. Um den Grad der Verzeigung des mitochondrialen Netzwerks zu bestimmen, wurde der *Formfaktor* für jede analysierte Zelle bestimmt. Der *Formfaktor* ist definiert als $P_m^2/4\pi A_m$ (P_m = Länge des mitochondrialen Umfangs; A_m = Fläche des mitochondrialen Netzwerks) (Mortiboys *et al.* 2008). Der *Formfaktor* erlaubt die Quantifizierung des Vernetzungsgrads des mitochondrialen Netzwerks.

2.3.9 **Statistik**

Unterschiede wurden statistisch mithilfe des ungepaarten t-Tests oder der einfaktoriellen Varianzanalyse (ANOVA, engl: analysis of variance) mit Bonferroni Post-hoc-Test analysiert. Die Fehlerbalken geben den Standardfehler an bei $n \geq 3$ unabhängigen Experimenten (* $p < 0,05$).

3 Ergebnisse

Die Ergebnisse der drei Projekte werden jeweils in der Reihenfolge „Klinische Daten“, „Genetische Analyse“ und - im Falle des dritten Projektes - „Funktionelle Analyse“ dargestellt.

Die Ergebnisse der drei Unterkapitel „Klinische Daten“ (Abschnitt 3.1.1, 3.2.2 und 3.3.1) wurden jeweils von Bewegungstörungsspezialisten erhoben (s. auch Abschnitt 2.1.1) und sind keine Eigenleistung des Verfassers der vorliegenden Arbeit; zudem sind auch die Ergebnisse aus dem Unterkapitel „Vorarbeiten der Arbeitsgruppe“ (Abschnitt 3.3.2.1) keine Eigenleistung des Verfassers. Diese werden hier vor allem der Übersichtlichkeit, Vollständigkeit und Verständlichkeit halber mitaufgeführt. Alle anderen im Folgenden aufgeführten Ergebnisse wurden vom Verfasser erhoben.

3.1 Projekt A: Bericht über ersten Filipino mit Mohr-Tranebjaerg-Syndrom

3.1.1 Klinische Daten

Patient I (V.2 in Abbildung 3.1) war zum Zeitpunkt der Untersuchung 21 Jahre alt.

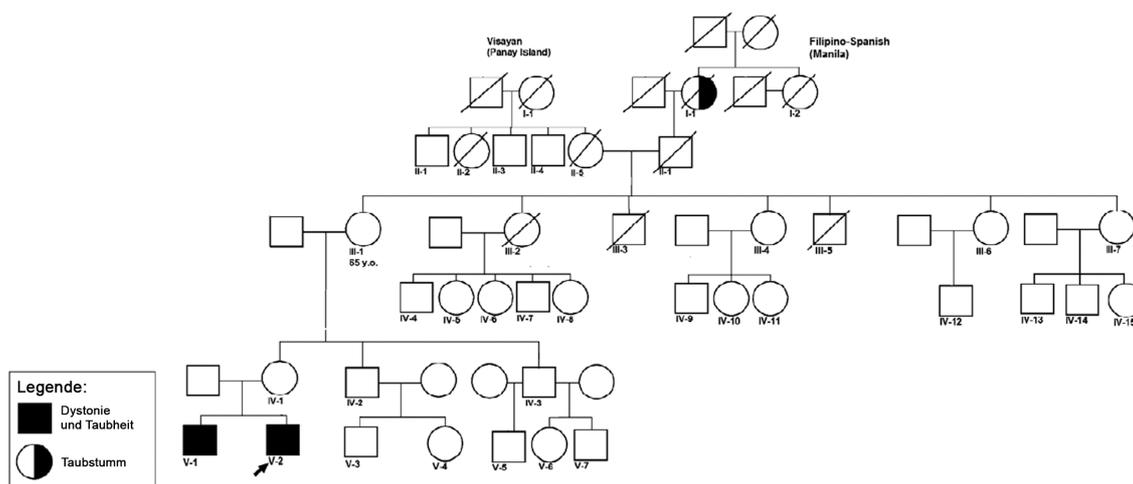


Abbildung 3.1: Stammbaum der Familie I.

Adaptiert von Penamora-Destriza et al., 2015.

Kreise stehen für weibliche Familienmitglieder und Quadrate markieren männliche Mitglieder. Die römischen Ziffern I-V geben die Generation an. Der Pfeil verweist auf den Index-Patienten (Patient I). (Sequenziert: beide Brüder, V-1 und V-2 (jeweils hemizygot) und die Großmutter mütterlicherseits, III-1 (Wildtyp)).

Patient I fiel im Alter von drei Jahren durch Hörminderung und verzögerte Sprachentwicklung auf. Nach otologischer Untersuchung im Alter von neun Jahren wurden ihm Hörgeräte verschrieben. Mit 14 Jahren traten erstmals Dystonie-Symptome auf, zuerst in Form von erschwertem Schreiben mit der rechten Hand, kurz darauf kamen unwillkürliche Nacken/Kopfbewegungen hinzu. Trotz dieser Einschränkungen konnte er sich sportlich betätigen und die Schule beenden.

Im Alter von 18 Jahren entwickelte Patient I eine oromandibuläre Dystonie. Aufgrund seiner Herkunft (Panay-Insel) und einer zunehmend generalisierenden Dystonie, wurde XDP als die wahrscheinlichste Diagnose angenommen. Die neurologische Untersuchung ergab gute kognitive Fähigkeiten, eine unauffällige Funduskopie beidseits und eine Schallempfindungsstörung beidseits. Außerdem wurde eine oromandibuläre Dystonie, eine Nackensteifigkeit mit Torticollis spasmodicus und eine Dystonie der Schulter begleitet von choreatiformen Armbewegungen beobachtet (s. Abbildung 3.2).



Abbildung 3.2: Fotografisch dokumentierte Dystonie von Patient I.

Die neurologische Untersuchung ergab bei Patient I eine ausgeprägte oromandibuläre Dystonie, einen Torticollis spasmodicus, sowie Schulterdystonie mit choreatiformen Arm/Handbewegungen.

Darüberhinaus wurde bei dem Patienten mit einem HAM-D-Wert von 9 eine leichte Depression festgestellt. Mit 11 von 30 Punkten im MoCA-Test und 22 von 30 Punkten im MMSE wurde eine leichte kognitive Einschränkung festgestellt.

Therapiert wurde Patient I mit Clonazepam und Biperiden. Zur Erleichterung der Nahrungsaufnahme und um die Nackenhypertonie zu reduzieren, wurde ihm in einem Intervall von drei bis vier Monaten eine oromandibuläre und zervikale Botulinumtoxin-A-Injektion verabreicht.

Der ältere Bruder von Patient I (V.1 in Abbildung 3.1) war ebenfalls seit seiner Kindheit schwerhörig und entwickelte im Alter von 16 Jahren eine Dystonie. Mit 18 Jahren war er taubstumm und hatte eine ausgeprägte Dystonie, vor allem zervikal und in beiden Händen.

Die Großmutter mütterlicherseits von Patient I stammt von der Insel Panay. Ihre Verwandten mütterlicherseits waren weder schwerhörig, noch hatten sie Dystonie (s. Abbildung 3.1).

3.1.2 Genetische Analyse

Bei der Analyse auf den XDP-Haplotyp wiesen Patient I, sein Bruder und ihre Großmutter (V.2, V.1 und III.1 in Abbildung 3.1) jeweils keine der sieben krankheitsspezifischen Mutationen auf. Die Sequenzierung des codierenden Bereichs von *TIMM8A* erbrachte eine Wildtyp-Sequenz der Großmutter und bei beiden Brüdern ein A>G Basenaustausch im ersten Nukleotid von Exon 1 (c.1A>G; p.Met1?, Referenzsequenz: NM_004085, s. Abbildung 3.3). In über 87.500 Allelen der Datenbank von *Exome Aggregation Consortium* (ExAC (<http://exac.broadinstitute.org>)) ist die in Abbildung 3.3 gezeigte Mutation nicht präsent.

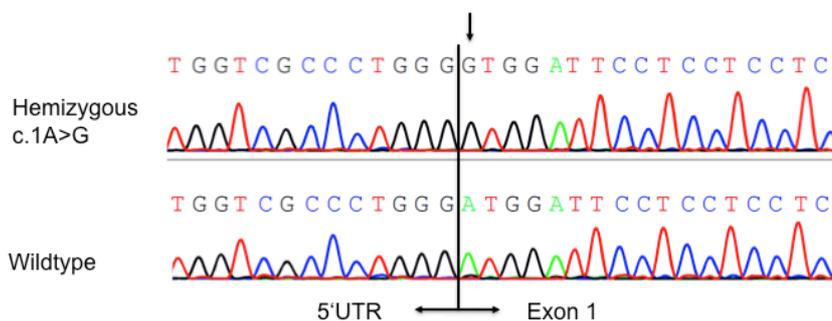


Abbildung 3.3: Mutationsanalyse Familie I.

Sequenzierung von *TIMM8A* erbrachte einen A>G Basenaustausch bei Patient I und seinem Bruder (erste Reihe, hemizygot). Die letzte Reihe zeigt die Wildtyp-Sequenz. Grün: Adenin (A), Rot: Thymin (T), Blau: Cytosin (C), Schwarz: Guanodin (G).

3.2 Projekt B: XLA-Patient mit Hörminderung, Dystonie-Parkinsonismus und progressiver Neurodegeneration

3.2.1 Klinische Daten

Patient II (IV.1 in Abbildung 3.4) war zu dem Zeitpunkt der Untersuchung 21 Jahre alt.

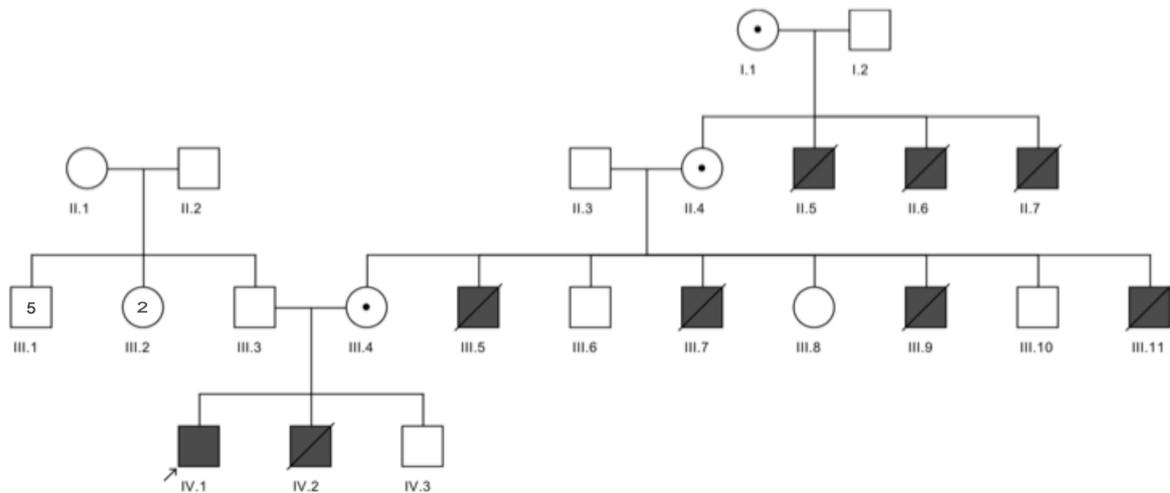


Abbildung 3.4: Stammbaum der Familie II.

Abbildung adaptiert von Domingo et al., 2014.

Der Stammbaum zeigt ein klares X-chromosomales Vererbungsmuster. Kreise stehen für weibliche Familienmitglieder und Quadrate markieren männliche Mitglieder. Die römischen Ziffern I-IV geben die Generation an. Der Pfeil verweist auf den Index-Patienten (Patient II). Graue Symbole stehen für XLA-Patienten, weiße Symbole kennzeichnen gesunde Individuen. Weiß mit Punkt: Konduktorin, durchgestrichen: verstorben.

