

**Aus dem Institut für Neurogenetik
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. Christine Klein**

**Suche nach genetischen Ursachen bei Dystonien
ausgehend von Exom-Sequenzierungs-Datensätzen**

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
- Aus der Sektion Medizin -
vorgelegt von
Sofia Steinrücke
aus Warstein

Lübeck 2019

1. Berichterstatterin/Berichterstatter: Prof. Dr. Katja Lohmann

2. Berichterstatterin/Berichterstatter:

Tag der mündlichen Prüfung:

Zum Druck genehmigt. Lübeck, den

Promotionskommission der Sektion Medizin

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	<i>Next Generation Sequencing</i>	1
1.1.1	Sanger-Sequenzierung und <i>Next Generation Sequencing</i>	2
1.1.2	Chancen und Grenzen des <i>Next Generation Sequencings</i>	3
1.1.3	Exom-Sequenzierung.....	4
1.1.4	Dateninterpretation – die große Herausforderung des <i>Next Generation Sequencings</i> ..	6
1.1.5	<i>Next Generation Sequencing</i> in der praktischen Anwendung: klinischer Kontext und ethische Aspekte.....	8
1.2	Klinik und Genetik der Dystonien	9
1.2.1	Klinische Kennzeichen	9
1.2.2	Einteilung anhand der Konsensus-Klassifikation.....	10
1.2.3	Alkohol-responsive Dystonien.....	12
1.2.4	Komplexe Dystonien.....	16
1.3	Vorarbeiten der Arbeitsgruppe.....	16
1.4	Fragestellungen.....	17
2	Material, Methoden und Patienten.....	18
2.1	Material.....	18
2.1.1	Chemikalien	18
2.1.2	Stammlösungen und Medien	20
2.1.3	Kits	21
2.1.4	Antikörper und Vektoren	21
2.1.5	Zellen	21
2.1.6	Geräte.....	22
2.1.7	Programme	23
2.1.8	Websites	23
2.2	Patienten und Kontrollen.....	24
2.3	Methoden	26
2.3.1	Computer-gestützte Methoden	26
2.3.2	Molekulargenetische Methoden	31
2.3.3	Expressionsanalyse.....	36
2.3.4	Immunfärbung.....	38
2.3.5	<i>GNB1</i> -Mutagenese, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation und Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer-Assay.....	49
3	Ergebnisse.....	53

3.1	Ergebnisse der Ursachenforschung bei Alkohol-responsiven Dystonien	53
3.1.1	Ausschluss von Mutationen in den Genen <i>SGCE</i> und <i>TUBB4A</i>	53
3.1.2	Filterung der kombinierten Exom-Datensätze von Patienten mit Alkohol-responsiver Dystonie	55
3.1.3	Validierung der Varianten per Sanger-Sequenzierung.....	59
3.1.4	<i>In silico</i> -Betrachtung: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in den Kandidatengenomen	59
3.1.5	Überprüfung von Kontrollprobanden und Screening weiterer Patienten auf Varianten in den Genen <i>MBTPS1</i> und <i>PRKCQ</i>	61
3.1.6	Zweite Filterung unter Einschluss der Exom-Daten eines Patienten mit <i>SGCE</i> -Variante unklarer Signifikanz.....	63
3.1.7	Validierung der zusätzlichen Varianten und Kontrollen.....	65
3.1.8	Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in den zusätzlichen Kandidatengenomen	65
3.1.9	Screening weiterer Patienten auf Varianten in den zusätzlichen Kandidatengenomen	65
3.2	Ergebnisse der Untersuchung der genetischen Krankheitsursache bei zwei jungen Patienten mit Dystonieerkrankungen	68
3.2.1	Ergebnisse der Untersuchung der genetischen Krankheitsursache bei einer jungen Patientin mit komplexer generalisierter Dystonie.....	68
3.2.2	Ergebnisse der Erforschung der genetischen Krankheitsursache bei einem jungen Patienten mit isolierter generalisierter Dystonie	77
4	Diskussion	82
4.1	<i>MAP2K2</i> , <i>MBTPS1</i> , <i>PRKCQ</i> und <i>SNAP91</i> als mögliche Kandidatengene in der Pathogenese von Alkohol-responsiven Dystonien.....	82
4.2	Trio-Exom-Sequenzierung als wirkungsvoller Ansatz zur Identifizierung von genetischen Ursachen bei Dystonien.....	91
4.2.1	<i>GNB1</i> -Mutation als Krankheitsursache bei einer Patientin mit generalisierter Dystonie und Intelligenzminderung.....	91
4.2.2	<i>TBC1D9B</i> als potenzielles Krankheitsgen bei einem jungen Patienten mit isolierter generalisierter Dystonie.....	96
5	Zusammenfassung.....	102
6	Literaturverzeichnis	104
7	Anhang.....	116
7.1	Primerliste	116
7.1.1	Projekt: Alkohol-responsive Dystonie	116
7.1.2	Projekt: Trio-Exom-Ansatz Familie 1	120
7.1.3	Projekt: Trio-Exom-Ansatz Familie 2	122
7.2	Sequenz des Venus-Plasmids	123
7.3	Übereinstimmungen mit der Sequenz des Alkohol-responsiven Elements	123

7.4	Votum der Ethikkommission.....	130
8	Danksagungen	131
9	Lebenslauf.....	132

1 Einleitung

Im Rahmen der vorliegenden Promotionsarbeit sollten die genetischen Ursachen bei ausgewählten Patienten mit Dystonie-Erkrankungen erforscht werden. Ausgangspunkt für die Untersuchungen waren Exom-Datensätze, die mittels des Verfahrens des *Next Generation Sequencings* gewonnen wurden. Im Folgenden werde ich Chancen, Herausforderungen und Grenzen des *Next Generation Sequencings* näher erläutern sowie einen Überblick über die Klinik und Genetik der Dystonien geben.

1.1 *Next Generation Sequencing*

Seit jeher ist die medizinische Forschung daran interessiert herauszufinden, wodurch Krankheiten verursacht und beeinflusst werden, um mit diesem Wissen möglichst zur Therapie der Betroffenen beizutragen. Die rasante Entwicklung verschiedener biomedizinischer Verfahren und Technologien in den letzten Jahren und Jahrzehnten nährt nun die Hoffnung, dass es zukünftig möglich sein wird, die genetischen Faktoren in der Entstehung (nahezu) aller Erkrankungen zu entschlüsseln. Damit wächst auch der Traum, den Patienten eine Präzisions-Medizin anbieten zu können, die nicht nur zur Symptomlinderung einer Erkrankung dient, sondern direkt an der zugrundeliegenden Ursache angreift.

Als Frederick Sanger vor über 40 Jahren das „Kettenabbruchverfahren“ zur Sequenzierung von Nukleotidsequenzen erfand und der Wissenschaftswelt präsentierte (Sanger et al. 1977), stellte dies einen großen Fortschritt in der genetischen Forschung dar. Allerdings brauchte es noch einige Jahrzehnte bis mithilfe dieser Technik das erste menschliche Genom komplett entschlüsselt werden konnte. Das „Human Genome Project“ nahm 13 Jahre (1990 - 2003) in Anspruch, über 20 Forschungsinstitute weltweit waren daran beteiligt und die Kosten beliefen sich auf etwa 2,7 Milliarden US-Dollar (Majewski et al. 2011; Petersen et al. 2017).

Der dringende Bedarf für eine Verbesserung der DNA-Sequenzierungsverfahren führte schließlich zur Entwicklung des sogenannten „*Next Generation Sequencings*“ (NGS) und damit zu einer weiteren technischen Revolution. Ab 2005 wurden die ersten kommerziellen NGS-Geräte auf den Markt gebracht und mittlerweile gibt es mehrere konkurrierende Firmen, die diese Instrumente zum Kauf anbieten (Voelkerding et al. 2009; Slatko et al. 2018). In den folgenden Jahren erlaubten die sinkenden Kosten eine breitere Verfügbarkeit und die zunehmende Anwendung dieser neuen Technologie in verschiedenen Forschungseinrichtungen und der klinischen Diagnostik. Damit ist es nun möglich, ein komplettes menschliches Genom innerhalb von weniger als 24 Stunden zu sequenzieren (Clark et al. 2019). Gleichzeitig hat sich der Preis für eine Genom-Sequenzierung

drastisch reduziert und hat im Jahr 2019 einen Tiefstwert von etwa 600 US-Dollar erreicht (Abb. 1) (Wetterstrand 2019).

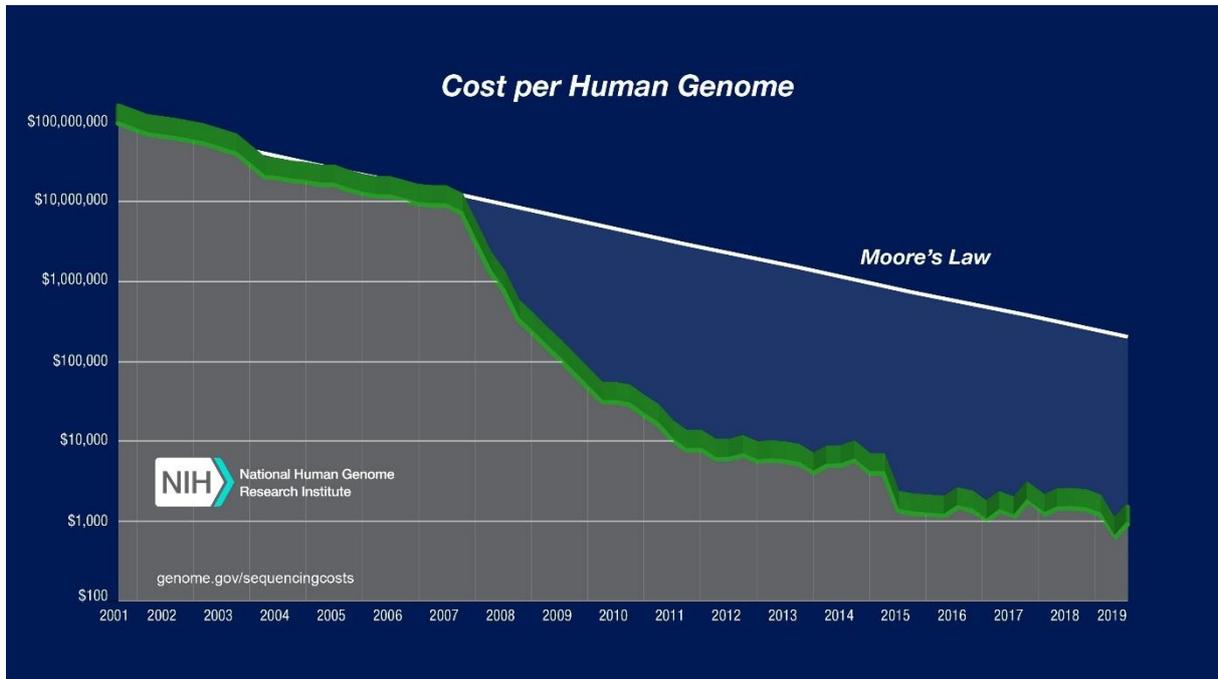


Abbildung 1: Entwicklung der Kosten zur Sequenzierung eines menschlichen Genoms in den Jahren 2001-2019. Die grüne Linie stellt die reale Kostenentwicklung für die Sequenzierung eines menschlichen Genoms dar. Die weiße Linie hingegen entspricht hypothetischen Daten zur Entwicklung der Sequenzierungskosten basierend auf „Moore’s Law“, welches einen Langzeittrend in der Computer-Hardware-Industrie beschreibt und die Verdopplung der Rechenleistung alle zwei Jahre berücksichtigt. Die Kosten (y-Achse) sind logarithmisch aufgetragen. Ab Januar 2008 weicht die reale Entwicklung deutlich von dem errechneten Modell ab – dieser Zeitpunkt repräsentiert die Umstellung in der Technologie der DNA-Sequenzierung von der Sanger-Methode und Kapillar-basierten Instrumenten auf das *Next Generation Sequencing* (aus Wetterstrand 2019, verfügbar unter www.genome.gov/sequencingcostsdata (letzter Zugriff: 18.11.2019)).

1.1.1 Sanger-Sequenzierung und *Next Generation Sequencing*

Die klassische Sanger-Methode zur DNA-Sequenzierung basiert auf sich wiederholenden Zyklen aus *Template*-Denaturierung, *Primer*-Anlagerung und *Primer*-Verlängerung. Als *Template* dienen dabei meist die in einer PCR vervielfältigten Kopien eines interessierenden Genbereichs, z.B. eines Exons. Durch zufälligen Einbau von im Reaktionsansatz ebenfalls enthaltenen Fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden (ddNTPs) anstatt normaler Desoxynukleotide (dNTPs) während der Kettenverlängerung kommt es zum Syntheseabbruch. Dadurch entsteht ein Pool aus verschiedenen langen DNA-Fragmenten. Nach Auftrennung der Fragmente ihrer Länge entsprechend in einer Kapillar-Elektrophorese, werden die jeweils endständigen ddNTPs durch einen Laser zur Emission eines definierten Lichtspektrums angeregt. Die Detektion dieser Lichtsignale ermöglicht schließlich die Ermittlung der Nukleotidsequenz (Shendure und Ji 2008). Pro Reaktionsansatz ist die herkömmliche Sanger-Sequenzierung auf ein DNA-Fragment und eine maximale Länge von etwa 1000 bp beschränkt (Petersen et al. 2017).

Beim *Next Generation Sequencing* unterscheiden sich die Technologien verschiedener Anbieter u.a. hinsichtlich der verwendeten Chemikalien, der Probenaufbereitung, der eigentlichen Sequenzreaktion und der Datenanalyse (Olgianti et al. 2016). Gemeinsame Merkmale der verschiedenen Ansätze sind die massive Parallelisierung der Sequenzierung und dass die Detektion der Basenabfolge bereits während der Synthese der DNA-Stränge stattfindet. Da diese Dissertation nicht den Raum bietet, alle Verfahren im Detail vorzustellen, sei hier auf die genauere Beschreibung in einschlägigen Reviews verwiesen (Shendure und Ji 2008; Voelkerding et al. 2009; Metzker 2010; Slatko et al. 2018). Grob zusammengefasst lässt sich der Ablauf des NGS folgendermaßen darstellen: Am Beginn steht die zufällige mechanische oder enzymatische Fragmentierung hoch-molekularer (z.B. menschlicher genomischer) DNA. Will man nicht das ganze Genom, sondern nur bestimmte interessierende Bereiche sequenzieren, müssen diese Regionen zunächst angereichert werden (z.B. durch Hybridisierung oder eine PCR-Reaktion). An beide Enden der erhaltenen Fragmente werden dann Adapter-Sequenzen ligiert. Darauf folgt die klonale Amplifikation z.B. mittels Emulsions-PCR und anschließend die Übertragung der Amplikons auf einen Chip. Während des eigentlichen Sequenzier-Prozesses erfolgt pro Zyklus der enzymatische Einbau jeweils eines (Oligo-) Nukleotids, welcher entweder durch eine Fluoreszenzreaktion oder die Freisetzung eines Protons und die damit verbundene pH-Veränderung erfasst werden kann. Somit erfolgt die Sequenzierung schon während der Synthesereaktion (Shendure und Ji 2008; Lohmann und Klein 2014; Olgianti et al. 2016).