Patient II war der einzige überlebende XLA-Patient der Familie II. Im Alter von drei Jahren wurde bei ihm XLA diagnostiziert. Seither wurde er mit intravenösen Immunglobulinen therapiert. Die mittlere Tagesdosis betrug 300 – 400 mg/kg Körpergewicht. Im Alter von zwei Jahren wurde bei ihm bereits eine leichte Hörminderung festgestellt (um seine Aufmerksamkeit zu erlangen, war eine lautere Stimme nötig). Die Sprachentwicklung war jedoch altersentsprechend, weswegen keine audiometrischen Testungen vorgenommen wurden. Krankenhausaufenthalte aufgrund von neurologischen oder enteritischen Infektionen fanden nicht statt.

Im Alter von 19 Jahren traten bei dem Patienten erstmals neurologische Symptome in Form von Dysarthrie und Gleichgewichtsstörung auf, begleitet von kognitiven Veränderungen und Echolalie, Palilalie, sowie Perseveration. Innerhalb des nächsten Jahres verschlimmerten sich die Persönlichkeitsveränderungen; Enthemmung und

Reizbarkeit erforderten einen Schulabbruch. Eine neurologische Untersuchung in diesem Alter erbrachte eine horizontale Blickparese, Dystonie beider Hände, choreatiforme/hyperkinetische Bewegungen, einen Haltetremor und die Unfähigkeit des Seiltänzergangs.

Eine MRT des Gehirns zeigte eine Atrophie der Ncl. caudati (s. Abbildung 3.5). Im EEG wurden keine Auffälligkeiten beobachtet. Die Ableitung akustisch-evozierter Hirnstamm-potentiale zeigten beidseits eine verzögerte Latenz, einem zentralen Hörverlust entsprechend. Liquorparameter ergaben keinen Anhalt auf eine Entzündung.

Motorik und kognitive Fähigkeiten nahmen im Verlauf weiter ab. Mit 21 Jahren war der Patient aufgrund von Bettlägerigkeit, Inkontinenz, akinetischem Mutismus einer generalisierten Muskelhypertonie und Spastik bei allen Aktivitäten auf Hilfe angewiesen.

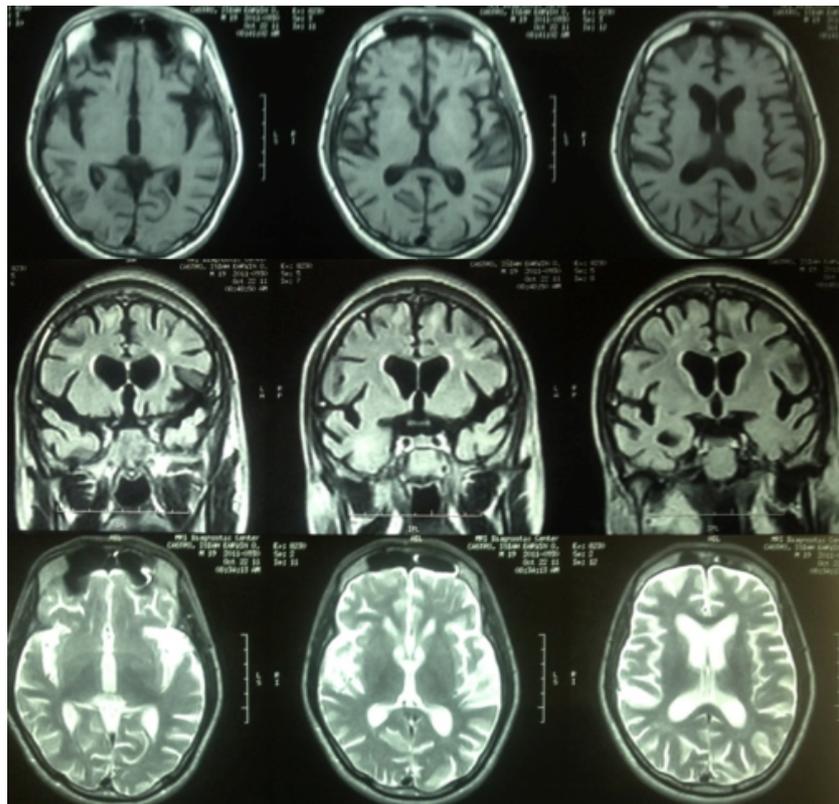


Abbildung 3.5: T1- und T2-gewichtete MRT.

Abbildung adaptiert von Domingo et al., 2014.

Atrophie der vorderen Anteile der Ncl. caudati.

3.2.2 Genetische Analyse

Aufgrund des Auftretens von XLA zusammen mit Dystonie und Hörverlust bei Patient II wurde der gesamte codierende Bereich jeweils von *TIMM8A* und *BTK* sequenziert. Dies erbrachte einen hemizygoten c.1751G>A Basenaustausch im *BTK*-Gen bei Patient II (bei der Mutter entsprechend c.1751G>A heterozygot) und keine Mutationen in *TIMM8A*.

Da diese Mutation das erste Nukleotid auf Exon 18 betrifft und dadurch potentiell das mRNA-Spleißen verändert, wurde der Bereich von Exon 9 bis 19 auf cDNA-Ebene amplifiziert. Sequenzierung dieses Amplikons erbrachte keinen Anhalt auf eine Änderung des Spleißens (s. Abbildung 3.6), sodass eine *Missense*-Mutation (p.Gly584Glu) als Konsequenz des Basenaustauschs anzunehmen ist.

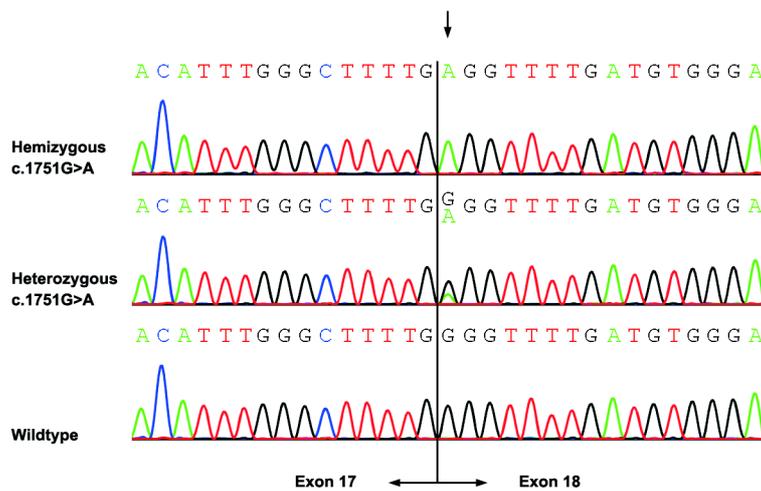


Abbildung 3.6: Mutationsanalyse auf cDNA-Ebene Familie II.

Abbildung adaptiert von Domingo et al., 2014.

Sequenzierung von cDNA zeigte eine Exprimierung des mutierten Allels bei Patient II (hemizygot, erste Reihe, c.1751G>A Basenaustausch (Referenzsequenz: NM_000061); IV.1 in Abbildung 3.4) und bei der Mutter des Patienten (heterozygot, zweite Reihe; III.4 in Abbildung 3.4). Die letzte Reihe zeigt die Wildtyp-Sequenz. Grün: Adenin (A), Rot: Thymin (T), Blau: Cytosin (C), Schwarz: Guanodin (G).

3.3 Projekt C: Patientin mit Beta-Propeller-assoziiierter Neurodegeneration

3.3.1 Klinische Daten

Patientin III war zu dem Zeitpunkt der im Folgenden dargestellten klinischen und genetischen Untersuchungen 22 Jahre alt. Sie kam gesund zur Welt, bereits in früher Kindheit zeigte sich jedoch eine verlangsamte Sprach- und Bewegungsentwicklung. Seit dem Kindesalter ist sie geistig behindert und sowohl ihr Sprachverständnis als auch ihre Sprachproduktion sind seither deutlich eingeschränkt. Später manifestierte sich eine generalisierte Dystonie mit ausgeprägten Stereotypien (s. Abbildung 3.7). Anhand ihrer Symptome und der sich im MRT darstellenden typischen Eisenablagerung in der Substantia nigra (s. Abbildung 3.8) wurde die Diagnose BPAN gestellt.

Die Patientin hat zwei gesunde Geschwister (zum Zeitpunkt der Untersuchung einen 31-jährigen Bruder und eine 28-jährige Schwester). In der restlichen Familie sind keine neurologischen Erkrankungen bekannt.

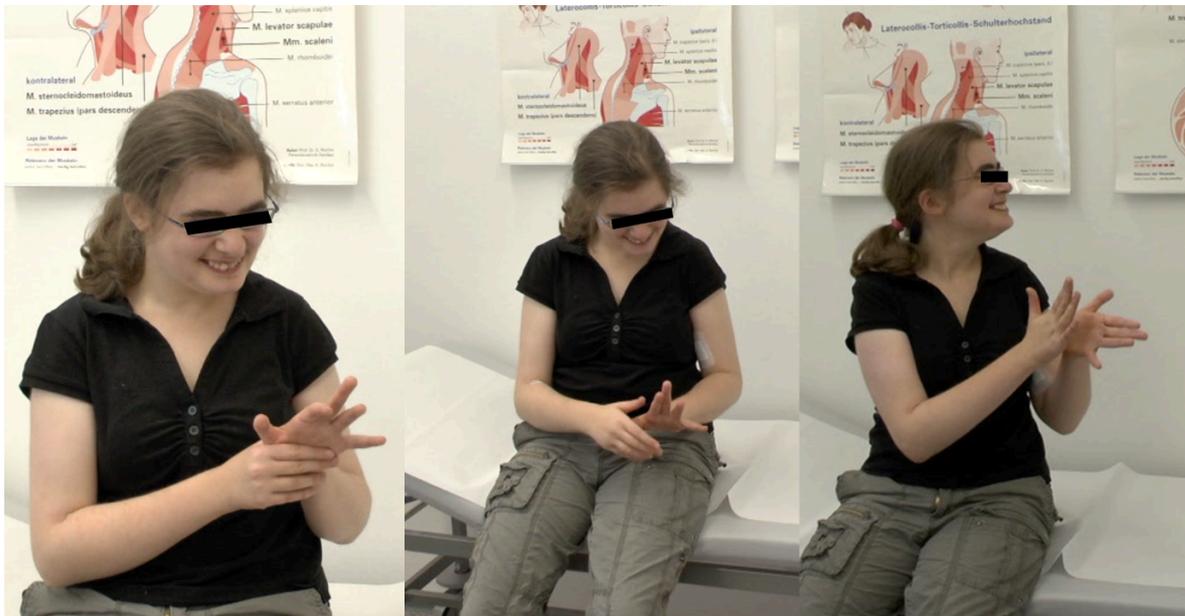


Abbildung 3.7: *BPAN-typische Stereotypien.*

Auf den Bildern sind die für BPAN typischen Stereotypien (in diesem Fall repetitives in die Hände Klatschen) von Patientin III zu sehen.

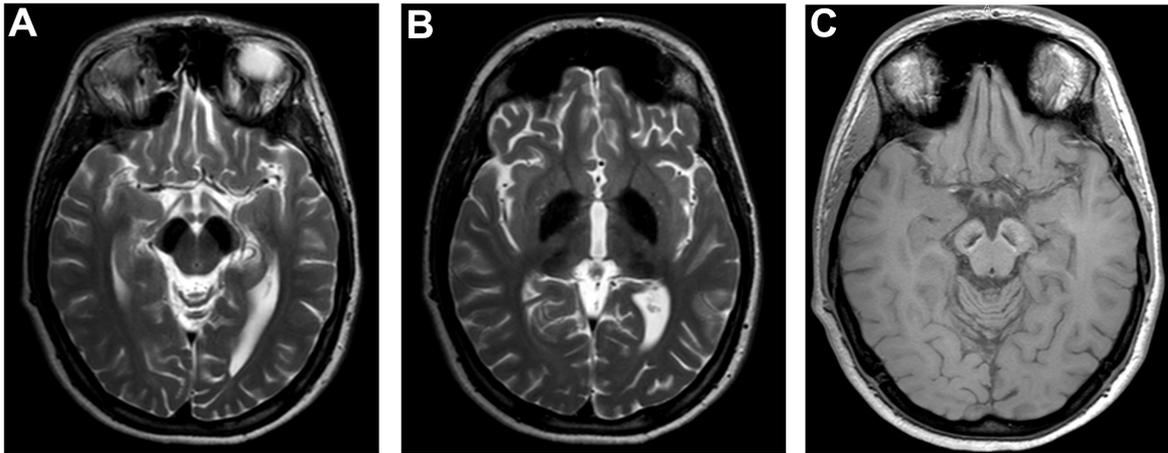


Abbildung 3.8: MRT zeigt Eisenablagerung in den Basalganglien einer Patientin mit BPAN.