1.1.2 Chancen und Grenzen des *Next Generation Sequencings*

Das oben aufgezeigte Design des NGS als Array-Technologie ermöglicht eine enorme Parallelisierung der DNA-Sequenzierung und somit die Generierung hunderter von Megabasen bis Gigabasen an Nukleotidsequenz während eines einzigen Instrumentendurchlaufs (Majewski et al. 2011; Petersen et al. 2017). Diese Entwicklung hat auch dazu beigetragen, dass sich die Erforschung von genetischen Erkrankungen massiv gewandelt hat. In den Jahren vor der NGS-Ära war die genetische Forschung im Wesentlichen auf große Familienstammbäume mit mehreren Betroffenen beschränkt. Mithilfe verschiedener Experimente wie Mikrosatelliten-gestützten Kopplungs-Analysen und Homozygotie-Kartierungen musste zunächst eine Kandidatenregion innerhalb des Genoms so stark eingegrenzt werden bis eine gezielte Untersuchung einzelner Gene mittels Sanger-Sequenzierung möglich war (Majewski et al. 2011; Petersen et al. 2017).

Durch die Einführung des NGS sind nun zeit- und kostenaufwendige Experimente zur Hypothesen-Generierung vor der Sequenzierung unnötig geworden, denn es erlaubt – zumindest theoretisch – die Detektion aller genetischen Varianten eines Individuums (Petersen et al. 2017). Damit eröffnet das NGS außerdem neue Anwendungsfelder für die genetische Forschung, da es auch die Entdeckung von *de novo*- und Mosaik-Varianten bei Fällen sporadischer Erkrankungen ermöglicht – ohne im

Vorhinein ein Kandidatengen oder betroffene Reaktionswege zu kennen (Lohmann und Klein 2014). Für die Untersuchung von *de novo*-Varianten wird ein sogenannter Trio-Ansatz durchgeführt. Hierbei wird die DNA des betroffenen Patienten und der beiden nicht erkrankten Eltern sequenziert und verglichen. So lassen sich leicht die Varianten herausfiltern, welche neu bei dem erkrankten Indexpatienten entstanden sind und nicht von den Eltern vererbt wurden (Acuna-Hidalgo et al. 2016; Mahler et al. 2019).

Trotz der allgemeinen Euphorie um das NGS ist es dennoch nötig, auch auf Limitationen dieser Technologie hinzuweisen. So ist es zwar theoretisch möglich, alle genetischen Varianten eines Individuums zu identifizieren, praktisch wird aber derzeit keine hundertprozentige Abdeckung des gesamten Genoms erreicht. Darüber hinaus erscheint eine Genauigkeit von > 99,9 % zwar schon relativ hoch, bedeutet aber aufgrund der immensen Gesamtzahl an gefundenen Varianten dennoch das Auftreten von mehreren tausend falsch-positiven Resultaten (Lohmann und Klein 2014). Eine reduzierte Qualität der Sequenzdaten kann u.a. in GC-reichen Regionen und langen Abfolgen desselben Nukleotids, sogenannten Homopolymeren auftreten (Olgiati et al. 2016). Zudem können sogenannte *Repeat*-Expansionen oder -Kontraktionen durch die konventionelle NGS-Technologie nicht entdeckt werden. (Bei den *Repeats* handelt es sich um aneinandergereihte Kopien kurzer Sequenzeinheiten.) Dies ist darin begründet, dass das NGS auf der Analyse relativ kleiner DNA-Fragmente mit einer Länge von etwa 150-300 Basenpaaren (sog. *short reads*) beruht. Die meisten krankheitsverursachenden *Repeat*-Expansionen sind jedoch länger als diese *short reads*, wodurch es praktisch unmöglich ist, die wahre Länge der *Repeats* zu ermitteln (Mantere et al. 2019). Weiterhin werden nicht alle genomischen Regionen gleich häufig abgedeckt. Wird eine bestimmte Sequenz insgesamt nur sehr selten abgelesen, besteht das Risiko, dass trotz eines heterozygoten Zustandes zufällig nur das Wildtyp-Allel abgelesen wird. Dies führt zu falsch-negativen Resultaten und damit der Gefahr, pathogene Varianten zu verpassen (Lohmann und Klein 2014).

1.1.3 Exom-Sequenzierung

Eine besonders erwähnenswerte Anwendungsmöglichkeit des NGS stellt das sogenannte „*targeted sequencing*“ dar. Hierbei wird nicht das gesamte Genom sequenziert, sondern nur bestimmte interessierende Regionen. Darunter fällt auch die gezielte Sequenzierung aller Protein-kodierender DNA-Abschnitte, also des Exoms (Shendure und Ji 2008). Ein entscheidender Vorteil der Exom-Sequenzierung (ES) gegenüber dem „*Whole Genome Sequencing*“ (WGS) ist, dass die codierende Sequenz nur etwa 1 % des menschlichen Genoms ausmacht. Dadurch lässt sich bei der Exom-Sequenzierung mit einer insgesamt niedrigeren Menge an Roh-Sequenzdaten trotzdem eine höhere durchschnittliche Abdeckung der Exons erzielen (Majewski et al. 2011). Dies erhöht die Sensitivität der Variantendetektion (Koboldt et al. 2010) und verringert das Risiko „falsch-negativer“ Ergebnisse,

welche durch ungenügende Ablesung einzelner Abschnitte bedingt sind (Voelkerding et al. 2009). Insgesamt war die Exom-Sequenzierung zum Zeitpunkt der Durchführung meiner experimentellen Arbeiten deutlich kostengünstiger als das WGS – sowohl was den Sequenzierungsprozess selbst anbelangt als auch die notwendige Speicherung und Analyse der gewonnenen Daten betreffend (Majewski et al. 2011).

Der Nachteil der Exom-Sequenzierung besteht, wie offensichtlich ist, darin, dass genetische Varianten in nicht-kodierenden Bereichen nicht entdeckt werden können. So werden evolutionär konservierte DNA-Abschnitte mit regulatorischen Funktionen, wie z.B. Bindungsstellen für Transkriptionsfaktoren nicht abgedeckt (Lohmann und Klein 2014). Auch die Entstehung neuer Spleiß-Stellen durch tief-intronische Mutationen sowie Mutationen in langen nicht-codierenden RNAs (lncRNAs) können durch die Exom-Sequenzierung nicht detektiert werden (Bolz und Hoischen 2019). Allerdings können Mutationen in diesen Bereichen ebenfalls erhebliche Auswirkungen auf die Funktion und Expression von Genen haben und somit zu einer Krankheitsentstehung beitragen. Beispielsweise regulieren lncRNAs die Expression zahlreicher Gene während der Hirnentwicklung und Mutationen in mehreren lncRNAs wurden bereits als ursächlich bei Patienten mit Autismus und mentaler Retardierung nachgewiesen (Bolz und Hoischen 2019). Außerdem werden, anders als der Name es vermuten lassen würde, bei der Exom-Sequenzierung nicht alle exonischen Bereiche komplett abgedeckt, sondern es entfallen die Exons, die noch nicht bekannt sind bzw. noch nicht annotiert wurden (Majewski et al. 2011). Weiterhin ist die Exom-Sequenzierung zwar geeignet, um kleinere Insertionen und Deletionen aufzuspüren, größere Insertionen, Deletionen, genomische *Rearrangements*, *Repeat*-Expansionen oder Variationen der Kopienzahl lassen sich damit aber nicht entdecken (Petersen et al. 2017; Bolz und Hoischen 2019).

Tatsächlich sollen etwa 85 % der Mutationen, die zu großen Auswirkungen auf krankheitsrelevante Merkmale führen, innerhalb der kodierenden Sequenz liegen (Majewski et al. 2011), sodass die Detektion einer pathogenen Variante innerhalb des Exoms durchaus wahrscheinlich erscheint. Andererseits ist diese Zahl wohl zumindest zum Teil mit Bias behaftet, da in der Ära der Sanger-Sequenzierung nicht-kodierende Regionen kaum untersucht wurden (Olgati et al. 2016) und die Identifizierung krankheitsverursachender Mutationen in diesen Bereichen schwierig ist (Petersen et al. 2017). Insgesamt kann bisher schätzungsweise in durchschnittlich knapp 40 % der mittels Exom-Sequenzierung untersuchten Fälle Mendel'scher Erkrankungen tatsächlich eine Diagnose gestellt werden. Dabei variiert die Spanne der Diagnoserate abhängig vom Studiendesign und dem untersuchten Krankheitsbild erheblich. In einzelnen Studien werden zum Teil Aufklärungsraten von deutlich über 50 % angegeben. Trio-Exom-Sequenzierungen haben sich im Vergleich zu Single-Exom-Sequenzierungen als erheblich effektiver herausgestellt (Clark et al. 2018; Fogel 2018; Mahler et al. 2019).

1.1.4 Dateninterpretation – die große Herausforderung des *Next Generation Sequencings*

Der entscheidende Arbeitsaufwand hat sich im Zeitalter des NGS auf die Phase nach der Sequenzierung verlagert, denn mithilfe von bioinformatischen Methoden gilt es nun, die Masse an gewonnenen Daten zu analysieren und zu interpretieren. Als einer der ersten Schritte wird die entschlüsselte Sequenz des entsprechenden Individuums mit einem Referenzgenom abgeglichen (Hintzsche et al. 2016). Im Falle des WGS werden dadurch 3-4 Millionen „*Single Nucleotide Polymorphisms*“ (SNPs), also Veränderungen, die nur ein einziges Nukleotid betreffen, entdeckt. Bei der überwiegenden Mehrzahl davon (bis zu 90 %) handelt es sich um bereits bekannte Varianten, die in der Datenbank des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) gelistet sind (Koboldt et al. 2010). In diese Datenbank des NCBI gehen Informationen aus großen Sequenzierungsprojekten ein, wie beispielsweise die Daten des *Exome Aggregation Consortiums* (*ExAC*, <https://exac.broadinstitute.org>) bzw. der *Genome Aggregation Database* (*gnomAD*, <https://gnomad.broadinstitute.org>). *ExAC* umfasst die Sequenzdaten von über 60.000 Exom-Sequenzierungen (Lek et al. 2016) und *gnomAD* die Daten von insgesamt über 125.000 Exom- sowie von 15.708 Genom-Sequenzierungen, wobei die *ExAC*-Daten integrierter Bestandteil der *Genome Aggregation Database* sind.

Die Anwendung der Exom-Sequenzierung führt zur Identifikation von 20.000 bis 50.000 Varianten pro sequenziertem Exom (Gilissen et al. 2012). Im Folgenden besteht die große Schwierigkeit darin, einzuschätzen welche der gefundenen Varianten pathogenetisch relevant sind und in welchen Fällen es sich nur um „harmlose“ Polymorphismen handelt. Es beginnt also die sprichwörtliche Suche nach der Nadel im Heuhaufen. Daher ist es notwendig, die entdeckten Varianten beruhend auf verschiedenen Annahmen zu filtern (Majewski et al. 2011). Die Filterschritte sind unter anderem abhängig vom vermuteten zugrundeliegenden Erbgang und beinhalten Qualitätskennzeichen wie die Ablesehäufigkeit. Daneben wird (bei seltenen Erkrankungen) nach Varianten mit einer sehr niedrigen Frequenz in der Allgemeinbevölkerung gesucht. Ein weiteres Kriterium ist der Ausschluss von synonymen Varianten und solchen, die außerhalb der kodierenden Sequenz liegen, da angenommen wird, dass diese sich nur minimal auf der Proteinebene auswirken (Gilissen et al. 2012; Olgiati et al. 2016). Sind Informationen über Familienangehörige verfügbar, werden diese ebenfalls berücksichtigt. Gesunde Eltern und Geschwister dürfen die vermutete Mutation nicht aufweisen, während in betroffenen Verwandten das Vorhandensein der gleichen Mutation zu erwarten ist. Eine Möglichkeit die verbleibenden Varianten weiter zu priorisieren, besteht in der Analyse der evolutionären Konservierung des betroffenen Nukleotids bzw. der veränderten Aminosäure. Hochkonservierte Nukleotide sind in der Regel wichtig für die Proteinfunktion. Denn neue schädigende Mutationen, die im Laufe der Evolution auftreten, werden durch natürliche Selektion meist wieder schnell aus dem genetischen Pool einer Bevölkerung entfernt, während neutrale Polymorphismen

erhalten bleiben (Olgiati et al. 2016). Beobachtungen zur Konservierung gehen auch in die *Scores* diverser *in silico*-Prädiktionsprogramme ein, wie z.B. „Combined Annotation Dependent Depletion“ (CADD, <https://cadd.gs.washington.edu>), „Sorting Intolerant From Tolerant“ (SIFT, <https://sift.bii.a-star.edu.sg>) oder „Polymorphism Phenotyping v2“ (PolyPhen-2, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2>). Diese Programme prognostizieren, beruhend auf unterschiedlichen Algorithmen, ob eine bestimmte genetische Variante benigne oder (potenziell) schädigend ist (Hintzsche et al. 2016). Zusätzlich können die Plattformen *ExAC* und *gnomAD* Aufschluss darüber geben, in welchem Maße Varianten innerhalb eines bestimmten Gens toleriert werden oder einer starken Selektion unterliegen. Hierzu ist die Anzahl der erwarteten im Vergleich zur Anzahl der tatsächlich beobachteten synonymen und *Missense*-Varianten angegeben. Außerdem wird der zugehörige *Z-Score* genannt, wobei ein hoher, positiver *Z-Score* eine große Diskrepanz zwischen der beobachteten (sehr niedrig) und erwarteten Anzahl (deutlich höher) anzeigt. Darüber hinaus werden die erwartete und beobachtete Anzahl an *Loss of Function*-Mutationen angegeben. Das zusätzliche metrische Maß „pLI“ (*probability of being loss-of-function (LoF) intolerant*) separiert Gene ausreichender Länge in LoF-intolerant ($pLI \geq 0,9$) und LoF-tolerant ($pLI \leq 0,1$) (Lek et al. 2016). Über beide Plattformen ist außerdem der Vergleich von Allelfrequenzen in verschiedenen ethnischen Subpopulationen möglich.