Die Substantia nigra (A), der Globus pallidus und in geringerem Ausmaß der Thalamus (B) stellen sich beidseits deutlich hypointens in den axialen T2-Sequenzen dar, was auf einen hohen Eisengehalt hindeutet. In der T1-gewichteten Sequenz (C) ist zentral in der Substantia nigra ein hypointenser Streifen neben einer hyperintensiven Linie zu sehen, was ein charakteristischer Befund bei BPAN ist.

3.3.2 Genetische Analyse

3.3.2.1 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Die klinische Diagnose BPAN wurde anschließend durch genetische Analyse validiert. Die Sequenzierung des *WDR45*-Gens erbrachte eine heterozygote Deletion von drei Basenpaaren in Intron 8 (c.519+1_519+3delGTG; s. Abbildung 3.9).

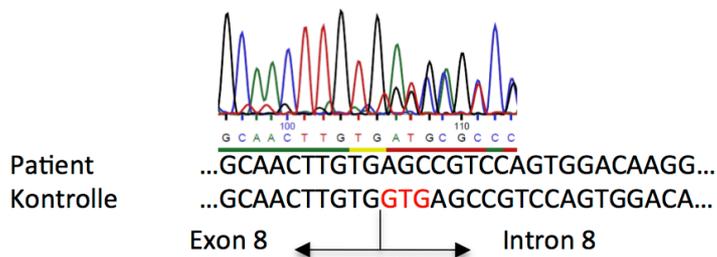


Abbildung 3.9: Mutationsanalyse der Patientin III.

Mittels Sequenzierung des *WDR45*-Gens wurde eine heterozygote Deletion der ersten drei Basenpaare des Introns 8 (c.519+1_519+3delGTG) detektiert. Die untere Schriftreihe zeigt die Wildtyp-Sequenz. Grün: Adenin (A), Rot: Thymin (T), Blau: Cytosin (C), Schwarz: Guanodin (G).

Die Deletion des Basenpaartripletts GTG betrifft die ersten drei Basenpaare des Introns 8.

Da diese Mutation potentiell das Spleißen der mRNA beeinflussen könnte, wurde RNA aus Blut revers in cDNA transkribiert und auf cDNA-Ebene die Exone 8 und 9 amplifiziert.

Die Sequenzierung dieses Amplikons ließ den Verlust der ursprünglichen Spleiß-Stelle von Exon 8 erkennen, was zu einem abweichenden Spleißen und zu einer Insertion von 19 Basenpaaren der intronischen Sequenz zwischen dem letzten Nukleotid von Exon 8 (c.519) und dem ersten Nukleotid von Exon 9 (c.520) führt (NM_007075.3: c.519_520insAGCCGTCCAGTGGACAAGG; s. Abbildung 3.10). Auf cDNA-Ebene wurde überwiegend das mutierte Allel detektiert.

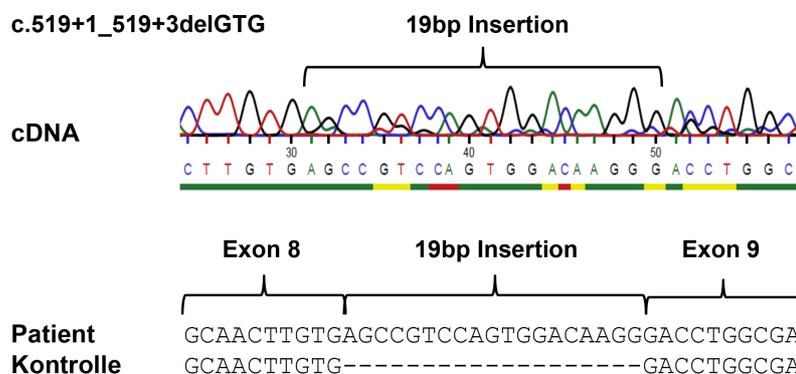


Abbildung 3.10: Mutationsanalyse der Patientin III auf cDNA-Ebene.

Die detektierte Trinukleotid-Deletion in Intron 8 (c.519+1_519+3delGTG; s. Abbildung 3.9) führt zur Entstehung einer neuen Spleiß-Stelle und zur Insertion von 19 Basenpaaren in die codierende Sequenz (c.519_520insAGCCGTCCAGTGGACAAGG). Grün: Adenin (A), Rot: Thymin (T), Blau: Cytosin (C), Schwarz: Guanodin (G).

3.3.2.2 XCI-Messung

Da Patientin III heterozygote Trägerin einer Mutation von WDR45 auf dem X-Chromosom ist und somit potentiell über zwei Zellpopulationen – eine mit mutiertem Allel und eine mit Wildtyp-Allel – verfügt, wurde das Verhältnis der X-Chromosomen-Inaktivierung gemessen.

Die Analyse genomischer DNA extrahiert aus Blut ergab eine Verschiebung des XCI-Verhältnisses von 88 : 12.

DNA aus dermalen Fibroblasten wurde ebenfalls extrahiert und das XCI-Verhältnis gemessen, welches in diesem Fall ebenfalls verschoben war (81 : 19).

3.3.2.3 *WDR45*-Genexpression in Fibroblasten

Mittels RT-PCR wurde die Genexpression von *WDR45* in Fibroblastenzellen gemessen.

Hierfür wurde RNA aus Fibroblastenzellkulturen der Patientin III und zwei Kontroll-Fibroblastenzelllinien extrahiert, welche anschließend revers in cDNA transkribiert wurde. Zuerst wurde eine PCR mit *Primern* durchgeführt, welche spezifisch nur das Wildtyp-Allel (s. Bild A in Abbildung 3.11) oder nur das mutierte Allel amplifizieren (s. Bild B in Abbildung 3.11).

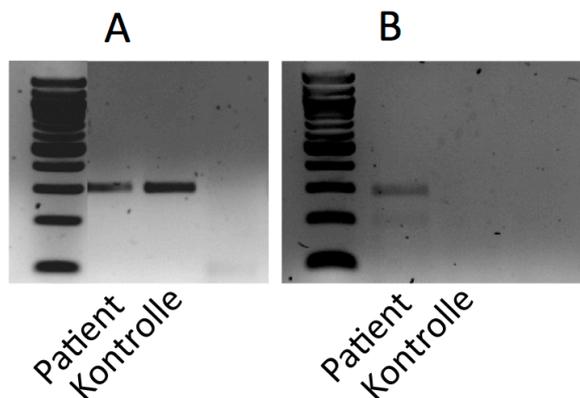


Abbildung 3.11: Agarose-Gelelektrophorese für PCR mit allelspezifischen Primern.

Bild A zeigt die Agarose-Gelelektrophorese nach PCR mit für das Wildtyp-Allel spezifischen *Primern*. Bild B zeigt die Agarose-Gelelektrophorese nach PCR mit *Primern*, welche spezifisch an das mutierte Allel binden. Fibroblasten der Patientin III exprimieren sowohl das mutierte *WDR45* als auch das Wildtyp-*WDR45*.

Die Allel-Spezifität der jeweiligen *Primer*-Paare wurde anschließend durch Sequenzierung validiert. Die Proben der heterozygoten Patientin III zeigten jeweils nur eine Sequenz.

Nachdem gezeigt werden konnte, dass das Wildtyp-Allel-*Primer*-Paar spezifisch nur an das Wildtyp-Allel bindet (s. Abbildung 3.11), wurde die Genexpression mittels RT-PCR der cDNA aus Kontroll- und Patientenfibroblasten quantifiziert.

Hierfür wurde oben erwähntes für das Wildtyp-Allel spezifische *Primer*-Paar („*WDR45* Wildtyp-Allel“ in Abbildung 3.12) verwendet und ein *Primer*-Paar, welches Allel-unspezifisch bindet („*WDR45*“ in Abbildung 3.12).

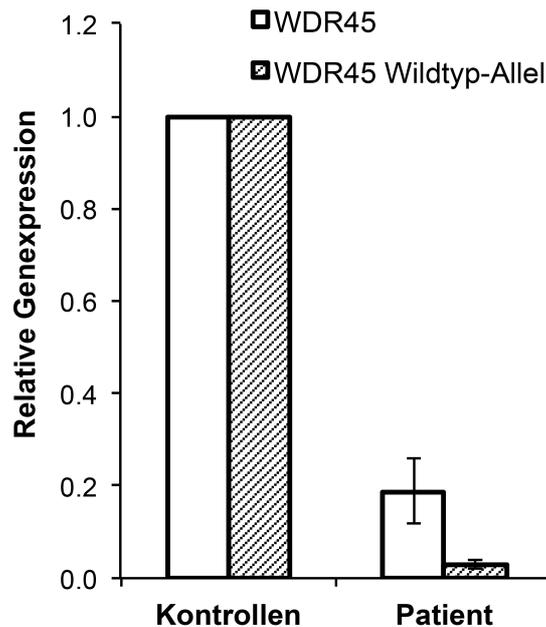


Abbildung 3.12: Verringerte Genexpression von *WDR45* bei Patientin III.

Die allel-spezifische RT-PCR der cDNA aus Kontroll- und Patientenfibroblasten zeigt, dass die Genexpression des Wildtyp-Allels von *WDR45* deutlich (> 90 %) reduziert ist. Die mutierte Variante wird ebenfalls exprimiert (s. Abbildung 3.11), allerdings ist die Gesamtexpression von *WDR45* um ca. 80 % verringert. Referenzgen ist β -Actin und die Werte von zwei Kontroll-Fibroblastenlinien wurden auf 100 % gesetzt. Fehlerbalken geben die Standardabweichung wider (n=2).

Bei der RT-PCR wurde die Gesamtexpression von *WDR45* und die Expression nur des Wildtyp-Allels gemessen und jeweils mit der gemessenen Expression des Referenzgens β -Actin verrechnet. Die Gesamtexpression von *WDR45* zeigte sich dabei in der cDNA von Fibroblasten der Patientin III deutlich verringert, verglichen mit der von Kontrollfibroblasten (s. Abbildung 3.12). Wie gelelektrophoretisch bereits gezeigt (s. Abbildung 3.11), exprimiert Patientin III auch das Wildtyp-Allel, jedoch deutlich geringer, sowohl im Vergleich zur Gesamtexpression von *WDR45* als auch im Vergleich zur Expression des Wildtyp-Allels bei Kontrollfibroblasten (s. Abbildung 3.12).

3.3.3 Funktionelle Untersuchung der Mitochondrien dermalen Fibroblasten

Um zu untersuchen, ob die bei Patientin III gefundene Mutation Auswirkung hat auf die Funktion von Mitochondrien, wurde die mitochondriale Morphologie untersucht und das mitochondriale Membranpotential bestimmt.

3.3.3.1 Mitochondriale Morphologie

Um die Morphologie der Mitochondrien zu beurteilen, wurde der sogenannte Form-Faktor bestimmt, welcher das Ausmaß der mitochondrialen Verzweigung beschreibt.

Hierfür wurden, wie in Abschnitt 2.3.8.1 beschrieben, Kontrollfibroblasten und Patientenfibroblasten immunzytochemisch mit einem Antikörper gegen das mitochondriale Protein GRP75 (*glucose-regulated protein 75*) angefärbt. Nach Binärisierung der Bilder von immunzytochemisch angefärbten Fibroblasten wurde der Form-Faktor errechnet.

Bei Patientenfibroblasten wurde ein signifikant niedrigerer Form-Faktor gemessen als bei Kontrollfibroblasten (s. Abbildung 3.13), was für eine geringere Verzweigung und stärkere Fragmentierung des mitochondrialen Netzwerks der Patientenfibroblasten spricht.