Nach Identifikation eines oder mehrerer Kandidatengene, müssen die Varianten aufgrund der höheren Fehlerrate des NGS zunächst noch per Sanger-Sequenzierung validiert werden, um falsch-positive Ergebnisse auszuschließen (Majewski et al. 2011). Anschließend stellt sich selbst bei „richtig-positiven“ Resultaten die Frage, ob diese Variante tatsächlich pathogen ist. Dies ist insbesondere schwer zu beantworten für Gene, die bislang noch nicht mit der Entstehung von Krankheiten in Verbindung gebracht wurden oder deren Funktion und Bedeutung bisher nur schlecht oder gar nicht untersucht wurden (Petersen et al. 2017). Zum einen sollte die biologische Plausibilität der jeweiligen Variante in der Pathogenese der betrachteten Krankheit berücksichtigt werden. Das heißt, das entsprechende Gen sollte in dem Organ exprimiert werden, das von der Erkrankung betroffen ist und ggf. das Genprodukt an einem Reaktionsweg beteiligt sein, der bekanntermaßen in die Krankheitsentstehung involviert ist. Zum anderen sind funktionelle Studien anzustreben, die die Auswirkungen der Mutation in Zellsystemen oder Modell-Organismen beleuchten (Olgiati et al. 2016). Neben dem Fehlen der Variante in gesunden (ethnisch-passenden) Kontrollprobanden ist eine unabhängige Bestätigung der Variante durch eine weitere Forschergruppe von Bedeutung (Domingo et al. 2016).

1.1.5 *Next Generation Sequencing* in der praktischen Anwendung: klinischer Kontext und ethische Aspekte

In den letzten Jahren hat das NGS durch die Entdeckung einer Vielzahl an neuen Krankheitsgenen zur Revolutionierung der genetischen Forschung beigetragen. So konnten in den letzten Jahren im Bereich der seltenen, monogenetischen Erkrankungen jährlich etwa 150 bis 200 neue Krankheitsgene entdeckt werden (Boycott et al. 2017; Bick et al. 2019). Daneben hat auch das klinische Setting von dieser Technologie profitiert. Schließlich werden das WGS und ES an realen Menschen mit konkreten Krankheiten durchgeführt und verhelfen diesen im Idealfall zu einer Diagnose. Neben dem informativen Charakter für die Betroffenen und deren Angehörige ist die psychische Konsequenz der Gewissheit über die Krankheitsursache nicht zu unterschätzen. In manchen Fällen ermöglicht die Diagnose darüber hinaus eine genauere Prognose oder führt zu einer besseren Anpassung der Therapie (Lohmann und Klein 2014; Bick et al. 2019). Außerdem ist auf Grundlage dieser Informationen eine genetische Beratung der Angehörigen des Indexpatienten möglich. Beispielsweise können Eltern bezüglich des Wiederholungsrisikos der Erkrankung in einem weiteren Kind aufgeklärt werden. Auch eine pränatale Testung auf das Vorliegen der Mutation ist denkbar (Gilissen et al. 2012). Ferner ist diese Art von Grundlagenforschung und besonders die Untersuchung der zugrundeliegenden Pathomechanismen und betroffenen Reaktionswege unabdingbar, um mögliche Angriffspunkte für Medikamente zu finden und letztendlich sogar den Weg in Richtung einer Präzisions-Medizin zu ebnen (Majewski et al. 2011). An dieser Stelle lässt sich ein institutseigenes Erfolgsbeispiel anführen: Durch die Anwendung des NGS ließ sich bei einem Patienten mit Klinefelter-Syndrom (Karyotyp 47, XXY) und komplexen neurologischen Beeinträchtigungen eine zusätzliche mitochondriale Mutation identifizieren. Basierend auf dem Wissen um diese Mutation konnte dem Patienten eine personalisierte Therapie angeboten werden, die zu einer deutlichen Symptomverbesserung führte (Dulovic et al. 2018).

Ebenso wie viele andere neuartige Entwicklungen in der Medizin bringt auch das NGS ethische Gesichtspunkte mit sich, die bedacht werden müssen. So gilt es, sich damit auseinanderzusetzen, wie mit inzidentellen Funden umgegangen werden soll – also der Detektion von pathogenen Varianten, die nicht mit der eigentlichen Fragestellung in Zusammenhang stehen (Lohmann und Klein 2014). Hier muss das Recht des Patienten auf Nichtwissen gegenüber eventuell frühzeitigen Behandlungsmöglichkeiten abgewogen werden. Weiterhin sollten auch der Aspekt der Langzeitdatenspeicherung für spätere Reanalysen (Olgati et al. 2016), die Datensicherheit und das Recht der Patienten auf Privatsphäre nicht vernachlässigt werden (Majewski et al. 2011). Insbesondere dürfen derart sensible Daten nicht unberechtigterweise in die Hände von Versicherungen oder Arbeitgebern gelangen und dort zu Benachteiligungen der Betroffenen führen (siehe Gendiagnostikgesetz (Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz 2009)). Die

informierte Zustimmung zur Untersuchung durch den Patienten sowie die Prüfung geplanter klinischer Studien durch eine Ethikkommission sind daher zentrale Voraussetzungen vor Durchführung einer Genom- oder Exom-Sequenzierung.

1.2 Klinik und Genetik der Dystonien

Ein Gebiet, in dem sich das NGS als sehr hilfreiches Instrument erwiesen hat, ist unter anderem die Erforschung von Bewegungsstörungen (Olgiati et al. 2016). So konnten z.B. im Bereich der Dystonien in den letzten Jahren einige neue krankheitsverursachende Varianten identifiziert und das Verständnis der zugrundeliegenden Pathomechanismen erweitert werden (Domingo et al. 2016). Der Begriff „Dystonie“ (dystonia musculorum deformans) wurde im Jahre 1911 durch den deutschen Neurologen Hermann Oppenheim geprägt (Klein und Fahn 2013). „Dystonie“ kann entweder ein Symptom im Rahmen einer anderen Erkrankung, eine (abnorme) Bewegungsform oder auch die Dystonie als Krankheitsentität beschreiben (Camargo et al. 2015). Bei dem Erkrankungsspektrum der Dystonien handelt es sich um eine sowohl phänotypisch als auch genotypisch heterogene Gruppe hyperkinetischer Bewegungsstörungen mit einer geschätzten Prävalenz von 15 bis 30 pro 100.000 Einwohnern (Phukan et al. 2011; Steeves et al. 2012).

1.2.1 Klinische Kennzeichen

Dystonien im Allgemeinen sind charakterisiert durch anhaltende oder intermittierende nicht-kontrollierbare Muskelkontraktionen, die zu abnormalen, oftmals sich wiederholenden Bewegungen oder Haltungstereotypen führen (Albanese et al. 2013). Während der Kontraktionen werden gleichzeitig agonistische und antagonistische Muskeln aktiviert (Geyer und Bressman 2006). Die Haltungsanomalien äußern sich als Beugung, Streckung oder Verdrehung und können verschiedene Körperteile betreffen. Diese Veränderungen können tonisch oder krampfartig, dynamisch oder fixiert sein oder einen rhythmisch-tremorartigen Charakter haben (Albanese 2003; Albanese et al. 2013). Sowohl die mit der Dystonie verbundenen Körperhaltungen als auch die abnormen Bewegungen folgen einem stereotypen Muster hinsichtlich der Richtung sowie der beteiligten Körperteile und sind häufig repetitiv (De Pablo-Fernandez und Warner 2017). Die Dystonie wird meist durch willkürliche Bewegung initiiert oder verschlimmert (Albanese et al. 2013). Eine Extremform sind die Tätigkeits-spezifischen Dystonien, die (wenigstens zu Beginn der Erkrankung) nur bei ganz spezifischen, in hohem Maße antrainierten motorischen Bewegungen auftreten. Sie können sich als Schreibkrampf oder Musikerdystonie äußern, aber auch z.B. bei Sportlern wie Golfern oder Tänzern auftreten (Torres-Russotto und Perlmutter 2008; Sadnicka et al. 2016).