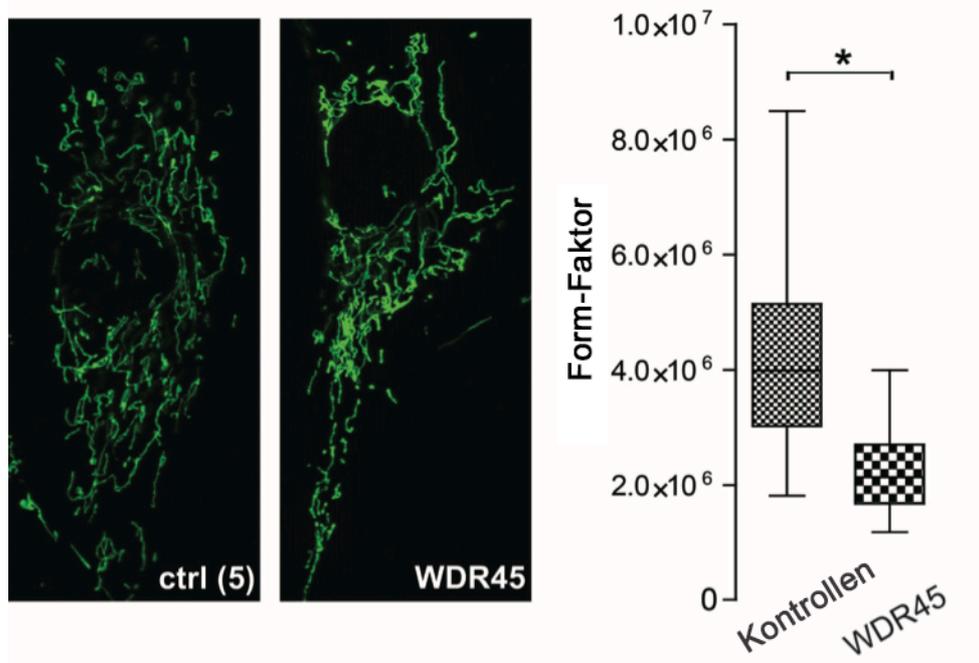


Abbildung 3.13: Erhöhter Anteil an fragmentierten Mitochondrien dermalen Fibroblastenzellen der Patientin III (WDR45).

Die Abbildungen zeigen repräsentative Bilder einer Immunfluoreszenzfärbung des mitochondrialen Netzwerks unter basalen Bedingungen mit einem Antikörper gegen das mitochondriale Protein *glucose-regulated protein 75* (GRP75). Das Ausmaß an Verzweigung dieses Netzwerks wird durch den „Form-Faktor“ angegeben, wobei der niedrigere „Form-Faktor“ in den Mitochondrien der Patientin auf eine geringere Verzweigung und mehr fragmentierte Mitochondrien schließen lässt. (Der Median, der Interquartilsabstand, der minimale sowie der maximale Wert der untersuchten Proben sind dargestellt. Ungepaarter t-Test; $p < 0,05$; 4 Kontroll-Linien $n = 72$ Bilder und 1 Patientenlinie (WDR45) $n = 47$ Bilder).

3.3.3.2 Mitochondriales Membranpotential

Um Rückschlüsse auf die Funktion der Mitochondrien schließen zu können, wurde das mitochondriale Membranpotential berechnet.

Das mitochondriale Membranpotential wurde, wie in Abschnitt 2.3.7 beschrieben, mittels *JC-1* von zwei Kontrollfibroblastenlinien und der Patientenfibroblastenlinie ermittelt. Der bei der ersten Kontrollfibroblastenlinie (ctrl(3)) gemessene Wert wurde auf 100 % gesetzt und die Werte der zweiten Fibroblastenlinie und der Patientenlinie dazu normalisiert. Dies erbrachte ein signifikant niedrigeres mitochondriales Membranpotential der Patientenfibroblasten im Vergleich zu den Kontrollfibroblasten (s. Abbildung 3.14).

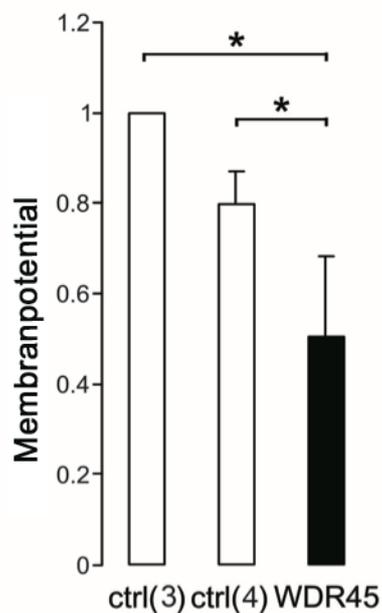


Abbildung 3.14: Reduziertes Membranpotential dermalen Fibroblasten der Patientin III (WDR45).

Mitochondriales Membranpotential wurde mittels *JC-1* in zwei Fibroblastenlinien gesunder Kontrollen (ctrl(3) und ctrl(4)) und der Patientenlinie gemessen. Die Werte von ctrl(3) wurden auf 100% gesetzt und die zweite Kontrolle ctrl(4) sowie die Patientenlinie dazu normalisiert. Fehlerbalken zeigen Standardabweichung. *Einfaktorielle ANOVA mit Bonferroni Post-hoc-Test ergab statistische Signifikanz ($p < 0,05$; $n=6$).

4 Diskussion

In den folgenden Abschnitten 4.1, 4.2 und 4.3 werden zunächst die Ergebnisse der Projekte A, B bzw. C diskutiert. In Abschnitt 4.4 erfolgt die Beurteilung der Annahmen, bevor in Abschnitt 4.5 schließlich ein Ausblick gegeben wird.

4.1 Projekt A: Bericht über ersten Filipino mit Mohr-Tranebjaerg Syndrom

Die bei Patient I und seinem Bruder gefundene neue Mutation in *TIMM8A* (NM_004085: c.1A>G; s. Abbildung 3.3) betrifft das für Methionin codierende Startcodon (AUG). Dies führt entweder zu einer ausbleibenden Translation des TIMM8A-Proteins (p.0) oder hat eine neue Initiationsstelle der Translation strangab- oder -aufwärts zur Folge, mit entsprechend anderem Leseraster.

Da die gleiche neue Mutation bei Patient I und seinem Bruder gefunden wurde und diese bei deren Großmutter (Wildtyp-Sequenz *TIMM8A*) nicht nachgewiesen werden konnte, muss die hier gefundene Mutation entweder in der Keimbahn-DNA der Großmutter, des Großvaters mütterlicherseits oder der Mutter *de-novo* entstanden sein. Leider stand von den Eltern kein Biomaterial zur Verfügung, so dass sie nicht auf die hier gefundene Mutation untersucht werden konnten.

Da von Patient I kein Biomaterial zur Verfügung stand, welches für eine Zellkultur geeignet gewesen wäre, konnten keine Protein-Studien durchgeführt werden, um die Translation oder Funktionalität des TIMM8A-Proteins bei Patient I zu untersuchen.

Die Pathogenese von MTS ist eine mitochondriale Funktionsstörung, verursacht durch Mutationen im Kern-Gen *TIMM8A*, wobei die spezifischen Mechanismen dieser Mitochondrienstörung jedoch noch ungeklärt sind (Tranebjaerg et al., 2003/2013).

Bislang wurden 99 MTS-Patienten identifiziert (2018; Tranebjaerg, persönliche Kommunikation), von denen sechs asiatischer (japanischer) Herkunft sind (Tranebjaerg et al. 2012). Der hier vorgestellte Patient I ist der erste Filipino, bei welchem eine genetisch bestätigte Diagnose mit MTS gestellt wurde (s. Abschnitt 3.1.1 und 3.1.2).

Die XDP-ähnliche Symptom-Konstellation bei Patient I und seinem Bruder, sowie deren Abstammung von der Panay-Insel, ließen zuerst die Verdachtsdiagnose XDP stellen. Die

früh auftretende Taubheit und die kognitive Beeinträchtigung sind jedoch charakteristische Symptome von MTS (Ha et al., 2012) und sprachen darüber hinaus gegen die Diagnose XDP. Die genetische Analyse auf den „XDP-Haplotyp“ war bei beiden negativ.

4.2 Projekt B: Patient mit Bruton-Syndrom und Hörminderung, Dystonie-Parkinsonismus und progressiver Neurodegeneration

Die genetische Analyse von Patient II mittels PCR und Sanger-Sequenzierung erbrachte eine das erste Nukleotid von Exon 18 im *BTK*-Gen betreffende Mutation, die Sequenzierung der beiden Exone von *TIMM8A* ergab jedoch lediglich Wildtyp-Sequenz.

Die bei Patient II gefundene Mutation (NM_000061: c.1751G>A; p.Gly584Glu; s. Abbildung 3.6) wurde bereits bei zwei anderen XLA-Patienten beschrieben (Velikcovic et al., 2004). Neben dieser G>A-Mutation wurde auch eine G>C-Mutation an derselben Stelle bei einem europäischen Patient gefunden (c.1751G>C, p.Gly584Arg; Tóth et al., 2009). Leider wurden jedoch weder von Tóth et al., noch von Velikcovic et al. klinische Informationen zu den jeweiligen Patienten angegeben.

Interessanterweise wurde von Papapetropoulos et al. ein XLA-Patienten beschrieben, bei welchem Parkinsonismus und ebenfalls Dystonie diagnostiziert wurde und bei welchem eine Mutation in Exon 19 des *BTK*-Gens gefunden wurde (c.1969G>C, p.Glu657Gln; Papapetropoulos et al., 2007). Wie bei unserem Patient II fand sich auch bei diesem Patienten keine infektiologische Ursache der neurologischen Symptomatik und Mutationen in *TIMM8A* konnten ebenfalls ausgeschlossen werden.

In einer Register-basierten Studie in den USA wurde bei 4 von insgesamt 201 eingeschlossenen XLA-Patienten eine zunehmende neurologische Verschlechterung beschrieben ohne Hinweise auf eine infektiologische Genese der Beschwerden und ohne Anhalt auf eine andere Ursache (Winkelstein et al., 2006). Ziegner et al. und Shiroma et al. beschrieben ebenfalls XLA-Patienten mit fortschreitender Neurodegeneration, wobei auch in diesen Fällen die Ätiologie der neurologischen Symptome ungeklärt blieb (Ziegner et al., 2002; Shiroma et al., 2004). Ein Zusammenhang zur chronischen Behandlung mit intravenösen Immunglobulinen wurde jedoch vorgeschlagen (Ziegner et al., 2002; Shiroma et al., 2004). Allerdings sind sowohl bei Winkelstein et al., als auch bei Ziegner et al. und Shiroma et al. keine Angaben zu genetischen Analysen von *TIMM8A* zu finden.

Es ließe sich Hypothesieren, dass bestimmte Mutationen im *BTK*-Gen die Translation des direkt benachbarten *TIMM8A*-Gens (s. Abschnitt 1.3 und Abschnitt 1.4) beeinflussen können. Da von dem philippinischen Patient II keine Fibroblasten zur Verfügung standen, konnten keine entsprechenden Proteinanalysen durchgeführt werden.