Weitere typische Merkmale sind die Phänomene des „overflow“ und der Spiegel-Dystonie. Ersteres bezeichnet eine ungewollte Muskelkontraktion, die die übliche dystone Bewegung begleitet, diese aber anatomisch überschreitet (Albanese et al. 2013). Meist ist dieses Übergreifen kontinuierlich, kann aber auch die kontralaterale Körperhälfte betreffen. Die Spiegel-Dystonie tritt einseitig auf der primär betroffenen Körperseite auf und wird durch spezifische motorische Aktionen der Gegenseite getriggert. Ein typisches Beispiel ist das Auftreten eines Krampfes in der dominanten Hand, während der Patient mit der nicht betroffenen Seite schreibt (Albanese und Lalli 2009).

1.2.2 Einteilung anhand der Konsensus-Klassifikation

Aktuell erfolgt die klinische Einteilung der Dystonien anhand einer im Jahre 2013 verabschiedeten Konsensus-Klassifikation (Albanese et al. 2013). Die Einordnung erfolgt entlang zweier Achsen, nämlich anhand der klinischen Charakteristiken einerseits und der Ätiologie andererseits.

Die erstgenannte Achse weist wiederum weitere Subgruppen auf (s. Abb. 2), z.B. das Erstmanifestationsalter. Daneben werden die betroffenen Körperregionen mit den Begriffen fokal, multifokal, segmental, generalisiert und Hemidystonie unterschieden. Während die fokalen Formen isoliert einzelne Körperteile involvieren, sind bei den segmentalen Dystonien zwei oder mehr aneinandergrenzende, bei den multifokalen Formen hingegen mehrere nicht kontinuierliche Regionen einbezogen. Die generalisierte Dystonie schließlich betrifft den Körperstamm und mindestens zwei weitere Bereiche. Ferner lässt sich das zeitliche Muster beurteilen: der Krankheitsverlauf kann entweder progressiv oder statisch sein. Außerdem kann die Variabilität der Symptomatik differenziert werden als persistierend, aktions-spezifisch, mit tageszeitlichen Schwankungen oder anfallsweise. Weiterhin unterscheidet die Klassifikation zwischen isolierten und kombinierten Dystonien. „Kombiniert“ bezeichnet die Vergesellschaftung der Dystonie mit Parkinsonismus, Myoklonus oder anderen Bewegungsstörungen. Darüber hinaus können Dystonien gemeinsamen mit nicht-motorischen Symptomen im Rahmen von komplexen Syndromen oder Systemerkrankungen auftreten.

Mithilfe der ätiologischen Achse werden separat zwei verschiedene Komponenten beschrieben: zum einen das Vorliegen nachweisbarer pathologischer Veränderungen innerhalb des Nervensystems und zum anderen, ob es eine genetische oder erworbene Ursache für die Erkrankung gibt (s. Abb. 2). Lassen sich weder krankheitsverursachende Mutationen noch erworbene Gründe erkennen, erfolgt die Klassifikation als idiopathisch (Albanese et al. 2013).

In diesem Zusammenhang sei noch erwähnt, dass erbliche monogenetische Dystonien früher mit dem Symbol „DYT“ und einer darauffolgenden Zahl gekennzeichnet wurden. Dieses System der Locus-Symbole wurde ursprünglich eingeführt, um spezifische chromosomale Regionen zu kennzeichnen, die mit einer familiären Erkrankung in Zusammenhang gebracht wurden.

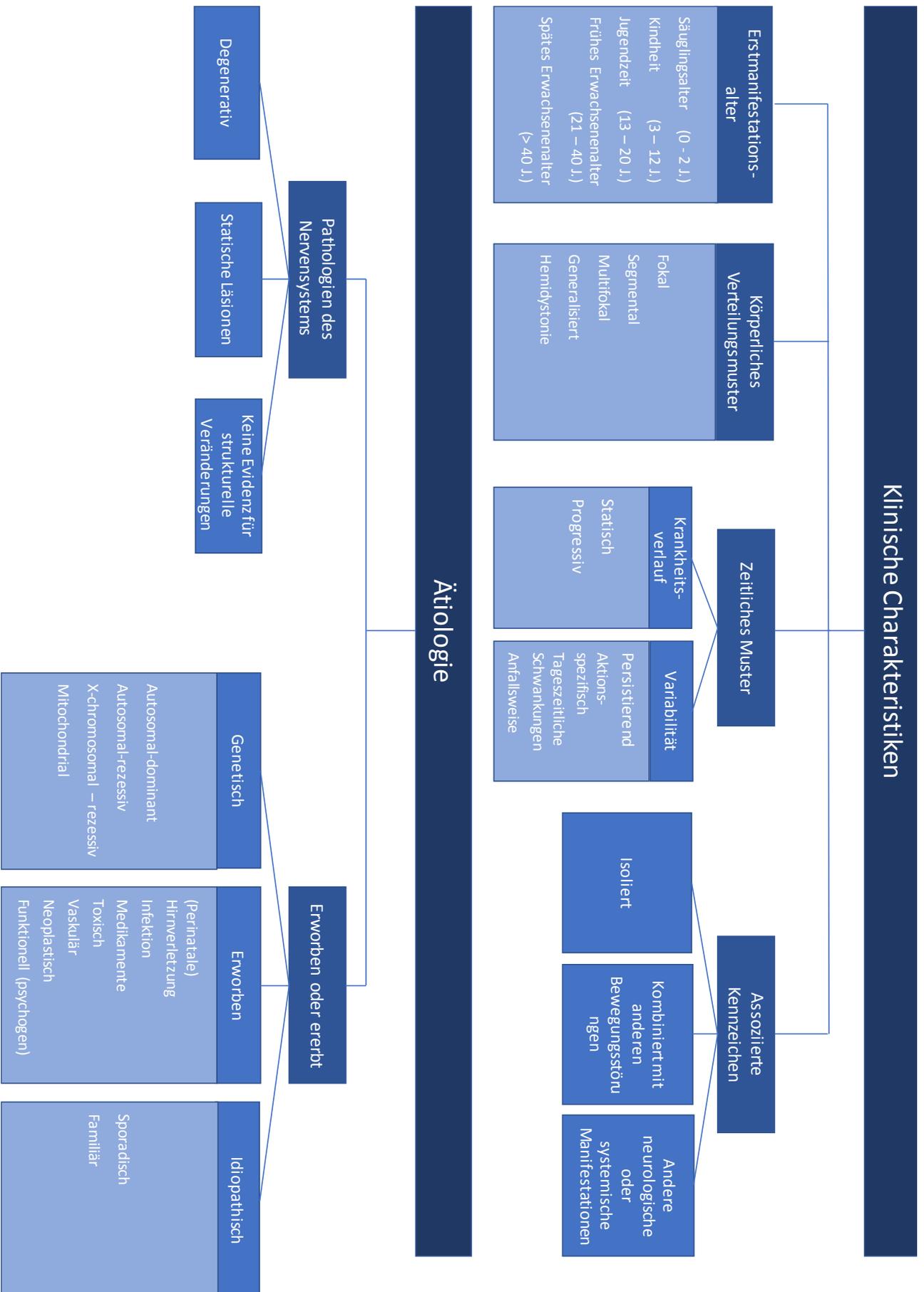


Abbildung 2: Schematische Darstellung der 2013 vorgestellten Konsensus-Klassifikation für Dystonien entlang von zwei verschiedenen Achsen (Adaptiert nach Macerollo und Martino 2016, Abb.2).