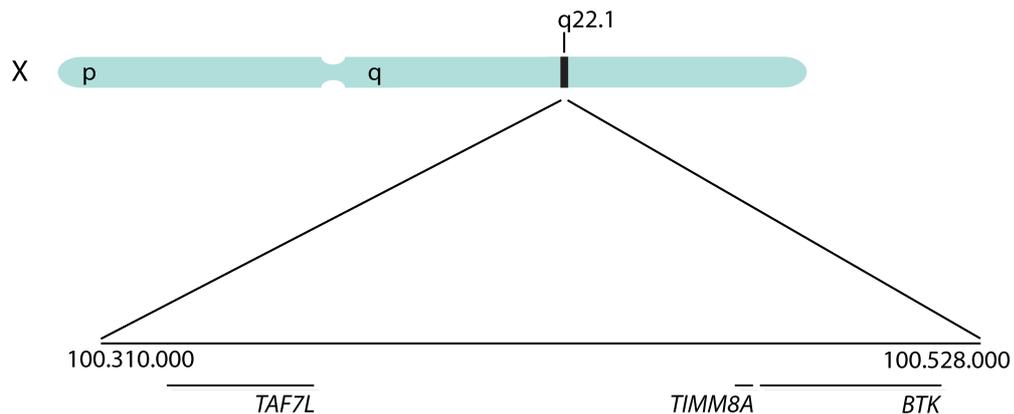


Abbildung 4.1: Illustration des Locus Xq22.1 mit den benachbarten Genen *TIMM8A* und *BTK*

Die Abbildung zeigt den Locus 22.1 auf dem langen Arm des X-Chromosoms (Xq). Die Linienlänge zeigt in etwa die Länge des jeweiligen Gens (nicht maßstabsgetreu). Länge von *TIMM8A* (OMIM#300356) ca. 2kbp; Länge *BTK* (OMIM#300300) ca. 37kpb; Bereich zwischen *TIMM8A* und *BTK* <1kbp (USCS Genome Browser).

Auffälligerweise liegen die Mutation von Patient II und die von *Papapetropoulos et al.* beschriebene Mutation des anderen Patienten mit XLA und Dystonie-Parkinsonismus nah beieinander (Patient II: c.1751G>A, p.Gly584Glu; *Papapetropoulos et al.*: c.1969G>C, p.Glu657Gln). Beide befinden sich damit in einem stark konservierten Bereich am C-terminalen Ende des *BTK*-Proteins und beide Mutationen befinden sich innerhalb der Tyrosinkinase-Domäne. *BTK* wird sehr stark im ZNS exprimiert und spielt eine wichtige Rolle in der neuronalen Differenzierung (Yang et al., 2004), sodass trotz der geringen Patienten-Anzahl angenommen werden könnte, dass die terminale Tyrosinkinase-Domäne eine wichtige Rolle bei der Funktion von *BTK* im ZNS spielt und Mutationen in diesem Bereich zum neurologischen Phänotyp beitragen.

4.3 Projekt C: Patientin mit Beta-Propeller-assoziiierter Neurodegeneration

Anhand der Symptomkonstellation bei Patientin III und der im MRT zur Darstellung kommenden charakteristischen Eisenablagerung in der *Substantia nigra* (s. Abschnitt 3.3.1, Abbildung 3.7 und Abbildung 3.8) konnte bereits die Diagnose BPAN gestellt werden. Die anschließenden genetischen und funktionellen Analysen von Blut bzw. dermalen Fibroblasten aus Hautbiopsien der Patientin konnten die Diagnose validieren bzw. gewähren einen tieferen Einblick in die Pathogenese dieser seltenen Erkrankung.

4.3.1 Genetische Analyse: eine Mutation im *WDR45*-Gen sowie ein verschobenes XCI-Verhältnis zugunsten des mutierten *WDR45*-Allels sind ursächlich für die Erkrankung von Patientin III

Die bei Patientin III gefundene heterozygote 3-Nukleotid-Deletions-Mutation (NM_007075.3: c.519+1_519+3delGTG) wurde bereits kürzlich bei einer 31-jährigen Patientin mit BPAN beschrieben (Ichinose et al., 2014).

Die Deletion der drei Basenpaare auf Ebene der genomischen DNA führt durch Verlust der ursprünglichen Spleiß-Stelle durch geändertes Spleißen zu der Insertion von 19 Basenpaaren in der codierenden Sequenz (c.519_520insAGCCGTCCAGTGGACAAGG; s. Abschnitt 3.3.2.1 und Abbildung 3.10). Diese 19-Basenpaar-Insertion in die codierende DNA-Sequenz verursacht ein verändertes Leseraster.

Die Web-basierte Software *Mutationtaster* (<http://www.mutationtaster.org>) sagt für diese Mutation voraus, dass das durch das mutierte Allel synthetisierte Protein aufgrund eines vorzeitigen Stopcodons eine kürzere Aminosäuresequenz aufweist im Vergleich zum nicht-mutierten *WDR45*-Protein. Wildtyp-*WDR45* besteht aus einer 363-Aminosäurelangen Sequenz; demgegenüber ist das mutierte *WDR45* nur 201 Aminosäuren lang (p.D174Ss*28).

Die auf genomischer DNA-Ebene heterozygote Mutation (c.519+1_519+3delGTG) konnte auf Ebene der codierenden DNA (c.519_520insAGCCGTCCAGTGGACAAGG) überwiegend in Form der mutierten Allel-Sequenz detektiert werden (vgl. oben und Abschnitt 3.3.2.1), was durch ein verschobenes Verhältnis der X-Chromosomen-Inaktivierung (XCI) erklärt werden könnte. Entsprechend zeigte die anschließend durchgeführte XCI-Analyse ein verschobenes XCI-Verhältnis der genomischen DNA

extrahiert aus Blut (88 : 12) und aus dermalen Fibroblasten (81 : 19) (vgl. Abschnitt 3.3.2.2).

Da das XCI-Verhältnis von Gewebe zu Gewebe nur zu einem geringen Grad variiert (Bittel et al., 2008), ist anzunehmen, dass im ZNS der Patientin III ein ähnlich verschobenes XCI-Verhältnis vorliegt wie im Blut oder in den aus Hautbiopsien gewonnenen dermalen Fibroblasten, welche für die Analyse der Mitochondrien der vorliegenden Arbeit verwendet wurden.

Darüberhinaus konnte mittels allelspezifischer quantitativer Echtzeit-PCR eine verringerte Gen-Expression des mutierten *WDR45*-Allels und eine deutlich verringerte Gen-Expression des Wildtyp-Allels gezeigt werden. Dieses Ergebnis zeigt deutlich, dass das XCI-Verhältnis bei Patientin III zugunsten des mutierten Allels verschoben ist. *Zarate et al.* beschrieben kürzlich eine Patientin mit BPAN, bei der eine ausgeprägte Verschiebung des XCI-Verhältnisses (92 : 8) ebenfalls zugunsten des mutierten Allels detektiert wurde (Zarate et al., 2016; Gregory et al., 2017).

Die Ergebnisse der XCI-Analyse und der quantitativen Echtzeit-PCR konnten also zeigen, dass bei Patientin III Wildtyp-*WDR45*-mRNA aufgrund von Inaktivierung/Methylierung kaum exprimiert wird. Es ist folglich anzunehmen, dass die bei Patientin III gefundene Mutation im *WDR45*-Gen ursächlich für ihre neurodegenerative Erkrankung ist.

4.3.2 Funktionelle Analyse: *WDR45*-mutierte dermale Fibroblasten zeigen eine mitochondriale Funktionsstörung

Ergebnisse der vorliegenden Arbeiten konnten eine eingeschränkte mitochondriale Funktion bei *WDR45*-mutierten dermalen Fibroblasten nachweisen. Die mitochondriale Funktionsstörung wurde durch eine verstärkte Fragmentierung der Mitochondrien und ein vermindertes mitochondriales Membranpotential gezeigt (s. Abschnitt 3.3.3.1 und Abbildung 3.13 bzw. Abschnitt 3.3.3.2 und Abbildung 3.14). Mitochondriale Funktionsstörung ist häufig begleitet von mitochondrialer Fragmentierung (Chen und Chan, 2009) und das mitochondriale Membranpotential gilt als zentraler Indikator der mitochondrialen Intaktheit (Narendra et al., 2008; Grünewald et al., 2010).

Wie in Abschnitt 1.5 beschrieben, wurde bereits eine Verbindung von *WDR45* zur Funktionalität der Mitochondrien vermutet, bislang wurden jedoch noch keine Studien veröffentlicht, die diese Verbindung belegen konnten. Die Ergebnisse der funktionellen Analyse von *WDR45*-mutierten dermalen Fibroblasten der vorliegenden Arbeit ergänzen

folglich die Kenntnis des pathologischen Phänotyps von BPAN um den Aspekt der mitochondrialen Funktionseinschränkung.

Spätere Ergebnisse der Arbeitsgruppe konnten zeigen, dass *WDR45*-mutierte dermale Fibroblasten ein erhöhtes Eisen-Level im Vergleich zu gesunden dermalen Fibroblasten aufweisen (Seibler, et al., 2018, *eingereicht*). Ein erhöhtes Eisen-Level kann als ursächlich für die mitochondriale Funktionsstörung der *WDR45*-mutierten dermalen Fibroblasten angesehen werden, da Eisen durch Katalyse der Entstehung von Hydroxyl-Radikalen zu erhöhtem oxidativen Stress führt, auf welchen wiederum Mitochondrien sehr empfindlich reagieren (Seibler et al., 2018, *eingereicht*).

Wie in Abschnitt 1.5 erläutert, ist die genaue Funktion des *WDR45*-Proteins auf zellulärer Ebene bislang nicht vollständig entschlüsselt, eine wichtige Rolle im Prozess der Autophagie wird jedoch angenommen. So bindet *WDR45* Autophagie-zugehörige Proteine und ist ein wesentlicher Bestandteil bei der Bildung des Autophagosoms und reguliert vermutlich die Größe und die Reifung des Autophagosoms (Lu et al., 2011; Armi et al., 2013; Arber et al., 2016).

Eine Dysregulation der Autophagie als Ursache für Neurodegenerative Erkrankungen wurde bereits durch viele Erkenntnisse gezeigt (Menzies et al., 2010; Saitsu et al., 2013).

Ein gestörter autophagischer Abbau speziell der Mitochondrien (Mitophagie) wurde bei *PINK1*- und *Parkin*-mutationstragenden Zelllinien beschrieben (Youle und Narendra, 2011; Youle und van der Bliek, 2012; Saitsu et al., 2013), wobei Mutationen in *PINK1* (*PTEN induced putative kinase*) und *Parkin* ursächlich für autosomal-rezessiv vererbten Morbus Parkinson sind (Kitada et al., 1998; Valente et al., 2004; Rakovic et al., 2010).

Parkinsonismus als eines der Hauptsymptome von BPAN, der charakteristische Befall der Substantia nigra bei beiden Erkrankungen und die Beteiligung der jeweils betroffenen Proteine in Prozessen der Autophagie und Mitophagie lassen vermuten, dass ein möglicherweise ähnlicher Pathomechanismus auf zellulärer und molekularer Ebene den beiden Erkrankungen zugrunde liegt (Jiang und Mizushima, 2013; Arber et al., 2016).

4.4 Schlussfolgerungen – Beurteilung der Annahmen

Die in Abschnitt 1.6 abgefassten Zielsetzungen konnten in allen Fällen umgesetzt werden. Nachfolgend werden die jeweils aufgestellten Hypothesen beantwortet.

4.4.1 Projekt A

Hypothese: Unser, von den Philippinen stammender Patient I mit Taubheit seit dem 3. Lebensjahr und Dystonie seit dem 14. Lebensjahr, sowie sein ebenfalls erkrankter Bruder sind hemizygot Träger einer krankheitsverursachenden Mutation im *TIMM8A*-Gen, welche bei ihrer Großmutter mütterlicherseits ebenfalls, jedoch heterozygot vorliegt.

Die genetische Analyse der Familie I mittels PCR und Sanger-Sequenzierung des *TIMM8A*-Gens erbrachte eine bislang nicht in der Literatur beschriebene, das erste Nukleotid des Startcodons in Exon 1 verändernde, hemizygot Mutation bei Patient I (c.1A>G; p.Met1?; s. Abschnitt 3.1.2 und Abbildung 3.3). Dieselbe Mutation wurde bei dem ebenfalls erkrankten Bruder von Patient I (hemizygot) detektiert, nicht jedoch bei der gesunden Großmutter mütterlicherseits.

Es ist davon auszugehen, dass die hier beschriebene Mutation ursächlich für die Erkrankung bei Patient I (und dessen Bruder) ist.

4.4.2 Projekt B

Hypothese: Unser, ebenfalls von Philippinen stammender Patient II mit einer seit dem Kindesalter bestehenden IVIG-behandelten Immundefizienz, sowie Taubheit seit dem 2. Lebensjahr und Dystonie seit dem 19. Lebensjahr ist Träger je einer krankheitsverursachenden Mutation im *BTK*- und im *TIMM8A*-Gen oder einer großen, beide Gene betreffenden Deletions-Mutation.