Die Nummerierung erfolgte dabei chronologisch bzw. basierend auf der ersten Beschreibung in der Literatur. Aufgrund verschiedener Schwächen dieser Benennung wurde 2016 von der „International Parkinson and Movement Disorder Society Task Force for Nomenclature of Genetic Movement Disorders“ eine revidierte Nomenklatur vorgeschlagen, die u.a. auf eine Nummerierung verzichtet und stattdessen die DYT-Symbole durch die Angabe des betroffenen Gens ergänzt (Marras et al. 2016). Da sich die alte Namensgebung aber logischerweise in einem Großteil der verfügbaren Literatur findet, wird sie auch im Rahmen dieser Dissertation noch erwähnt werden.

1.2.3 Alkohol-responsive Dystonien

Unter den monogenetischen Dystonien gibt es zwei Subtypen, deren Symptomatik sich interessanterweise nach Alkoholkonsum bessert, nämlich DYT-*TUBB4A* (DYT4) und DYT-*SGCE* (DYT11). Spannend ist die Gemeinsamkeit, dass beide Krankheitsgene (*TUBB4A* und *SGCE*) für Proteine codieren, die am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind. Die β -Tubulin-Isoform 4a (Genprodukt von *TUBB4A*) ist Bestandteil von Mikrotubuli, während das durch *SGCE* codierte ϵ -Sarcoglykan eine Komponente des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes darstellt – eine Verbindung zwischen der Extrazellulärmatrix mit dem subsarkolemmalen Zytoplasma (Ettinger et al. 1997; Tischfield und Engle 2010).

1.2.3.1 DYT-*TUBB4A* – Whispering Dysphonia

Mutationen in dem Gen *TUBB4A* führen zur Dystonie DYT-*TUBB4A* (DYT4), die autosomal-dominant vererbt wird und wahrscheinlich eine komplette Penetranz mit unterschiedlicher Expressivität aufweist. *TUBB4A* codiert für die β -Tubulin-Isoform 4a, welche besonders im Gehirn eine hohe Expressionsrate aufweist (Hersheson et al. 2013; Lohmann et al. 2013). Gemeinsam mit α -Tubulin bildet β -Tubulin Heterodimere, die zu Mikrotubuli polymerisieren – einem wichtigen Bestandteil des Zytoskeletts. Im Nervensystem spielen Mikrotubuli unter anderem eine zentrale Rolle bei der neuronalen Migration und Polarisation sowie während des Axonwachstums (Tischfield und Engle 2010).

Klinisch beschrieben wurde die Dystonie DYT4 erstmals 1985 in einer australischen Familie mit insgesamt 20 Betroffenen (Parker 1985). Die Erkrankung manifestierte sich entweder isoliert als Flüster-Dysphonie (*whispering dysphonia*) oder im Komplex mit weiteren Symptomen wie verschiedenartigen motorischen und neuropsychiatrischen Auffälligkeiten (Ängste, Psychosen oder Demenz). Die Dysphonie präsentierte sich derart, dass die erkrankten Individuen zwar schreien und auch im Schlaf normal sprechen konnten, wenn sie aber mit normaler Stimme etwas sagen wollten, brachten sie nur ein Flüstern oder gar keinen Ton heraus. Die anfängliche Dysphonie hat sich in den

meisten der Patienten zur fokalen (kranio-zervikalen) oder generalisierten Dystonie weiterentwickelt, letztere zum Teil in Begleitung mit anderen Bewegungsstörungen wie einer Ataxie oder Chorea. Das Erstmanifestationsalter lag bei der Mehrzahl der Fälle vor dem 20. Lebensjahr. Eine Symptombesserung nach Alkoholkonsum besonders zu Krankheitsbeginn wurde beschrieben (Wilcox et al. 2011).

Im Jahre 2013 schließlich konnte eine *Missense*-Variante p.R2G (c.4C>G) als krankheitsverursachende Mutation in der australischen Familie identifiziert werden (Hersheson et al. 2013; Lohmann et al. 2013). Im gleichen Jahr wurde aufgedeckt, dass das Krankheitsbild der Leukoenzephalopathie-Hypomyelination (H-ABC) ebenfalls die Folge einer *Missense*-Mutation (p.D249N) im *TUBB4A*-Gen ist (Simons et al. 2013). Die Diagnose der H-ABC beruht auf radiologischen Kriterien. Diese beinhalten die pathognomonische Kombination aus Hypomyelination und einer Atrophie des Kleinhirns sowie der Basalganglien. Klinisch fielen die Erkrankten häufig zunächst mit einem verspäteten Erreichen der sogenannten „Meilensteine“ der motorischen Entwicklung auf. Im Krankheitsverlauf kam es zu einer Verschlechterung der Gehfähigkeit (in mehreren Fällen beginnend mit einer Hemidystonie). Als weitere phänotypische Krankheitsmanifestationen wurden Spastizität, Tremor, Ataxie und Choreaethose sowie eine zunehmende Dysarthrie beschrieben. Die Erstmanifestation der H-ABC fiel in das Säuglings- bis Kleinkindalter. Da gewisse Überlappungen zwischen den Krankheitsbildern der „*whispering dysphonia*“ und der H-ABC bestehen, wird DYT4 als „*form fruste*“, das heißt als milde Verlaufsform der H-ABC bzw. die Zugehörigkeit der beiden Erscheinungsformen zu einem kontinuierlichen phänotypischen Spektrum diskutiert (Erro et al. 2015).

Funktionelle *in vitro* Studien legen nahe, dass die verschiedenartigen phänotypischen Ausprägungen von nicht vorhandenen MRT-Veränderungen in DYT4, Hypomyelination mit Atrophie des Cerebellums und der Basalganglien im Falle der H-ABC sowie isolierter Hypomyelination auf einer Beteiligung unterschiedlicher Zelltypen beruhen könnten. Während die DYT4-Mutation p.R2G sich nur auf die Morphologie von Neuronen und die im Zusammenhang mit isolierter Hypomyelination beschriebenen Varianten p.V255I und p.R282P nur auf Oligodendrozyten auswirkten, hatte die H-ABC-Mutation p.D249N Effekte sowohl auf Neuronen als auch auf Oligodendrozyten (Curiel et al. 2017). Auf zellulärer Ebene konnte gezeigt werden, dass die *TUBB4A*-Mutationen p.D249N und p.A271T mit der Bindung von Motor-Proteinen an Mikrotubuli interferierten und zu einer beeinträchtigten Dynamik der Mikrotubuli führten (Vulinovic et al. 2018). Eine andere funktionelle Studie ergab, dass die Mutanten p.R2G und p.A271T abnorme Tubulin-Netzwerke bildeten und eine verminderte Fähigkeit zur Bindung an α -Tubuline zeigten (Watanabe et al. 2018). In beiden Studien konnte ein vermindertes Neuritenwachstum beobachtet werden. Somit scheinen Störungen im Bereich des Mikrotubuli-Netzwerkes und der Mikrotubuli-Dynamik wichtige Pathomechanismen in der Entstehung der verschiedenen mit *TUBB4A*-Mutationen verbundenen Krankheitsbilder

darzustellen. Bislang völlig ungeklärt ist jedoch, über welche zellulären Reaktionswege Alkoholkonsum zu einer Symptombesserung führen könnte.