Die genetische Analyse bei Patient II und seiner gesunden Mutter mittels PCR und Sanger-Sequenzierung des *BTK*- und des *TIMM8A*-Gens erbrachte bei beiden eine Wildtyp-Sequenz von *TIMM8A* und eine bereits in der Literatur beschriebene *missense*-Mutation im ersten Nukleotid des Exon 18 von *BTK* (c.1751G>A; hemizygot bei Patient II und heterozygot bei seiner Mutter; s. Abschnitt 3.2.2 und Abbildung 3.6).

Es ist davon auszugehen, dass die hier beschriebene Mutation ursächlich für das Bruton-Syndrom bei Patient II ist. Ob diese Mutation auch ursächlich für die neurodegenerative Symptomatik bei Patient II ist, lässt sich nur vermuten. Die bei Patient II beschriebene Symptomatik ähnelt jedoch sehr stark dem durch Mutationen im *TIMM8A*-Gen verursachten Mohr-Tranebjaerg-Syndrom. Da die Gene *TIMM8A* und *BTK* direkt nebeneinander auf Xq22.1 lokalisiert sind, könnte angenommen werden, dass die bei Patient II gefundene Mutation im Exon 18 von *BTK* Auswirkungen auf die Expression und/oder Translation von *TIMM8A* hat, wodurch es zu dem Krankheitsbild von Taubheit und Dystonie kommt.

4.4.3 Projekt C

Hypothese 1: Die besonders starke Ausprägung des klinischen Phänotyps beobachtet bei Patientin III ist begründet durch ein verschobenes XCI-Verhältnis hinzu einer präferentiellen Expression des mutierten Allels.

Die genetische Analyse in Vorarbeiten der Arbeitsgruppe mittels PCR und Sanger-Sequenzierung des *WDR45*-Gens erbrachte eine bereits in der Literatur beschriebene heterozygote Insertions-Mutation zwischen Exon 8 und 9 bei Patientin III (c.519_520insAGCCGTCCAGTGGACAAGG; s. Abschnitt 3.3.2.1 und Abbildung 3.9). XCI-Analyse und quantitative Echtzeit-PCR konnten anschließend zeigen, dass verstärkt das mutierte Allel exprimiert wird und weniger das Gesunde (3.3.2.2 und 3.3.2.3). Somit ist davon auszugehen, dass die bei Patientin III gefundene *WDR45*-Mutation ursächlich für ihre Erkrankung ist.

Hypothese 2: Dermale Fibroblasten unserer Patientin III mit BPAN-verursachender *WDR45*-Mutation zeigen eine gestörte mitochondriale Funktion.

Die mitochondriale Funktion der *WDR45*-mutierten dermalen Fibroblasten erfolgte mittels Messung des mitochondrialen Membranpotentials und durch immunzytochemische Färbung der Mitochondrien und anschließender Analyse der Morphologie des mitochondrialen Netzwerks durch Kalkulation des *Formfaktors*. Das mitochondriale Membranpotential *WDR45*-mutierter Fibroblasten war dabei signifikant niedriger als bei Kontrollfibroblastenzelllinien. Bei der Analyse des mitochondrialen Netzwerks zeigte sich eine erhöhte Anzahl fragmentierter Mitochondrien bei *WDR45*-mutierten Fibroblasten, quantifiziert durch einen signifikant niedrigeren Formfaktor. Diese Ergebnisse suggerieren eine eingeschränkte Funktion der Mitochondrien von *WDR45*-mutierten Fibroblasten.

4.5 Ausblick

Die drei im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Krankheitsbilder mögen zwar allesamt sehr selten sein, doch ähneln sie nicht nur in klinischer - sondern wahrscheinlich auch in zell- und molekularbiologischer Hinsicht anderen Dystonie- bzw. Parkinsonformen. Die klinischen, genetischen und molekularbiologischen Untersuchungen dieser seltenen Erkrankungen können also auch einen Beitrag zu den Entschlüsselungen von Ätiologie und zugrunde liegenden Pathomechanismen dieser deutlich häufigeren Erkrankungen leisten.

Alle drei Projekte der vorliegenden Arbeit, vor allem aber die Untersuchung des Patienten I mit ursprünglicher Verdachtsdiagnose XDP und schließlich gesichertem **MTS** durch Nachweis einer *TIMM8A*-Mutation bestätigten die Bedeutsamkeit, die genetische Tests in der klinischen Routine jetzt schon haben und in Zukunft immer mehr haben werden.

Ob die bei Patient II mit **XLA** gefundene Mutation im Bereich der Tyrosinkinasedomäne des *BTK*-Gens auch ursächlich für dessen neurodegenerative Symptomatik ist, kann anhand der vorliegenden Ergebnisse nur vermutet werden. Für eine sichere Genotyp-Phänotyp-Korrelation sollte eine Studie mit mehr IVIG-behandelten XLA Patienten - mit und ohne Neurodegeneration – durchgeführt werden. Weiterführende Experimente in humanen Zellmodellen könnten darüberhinaus mittels Genexpressionsanalysen und Immunoblots den Einfluss von Mutationen in diesem Bereich von *BTK* auf die Expression bzw. Translation von *TIMM8A* überprüfen.

Nachfolgende Untersuchungen durch die Arbeitsgruppe an *WDR45*-mutierten Fibroblasten konnten zeigen, dass einerseits eine Eisenüberladung in diesen zu Defekten der Autophagie und verminderter lysosomaler Funktion führt und andererseits die Aktivierung der Autophagie die Eisenmenge in den Zellen reduziert. Der Abbau von Eisenenthaltendem Material durch Lysosomen könnte sich folglich vorteilhaft auswirken. Weitere Studien sollten überprüfen, inwieweit die Aktivierung von Autophagie einen kausalen therapeutischen Ansatz bei **BPAN** und anderen NBIAAs darstellen könnte.

5 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit umfasst drei Projekte, welche jeweils ein seltenes X-chromosomales neurodegeneratives Krankheitsbild untersuchen.

In **Projekt A** wurde die genetische Ursache des Mohr-Tranebjaerg-Syndroms (MTS) untersucht. Charakteristische Symptome des MTS sind Taubheit mit Beginn in der frühen Kindheit und Dystonie ab dem jungen Erwachsenenalter. Ausgelöst wird das X-chromosomal-rezessive MTS durch Mutationen im *TIMM8A*-Gen. Die genetische Analyse einer philippinischen Familie mit zwei erkrankten Brüdern und gesunder Großmutter wurde mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Dabei wurde eine bislang nicht in der Literatur beschriebene Mutation im ersten Nukleotid des Startcodons von *TIMM8A* gefunden (c.1A>G; p.Met1?; jeweils bei beiden Brüdern in hemizygotem Zustand, nicht jedoch bei der gesunden Großmutter).

Projekt B befasst sich mit der genetischen Ursache der Immundefizienz Bruton-Syndrom (auch XLA, Engl.: *X-linked Agammaglobulinemia*) in Kombination mit einem dem MTS gleichenden Symptomkomplex - Taubheit im Kindesalter und Dystonie ab dem Erwachsenenalter. XLA wird verursacht durch Mutationen im *BTK*-Gen, welches direkt neben *TIMM8A* auf dem Locus Xq22.1 lokalisiert ist. Große Deletions-Mutationen, welche beide Gene betreffen, führen zu einem Krankheitsbild aus MTS und XLA. Die genetische Analyse eines XLA-Patienten mit MTS-gleichender Symptomatik und dessen gesunder Mutter erbrachte bei beiden Wildtyp-Sequenz von *TIMM8A* und eine Mutation im Exon 18 von *BTK* (c.1751G>A; bei dem Patienten hemizygot, bei seiner Mutter entsprechend heterozygot).

In **Projekt C** wurde die Beta-Propeller-assoziierte Neurodegeneration (BPAN) untersucht. BPAN äußert sich durch globale Entwicklungsverzögerung in der Kindheit und weiterer Verschlechterung im frühen Erwachsenenalter mit progressiver Dystonie, Parkinsonismus und Demenz. Verursacht wird BPAN durch Mutation im *WDR45*-Gen, von welchem angenommen wird, dass es einen Einfluss auf die mitochondriale Funktion hat. Die genetische Analyse einer Patientin mit klinischer Diagnose BPAN konnte mittels Sanger-Sequenzierung diese Diagnose validieren. Dass eine bei der Patientin gefundene, bereits in der Literatur beschriebene, heterozygote Mutation zwischen Exon 8 und 9 (c.519_520insAGCCGTCCAGTGGACAAGG) von *WDR45* tatsächlich

krankheitsverursachend bei der Patientin ist, wurde mittels Analyse der X-Chromosom-Inaktivierung und anhand einer Genexpressionsanalyse durch quantitative Echtzeit-PCR gezeigt. Im Anschluss wurde die mitochondriale Funktion von aus Hautbiopsien der Patientin gewonnenen Fibroblastenzellen analysiert. Ein vermindertes mitochondriales Membranpotential und ein verminderter Formfaktor als Ausdruck eines verstärkt fragmentierten mitochondrialen Netzwerks bei *WDR45*-mutierten Fibroblasten gegenüber Kontrollfibroblasten suggerierten eine Mitochondrienfunktionsstörung in *WDR45*-mutierten dermalen Fibroblasten.

6 Literaturverzeichnis

Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VSC, et al. Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord.* United States; 2013 Jun;28(7):863–73.

Allen RC, Zoghbi HY, Moseley AB, Rosenblatt HM, Belmont JW. Methylation of HpaII and HhaI sites near the polymorphic CAG repeat in the human androgen-receptor gene correlates with X chromosome inactivation. *Am J Hum Genet.* 1992;51(6):1229–39.

Amos-Landgraf JM, Cottle A, Plenge RM, Friez M, Schwartz CE, Longshore J, et al. X chromosome-inactivation patterns of 1,005 phenotypically unaffected females. *Am J Hum Genet.* United States; 2006 Sep;79(3):493–9.

Arber CE, Li A, Houlden H, Wray S. Review: Insights into molecular mechanisms of disease in neurodegeneration with brain iron accumulation: Unifying theories. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2016;42(3):220–41.

Armi CD, Devereaux KA, Di Paolo G. *NIH Public Access.* 2014;23(1):1–26.

Bearden D, Collett M, Quan PL, Costa-Carvalho BT, Sullivan KE. Enteroviruses in X-Linked Agammaglobulinemia: Update on Epidemiology and Therapy. *J allergy Clin Immunol Pract.* United States; 2016 Nov;4(6):1059–65.

Bittel DC, Theodoro MF, Kibiryeva N, Fischer W, Talebizadeh Z, Butler MG. Comparison of X-chromosome inactivation patterns in multiple tissues from human females. *Journal of medical genetics.* England; 2008. p. 309–13.

Bruton OC. Agammaglobulinemia. *Pediatrics.* United States; 1952 Jun;9(6):722–8.

Chen H, Chan DC. Mitochondrial dynamics-fusion, fission, movement, and mitophagy-in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet.* 2009;18(R2):169–76.

Conley ME, Howard V. Clinical findings leading to the diagnosis of X-linked agammaglobulinemia. *J Pediatr. United States;* 2002 Oct;141(4):566–71.

Domingo A, Schmidt TGPM, Barcelon E, Lukban M, Westenberger A, Klein C. X-linked agammaglobulinemia with hearing impairment, dystonia-parkinsonism, and progressive neurodegeneration. *J Neurol.* 2014;261(11):2225–7.

Domingo A, Westenberger A, Lee L V, Brænne I, Liu T, Vater I, et al. New insights into the genetics of X-linked dystonia-parkinsonism (XDP, DYT3). *Eur J Hum Genet.* 2015;23(10):1334–40.

Engl G, Florian S, Tranebjærg L, Mayer TU, Rapaport D. Alterations in expression levels of deafness dystonia protein 1 affect mitochondrial morphology. *Hum Mol Genet.* 2012;21(2): 287-299

ExAC: <http://exac.broadinstitute.org>; The Exome Aggregation Consortium (ExAC): Lek M, Karczewski KJ, Minikel E V., Samocha KE, Banks E, Fennell T, et al. Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature.* 2016;536(7616):285–91.

Gregory A, Hayflick S. Neurodegeneration with Brain Iron Accumulation Disorders Overview. 2013 Feb 28 [Updated 2014 Apr 24]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK121988/>. Tag des Zugriffs: 24.05.2017.

Gregory A, Kurian MA, Haack T, et al. Beta-Propeller Protein-Associated Neurodegeneration. 2017 Feb 16. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-

2017. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK424403/>. Tag des Zugriffs: 24.05.2017.

Grünewald A, Voges L, Rakovic A, Kasten M, Vandebona H, Hemmelmann C, et al. Mutant parkin impairs mitochondrial function and morphology in human fibroblasts. *PLoS One*. 2010;5(9).

Ha AD, Parratt KL, Rendtorff ND, Lodahl M, Ng K, Rowe DB, et al. The phenotypic spectrum of dystonia in Mohr-Tranebjaerg syndrome. *Mov Disord*. United States; 2012 Jul;27(8):1034–40.

Haack TB, Hogarth P, Kruer MC, Gregory A, Wieland T, Schwarzmayr T, et al. Exome sequencing reveals de novo WDR45 mutations causing a phenotypically distinct, X-linked dominant form of NBIA. *Am J Hum Genet*. 2012;91:1144–9.

Hailey DW, Kim PK, Satpute-Krishnan P, Rambold AS, Sougrat R, Lippincott-schwartz J. During Starvation. 2011;141(4):656–67.

Hayflick SJ, Kruer MC, Gregory A, Haack TB, Kurian MA, Houlden HH, et al. Beta-propeller protein-associated neurodegeneration: A new X-linked dominant disorder with brain iron accumulation. *Brain*. 2013;136:1708–17.

Howard V, Greene JM, Pahwa S, Winkelstein JA, Boyle JM, Kocak M, et al. The health status and quality of life of adults with X-linked agammaglobulinemia. *Clin Immunol*. United States; 2006;118(2-3):201–8.

Ichinose Y, Miwa M, Onohara A, Obi K, Shindo K, Saito H, et al. Characteristic MRI findings in beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN). *Neurol Clin Pract*. 2014;4(2):175–7.

Jiang P, Mizushima N. Autophagy and human diseases Table 2. Autophagy-modulating compounds in clinical trials. *Nature*. 2013;24(1):69–79.

Jin H, May M, Tranebjaerg L, Kendall E, Fontan G, Jackson J, et al. A novel X-linked gene, DDP, shows mutations in families with deafness (DFN-1), dystonia, mental deficiency and blindness. *Nat Genet*. United States; 1996 Oct;14(2):177–80.

Kawarai T, Pasco PMD, Teleg RA, Kamada M, Sakai W, Shimozono K, et al. Application of long-range polymerase chain reaction in the diagnosis of X-linked dystonia-parkinsonism. *Neurogenetics*. United States; 2013. p. 167–9.

Kitada T, Asakawa S, Hattori N, Matsumine H, Yamamura Y, Minoshima S, et al. Mutations in the parkin gene cause autosomal recessive juvenile parkinsonism. *Nature*. England; 1998 Apr;392(6676):605–8.

Koehler CM, Leuenberger D, Merchant S, Renold a, Junne T, Schatz G. Human deafness dystonia syndrome is a mitochondrial disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 1999;96(5):2141–6.

Available from:

<http://eutils.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/eutils/elink.fcgi?dbfrom=pubmed&id=10051608&retmode=ref&cmd=prlinks\papers2://publication/uuid/C61B2B95-EF81-442E-AEF3-8B732311F2E6>. Tag des Zugriffs: 18.05.2017.

Lee L V, Rivera C, Teleg R a, Dantes MB, Pasco PMD, Jamora RDG, et al. The unique phenomenology of sex-linked dystonia parkinsonism (XDP, DYT3, “Lubag”). *Int J Neurosci*. 2011;121 Suppl (June 2010):3–11.

Lu Q, Yang P, Huang X, Hu W, Guo B, Wu F, et al. The WD40 repeat PtdIns(3)P-binding protein EPG-6 regulates progression of omegasomes to autophagosomes. *Dev Cell*. United States; 2011 Aug;21(2):343–57.

Makino S, Kaji R, Ando S, Tomizawa M, Yasuno K, Goto S, et al. Reduced neuron-specific expression of the TAF1 gene is associated with X-linked dystonia-parkinsonism. *Am J Hum Genet.* United States; 2007 Mar;80(3):393–406.

Menzies FM, Moreau K, Rubinsztein DC. Protein misfolding disorders and macroautophagy. *Curr Opin Cell Biol.* England; 2011 Apr;23(2):190–7.

Mohr J, Mageroy K. Sex-linked deafness of a possibly new type. *Acta Genet Stat Med.* Switzerland; 1960;10:54–62.

Mortiboys H, Thomas KJ, Koopman WJH, Klaffke S, Abou-Sleiman P, Olpin S, et al. Mitochondrial function and morphology are impaired in parkin-mutant fibroblasts. *Ann Neurol.* United States; 2008;64(5):555–65.

Mutationtaster: <http://mutationtaster.org>; Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods.* 2014;11(4):361-2.

Narendra D, Tanaka A, Suen D-F, Youle RJ. Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J Cell Biol.* United States; 2008;183(5):795–803.

Nemeth AH, Nolte D, Dunne E, Niemann S, Kostrzewa M, Peters U, et al. Refined linkage disequilibrium and physical mapping of the gene locus for X-linked dystonia-parkinsonism (DYT3). *Genomics.* United States; 1999;60(3):320–9.

Nishioka K, Oyama G, Yoshino H, Li Y, Matsushima T, Takeuchi C, et al. High frequency of beta-propeller protein-associated neurodegeneration (BPAN) among patients with intellectual disability and young-onset parkinsonism. *Neurobiol Aging.* 2015;36(5):2004.e9–2004.e15.

Nixon RA. The role of autophagy in neurodegenerative disease. *Nature*. 2013;19(8):983–97.

OMIM: Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM[®]. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD),. Available from: <https://omim.org/>. Tag des Zugriffs: 31.10.2017.

Orphanet: an online databaase of rare diseases and orphan drugs. Copyright, INSERM 1997. Available from: <http://orpha.net>. Tag des Zugriffs: 31.10.2017.

Papapetropoulos S, Friedman J, Blackstone C, Kleiner GI, Bowen BC, Singer C. A progressive, fatal dystonia-Parkinsonism syndrome in a patient with primary immunodeficiency receiving chronic IVIG therapy. *Mov Disord*. 2007;22(11):1664–6.

Penamora-Destriza JM, Domingo A, Schmidt TGPM, Westenberger A, Klein C, Rosales R. First Report of a Filipino with Mohr-Tranebjaerg Syndrome. *Mov Disord Clin Pract* . 2015;2(4):417–9.

Przedborski S, Vila M, Jackson-Lewis V. Neurodegeneration: what is it and where are we? *J Clin Invest*. United States; 2003 Jan;111(1):3–10.

Rakovic A, Grünewald A, Seibler P, Ramirez A, Kock N, Orolicki S, et al. Effect of endogenous mutant and wild-type PINK1 on Parkin in fibroblasts from Parkinson disease patients. *Hum Mol Genet*. 2010;19(16):3124–37.

Richter D, Conley ME, Rohrer J, Myers LA, Zahradka K, Kelecic J, et al. A contiguous deletion syndrome of X-linked agammaglobulinemia and sensorineural deafness. *Pediatr Allergy Immunol*. England; 2001 Apr;12(2):107–11.

Roesch K, Hynds PJ, Varga R, Tranebjaerg L, Koehler CM. The calcium-binding aspartate/glutamate carriers, citrin and aralar1, are new substrates for the DDP1/TIMM8a-TIMM13 complex. *Hum Mol Genet.* 2004;13(18):2101–11.

Rohkamm R. Neurodegeneration. Taschenatlas Neurologie. 3rd ed. Thieme; 2008. p. 68.

Rothbauer U, Hofmann S, Mühlenbein N, Paschen S a., Gerbitz KD, Neupert W, et al. Role of the Deafness Dystonia Peptide 1 (DDP1) in Import of Human Tim23 into the Inner Membrane of Mitochondria. *J Biol Chem.* 2001;276(40):37327–34.

Rouault TA. Iron metabolism in the CNS: implications for neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* England; 2013 Aug;14(8):551–64.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science.* United States; 1985 Dec;230(4732):1350–4.

Saitsu H, Nishimura T, Muramatsu K, Kodera H, Kumada S, Sugai K, et al. De novo mutations in the autophagy gene WDR45 cause static encephalopathy of childhood with neurodegeneration in adulthood. *Nat Genet [Internet].* Nature Publishing Group; 2013;45(4):445–9, 449e1.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* UNITED STATES; 1977 Dec;74(12):5463–7.

Eingereicht: Seibler P, Burbulla LF, Zittel S, Dulovic M, Heine J, Schmidt TGPM, Rudolph F, Westenberger A, Rakovic A, Münchau A, Krainc D, Klein C. Iron overload is accompanied by distinct pathological phenotypes in WDR45 mutant patient fibroblasts. *Brain.* 2018.

Šedivá A, Smith CIE, Asplund a. C, Hadač J, Janda A, Zeman J, et al. Contiguous X-chromosome deletion syndrome encompassing the BTK, TIMM8A, TAF7L, and DRP2 genes. *J Clin Immunol.* 2007;27:640–6.

Shaker M, Lorigiano TH, Vadlamudi A. Xq22.1 contiguous gene deletion syndrome of X-linked agammaglobulinemia and Mohr-Tranebjaerg syndrome. *Ann Allergy Asthma Immunol.* United States; 2016 Jun;116(6):578–9.

Shiroma N, Omi T, Hasegawa H, Nagashima K, Ohta T. A case of X-linked agammaglobulinemia with progressive encephalitis. *Pediatr Neurol.* United States; 2004 Nov;31(5):371–3.

Smith CIE, Berglöf A. X-Linked Agammaglobulinemia. 2001 Apr 5 [Updated 2016 Aug 4]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. *GeneReviews®* [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1453/>. Tag des Zugriffs: 28.05.2017.

Tanner CM. Epidemiology of Parkinson's disease. *Neurol Clin.* United States; 1992 May;10(2):317–29.

Toth B, Volokha A, Mihas A, Pac M, Bernatowska E, Kondratenko I, et al. Genetic and demographic features of X-linked agammaglobulinemia in Eastern and Central Europe: a cohort study. *Mol Immunol.* England; 2009 Jun;46(10):2140–6.

Tranebjaerg L, Jensen PK, Van Ghelue M, Vnencak-Jones CL, Sund S, Elgjo K, et al. Neuronal cell death in the visual cortex is a prominent feature of the X-linked recessive mitochondrial deafness-dystonia syndrome caused by mutations in the TIMM8a gene. *Ophthalmic Genet.* England; 2001 Dec;22(4):207–23.

Tranebjaerg L, Schwartz C, Eriksen H, Andreasson S, Ponjavic V, Dahl A, et al. A new X linked recessive deafness syndrome with blindness, dystonia, fractures, and mental deficiency is linked to Xq22. *J Med Genet.* England; 1995 Apr;32(4):257–63.

Tranebjærg L. Deafness-Dystonia-Optic Neuronopathy Syndrome. 2003 Feb 6 [Updated 2013 Jan 31]. In: Pagon RA, Adam MP, Ardinger HH, et al., editors. GeneReviews® [Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle; 1993-2016. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1216/>. Tag des Zugriffs: 25.05.2017.

Tranebjaerg L, Lou H, Andresen J. New X-linked syndrome with apraxia, ataxia, and mental deficiency: clinical, cytogenetic and neuropsychological studies in two Danish families. *Am J Med Genet.* United States; 1992 Apr;43(1-2):498–504.

Tranebjaerg L. Mitochondrial diseases caused by mutations in inner membrane chaperone proteins. In: Wong LJC, editor. *Mitochondrial Disorders Caused by Nuclear Genes.* New York, NY: Springer; 2012. p. 337–66.

Ujike H, Tanabe Y, Takehisa Y, Hayabara T, Kuroda S. A family with X-linked dystonia-deafness syndrome with a novel mutation of the DDP gene. *Arch Neurol.* United States; 2001 Jun;58(6):1004–7. 56. Valente EM, Abou-Sleiman PM, Caputo V, Muqit MMK, Harvey K, Gispert S, et al. Hereditary early-onset Parkinson's disease caused by mutations in PINK1. *Science.* United States; 2004 May;304(5674):1158–60.

UniProt: Bateman A, Martin MJ, O'Donovan C, Magrane M, Alpi E, Antunes R, et al. UniProt: The universal protein knowledgebase. *Nucleic Acids Res.* 2017;45(D1):D158–69.

UCSC (University of California Santa Cruz) Genome Browser: <http://genome.ucsc.edu/>. Veröffentlichung des relevanten, *TIMM8* und *BTK* beinhaltenden Gen-Abschnitts (GRCh38/hg38): Dezember 2013. Tag des letzten Zugriffs: 26.03.2018.

UCSC Genome Browser: Kent WJ, Sugnet CW, Furey TS, Roskin KM, Pringle TH, Zahler AM, Haussler D. The human genome browser at UCSC. *Genome Res.* 2002 Jun;12(6):996-1006.

Velickovic M, Prasad ML, Weston S a, Benson EM. Identification of the bruton tyrosine kinase (BTK) gene mutations in 20 Australian families with X-linked agammaglobulinemia (XLA). *Hum Mutat.* 2004;23(April 2003):398–9.

Vihinen M, Kwan SP, Lester T, Ochs HD, Resnick I, Valiaho J, et al. Mutations of the human BTK gene coding for bruton tyrosine kinase in X-linked agammaglobulinemia. *Hum Mutat.* United States; 1999;13(4):280–5.

Wilfert CM, Buckley RH, Mohanakumar T, Griffith JF, Katz SL, Whisnant JK, et al. Persistent and fatal central-nervous-system ECHOvirus infections in patients with agammaglobulinemia. *N Engl J Med.* United States; 1977 Jun;296(26):1485–9.

Winkelstein J a, Marino MC, Lederman HM, Jones SM, Sullivan K, Burks a W, et al. X-linked agammaglobulinemia: report on a United States registry of 201 patients. *Medicine (Baltimore).* 2006;85(4):193–202.

Yang EJ, Yoon J-H, Chung KC. Bruton's tyrosine kinase phosphorylates cAMP-responsive element-binding protein at serine 133 during neuronal differentiation in immortalized hippocampal progenitor cells. *J Biol Chem.* 2004 Jan;279(3):1827–37.

Yang W, Desiderio S. BAP-135, a target for Bruton's tyrosine kinase in response to B cell receptor engagement. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1997;94(2):604–9.

Youle RJ, Narendra DP. Mechanisms of mitophagy. *Nat Rev Mol Cell Biol.* England; 2011 Jan;12(1):9–14.

Youle RJ, van der Blik AM. Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science*. United States; 2012 Aug;337(6098):1062–5.

Zarate Y a, Jones JR, Jones M a, Millan F, Juusola J, Vertino-Bell A, et al. Lessons from a pair of siblings with BPAN. *Eur J Hum Genet*. 2016;24(7):1080–3.

Ziegner UHM, Kobayashi RH, Cunningham-Rundles C, Espanol T, Fasth A, Huttenlocher A, et al. Progressive neurodegeneration in patients with primary immunodeficiency disease on IVIG treatment. *Clin Immunol*. United States; 2002 Jan;102(1):19–24.

7 Anhang

7.1 Verwendete *Primer*

Tabelle 7 *Primer* der Restriktionsstelle im Androgenrezeptor-Gen für den XCI-Assay

Gen	Vorwärts- <i>Primer</i> (F)/Rückwärts- <i>Primer</i> (R)	Annealing-Temperatur [°C]
<i>AR</i>	F: FAM-CGGGCCCCAGGCACCCAGA R: FAM-GCTGTGAAGGTTGCTGTTCCAT	60

Tabelle 8 *Primer* für *TIMM8A*

Exon	Vorwärts- <i>Primer</i> (F)/Rückwärts- <i>Primer</i> (R)	Annealing-Temperatur [°C]
1	F: TGTGGTTCCGGTCCGTCG R: CCGACGTTGTCGCGAGTCC	62
2	F: TGGTCAGCTGCCAAATGTGAAC R: GAGCCAATCCTCTCATAGCTG	60

Tabelle 9 *Primer* für *BTK*

Exon	Vorwärts- <i>Primer</i> (F)/Rückwärts- <i>Primer</i> (R)	Annealing-Temperatur [°C]
1	Exon 1 wird nicht transkribiert.	
2-3	F: GCTAGGCTGAGGGGAACCA R: CCACGTTGCACAGCATCACCA	62
4	F: TCTGAAGCCACAGCAAAGGCT R: GCCTTCCCTCTGCCCTGCA	61
5	F: CCCTAAGATTAGTACTTTCAAG R: TGATGGAATACTAAGCTCAATTGT	55

6-7	F: TGCAAATGGTGGCTTCTCCTCC R: AACTGCCAAGTCCCAGGGTA	62
8-9	F: AGCCAGAGAGTTGGGAGAGA R: AGAGAGAGAGAGTTCCTCCTG	59
9-10	F: TGTCTCCTGGAGGCTGGGGA R: AGGGGGCAGAACAGGCCCT	63
11-12	F: GGGATGCAGGTGTGAGCACC R: ACCTCTTTACCAGCTTCTACCCA	62
13-14	F: TGTGTGAGGCATCCCACCTC R: TCAGTCCCTCGTCCCAAACCT	61
14-15	F: TGACCCCAAAGAATCACACCA R: CCACTGCTACTTCCACCCCA	59
16-17	F: GTCAGCAGAAGCTTTGTGCCTT R: TCTGTGGAGGTTGCAAAGTGTG	60
17-18	F: TGTGACACTCTTGTGACCGTGC R: TTGGTGGCTGAATGGCCAGC	62
19	F: GCTGCTTACTCATTGCATTTCCC R: AGCACAAAGGCTCCAGGGCT	61

Tabelle 10 *Primer für cDNA BTK*

Exon	Vorwärts-Primer (F)/Rückwärts-Primer (R)	Annealing-Temperatur [°C]
9-19	F: CTAGTAACTATGTCACTGAAGC R: CTA CT TCTCTTCTCCACAAG	56
14-19	F: GACAATTTGGGGTAGTGAAG R: CTA CT TCTCTTCTCCACAAG	55

Tabelle 11 *Primer* für den XDP-spezifischen Haplotyp

Der bislang nur bei XDP-Patienten beschriebene und somit „XDP-spezifische Haplotyp“ besteht aus fünf „disease-specific single-nucleotide changes (DSC), einer Deletion von 48 Basenpaaren (48bp-del) und einer 2627-bp SVA (SINE-VNTR Alu Element, *Short interspersed nuclear element, Variable number of tandem repeats, and Alu composite*) Retrotransposon Insertion, welche sich alle in intronischen oder extragenischen, nicht kodierenden Regionen des Genoms im Bereich des *TAF1*-Gens befinden (Domingo et al., 2015; Nolte et al., 2003; Makino et al., 2007).

Exon	Vorwärts-Primer (F)/Rückwärts-Primer (R)	Annealing-Temperatur [°C]
DSC1	F: GTTCAGAGAGTCAAGCATGG R: TCTCCAAGTCCCCACTCAAC	60
DSC2	F: CCAACCTTACCTGTTTCCTC R: GCAGGTCATGTTCTAATTC	58
DSC3	F: GAAGTGAAGATGCAAGTCTC R: GGAGTTCTGCCAGATGAG	56
DSC10	F: AGTGTCTTAAGGATTCAATG R: GGATGTTGCACATTCTCAAC	56
DSC12	F: TTCTTCCCGTGGCACTGATC R: TACTCACTCTGTGTGGCCTC	55
48bp-del*	F: AGCCAAGATCCCGACACTAC R: TCCTCATGGCCAATCAAAAGTG	59
SVA-ins**	F: GTTCCATTGTGTGGTTGTACCAGCGTTTGTTC R: CACATGAAAAGATGCCCAACATCATTAGCCATTAG	

* +10% Betain

** Aufgrund der Länge der SVA-Insertion (2627bp), können hier nicht die Standard PCR-Bedingungen angewendet werden. Die Amplifizierung der SVA-Insertion erfolgte nach dem Step-down Protokoll von Kawarai et al. (Kawarai et al., 2013).

Tabelle 12 *Primer* für Allelspezifische RT-PCR: *WDR45*

cDNA-Level Exon 8-9	Vorwärts- <i>Primer</i> (F)/Rückwärts- <i>Primer</i> (R)	<i>Annealing</i> - Temperatur [°C]
unspezifisch	F: CCAGCCTGGAGAAGCAAC R: GCTCCACCAGTTTCTCCTTG	60
Wildtyp-spez	F: TGGGAGTCTGCAACTTGAGG R: CAGAGGAAGGAGGAGTCGTG	58
mut-spez	F: TGGGAGTCTGCAACTTGAGA R: CAGAGGAAGGAGGAGTCGTG	58

8 Poster und Publikationen

Alle Ergebnisse der vorliegenden Arbeit wurden bereits oder werden derzeit veröffentlicht.

- Publikationen
- Domingo A, **Schmidt TGPM**, Barcelon E, Lukban M, Westenberger A, Klein C. X-linked agammaglobulinemia with hearing impairment, dystonia-parkinsonism, and progressive neurodegeneration. *J Neurol.* 2014; 261(11):2225–7.
 - Penamora-Destriza JM, Domingo A, **Schmidt TGPM**, Westenberger A, Klein C, Rosales R. First Report of a Filipino with Mohr-Tranebjaerg Syndrome. *Mov Disord Clin Pract.* 2015; 2:417–419.
 - *Eingereicht:* Seibler P, Burbulla LF, Zittel S, Dulovic M, Heine J, **Schmidt TGPM**, Rudolph F, Westenberger A, Rakovic A, Münchau A, Krainc D, Klein C. Iron overload is accompanied by distinct pathological phenotypes in WDR45 mutant patient fibroblasts. *Brain.* 2018.

- Poster
- **Schmidt TGPM**, Domingo A, Barcelon E, Lukban M, Westenberger A, Klein C. X-linked agammaglobulinemia with hearing impairment, dystonia-parkinsonism, and progressive neurodegeneration. 87. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie, München, 2014.

- Nicht doktorarbeitsrelevante Publikation:*
- Domingo A, Westenberger A, Lee LV, Brænne I, Liu T, Vater I, Rosales R, Jamora RD, Pasco PM, Cutiongco-dela Paz EM, Freimann K, **Schmidt TGPM**, Dressler D, Kaiser FJ, Bertram L, Erdmann J, Lohmann K, Klein C. New insights into the genetics of X-linked dystonia-parkinsonism (XDP, DYT3). *Eur J Hum Genet.* 2015; 23(10):1334–40.

9 Danksagung

Sehr herzlich danke ich Frau Professor Christine Klein für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit, für die Möglichkeit, eine Dissertation an ihrem Institut anfertigen zu können und die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Mein größter Dank gilt Frau PD Dr. Ana Westenberger für die intensive Betreuung, die Einarbeitung und die kritische Durchsicht dieses Manuskripts.

Schließlich möchte ich allen Mitarbeitern des Instituts für Neurogenetik danken. Das angenehme und produktive Arbeitsklima, die freundliche Unterstützung und tolle Zusammenarbeit haben sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen. Hervorheben möchte ich insbesondere Dr. Aloysius Domingo und Dr. Philip Seibler.

10 Eidesstattliche Erklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig und ohne fremde Hilfe angefertigt habe sowie keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel verwendet habe.

Ferner erkläre ich, dass ich weder vor, noch gleichzeitig andernorts einen Zulassungsantrag gestellt oder diese Dissertation vorgelegt habe. Ich habe mich bislang noch keinem Promotionsverfahren unterzogen.

Berlin, den 17.11.2018

Thomas Schmidt