1.2.3.2 DYT-SGCE (DYT11) – Myoklonus-Dystonie

Die mit dem Locus-Symbol DYT-SGCE (DYT11) bezeichnete Myoklonus-Dystonie wird durch Mutationen in dem Gen *SGCE* verursacht. Sie gehört zu den kombinierten Dystonie-Syndromen, das heißt sie vereint die Charakteristiken einer Dystonie mit denen einer weiteren Bewegungsstörung (des Myoklonus). Die Erkrankung folgt einem autosomal-dominanten Erbgang (Nardocci 2011). Die Erstmanifestation der Myoklonus-Dystonie liegt meist in der ersten oder zweiten Lebensdekade. Ein jeweils isoliertes Auftreten von Myoklonus oder Dystonie ist möglich, eine alleinige Manifestation der Dystonie kommt jedoch eher selten vor (Raymond et al. 2008). Der myoklonische Anteil ist gekennzeichnet durch blitzartige Zuckungen, die vorwiegend den Oberkörper betreffen, aber auch die untere Extremität, das Gesicht oder die Stimme können beteiligt sein. Der Myoklonus ist als prädominantes Charakteristikum der Erkrankung oft auch in Ruhe vorhanden und kann durch willkürliche Bewegungen und psychologischen Stress verschlimmert werden (Kinugawa et al. 2009). Die Dystonie präsentiert sich hingegen in der Regel in einer milden bis moderaten Ausprägung. Größtenteils tritt sie im Bereich der oberen Extremität, als zervikale Dystonie oder Schreibkrampf in Erscheinung, kann wiederum aber auch die untere Extremität oder laryngeale Muskeln betreffen (Kinugawa et al. 2009; Peall et al. 2014). Normalerweise stellt sich der klinische Krankheitsverlauf benigne dar und lässt ein aktives Leben mit einer normalen Lebenserwartung zu, wobei eine große Variabilität der Verläufe (selbst innerhalb einer Familie) vorkommen kann (Kinugawa et al. 2009). Viele der in der Literatur beschriebenen Familien zeigen eine (dosisabhängige) Verbesserung ihrer Symptome durch Alkoholkonsum. Es gibt aber auch Individuen auf die diese Beobachtung nicht zutrifft (Asmus et al. 2002; Doheny et al. 2002; Asmus et al. 2005; du Montcel et al. 2006; Nardocci et al. 2008; Weissbach et al. 2017). Ferner wurde das gehäufte Auftreten psychiatrischer Erkrankungen im Rahmen der Myoklonus-Dystonie beschrieben. Dazu zählen insbesondere Alkohol-Abhängigkeit und Zwangsstörungen sowie Entitäten aus dem Formenkreis der Angsterkrankungen, darunter Phobien, Panikstörungen und die generalisierte Angsterkrankung (Saunders-Pullman et al. 2002; Peall et al. 2013; Weissbach et al. 2013; Peall et al. 2015).

Das *SGCE*-Gen codiert für ϵ -Sarcoglykan. Sarcoglykane sind am Aufbau des Dystrophin-Glykoprotein-Komplexes beteiligt, welcher eine Verbindung zwischen der Extrazellulärmatrix mit dem subsarkolemmalen Zytoplasma herstellt. Die Isoform ϵ -Sarcoglykan wird in weiten Teilen sowohl embryonalen als auch adulten Gewebes exprimiert (Ettinger et al. 1997). Innerhalb des Gehirns konnten hohe Expressionslevel in den Mitralzellen des *Bulbus olfactorius*, den Purkinje-Zellen des

Kleinhirns sowie monoaminergen (dopaminergen) Neuronen des Mittelhirns gezeigt werden (Chan et al. 2005).

Das *SGCE*-Gen unterliegt einem maternalem Imprinting: Während das mütterliche Allel methylierte CpG-Inseln im Bereich des Promotors und des ersten Exons aufweist, zeigt sich das väterliche Allel unmethyliert. Das maternale Allel wird dadurch abgeschaltet und nur das paternale Allel exprimiert. Dieses Phänomen kann die reduzierte Penetranz der Erkrankung innerhalb betrachteter Familienstammbäume erklären (Müller et al. 2002; Grabowski et al. 2003). Das Spektrum der Mutationsarten in Patienten mit Myoklonus-Dystonie reicht von einzelnen Basenaustauschen, über Spleiß-Stellen-Mutationen und kleineren Insertionen oder Deletionen bis hin zu Exon-*Rearrangements* und dem Vorkommen im Rahmen von Mikrodeletionssyndromen (Asmus et al. 2007; Grünewald et al. 2008). Die meisten dieser Mutationen führen zu einem vorzeitigen Stopp-Codon oder einem frühzeitigen Abbau des fehlerhaften Proteins über das Ubiquitin-Proteasomen-System. Somit scheinen (fast) alle *SGCE*-Mutationen in einem kompletten Funktionsverlust zu münden (Esapa et al. 2007; Grünewald et al. 2008; Grütz et al. 2017).

Pathophysiologisch könnte der Dopaminstoffwechsel eine entscheidende Rolle in der Entstehung des Symptomenkomplexes der Myoklonus-Dystonie, bestehend aus motorischen und psychiatrischen Auffälligkeiten, spielen. Darauf deuten bildgebende Untersuchungen an Patienten mit *SGCE*-Mutationen mittels SPECT (single-photon emission computed tomography) (Beukers et al. 2009) sowie Experimente mit *sgce-knockout* Mäusen hin (Yokoi et al. 2006; Zhang et al. 2012). Ebenso wie im Falle der *TUBB4A*-Mutationen ist es auch für die Myoklonus-Dystonie *DYT-SGCE* bisher nicht geklärt, über welche zellulären Mechanismen der Konsum von Alkohol zu der beschriebenen Verbesserung der Krankheitssymptome führen könnte.

1.2.3.3 Alkohol-responsive Gene

Bereits vor etlichen Jahren wurden Gene beschrieben, deren Expression im menschlichen Gehirn durch langjährigen Alkoholabusus beeinflusst wurde. Interessanterweise waren darunter auch solche, deren Genprodukte eine Rolle in der synaptischen Transmission spielen (Lewohl et al. 2000). Durch Untersuchungen am Nematoden *C. elegans* konnte gezeigt werden, dass einige durch Alkoholgenuss in veränderter Weise exprimierte Gene eine bestimmte Basenabfolge in ihrem Promotorbereich aufweisen. Diese Sequenz besteht aus den 11 Nukleotiden „tCTGcGTcTcT“, wobei Großbuchstaben absolut konservierte und kleine Buchstaben veränderliche Positionen darstellen (Kwon et al. 2004). Eine weitere Forschergruppe fand heraus, dass die obengenannte Sequenz – von ihnen als Alkohol-responsives Element (ARE) beschrieben – ebenfalls in verschiedenen murinen Genen zu finden ist, deren Expression in Neuronen und Astrozyten nach Alkoholgenuss hoch- oder herunterreguliert wurde (Pignataro et al. 2007; Pignataro et al. 2013). Zu den veränderlichen

neuronalen Genen gehören wiederum einige, die an der synaptischen Transmission, Synapsenbildung und -plastizität sowie am Mikrotubuli-Aufbau und Protein-Transport beteiligt sind (Pignataro et al. 2009). Im Falle der Astrozyten sind verschiedenste funktionelle Gengruppen betroffen, die in ihrer Gesamtheit zur Aufrechterhaltung einer Homöostase im zentralen Nervensystem beitragen (Pignataro et al. 2013). Das beschriebene ARE stellt eine potenzielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor HSF-1 (Hitze-Schock-Faktor 1) dar. Dieser wird unter Alkoholeinfluss oder Stress durch Hitze vom Zytoplasma in den Zellkern verlagert, was eine notwendige Bedingung darstellt, damit HSF-1 als Transkriptionsfaktor wirken kann (Pignataro et al. 2007).

1.2.4 Komplexe Dystonien

Neben der Kombination mit anderen Bewegungsstörungen können Dystonien auch mit weiteren neurologisch-psychiatrischen und systemischen Erkrankungszeichen assoziiert sein. Für diese breitgefächerten Krankheitsbilder, in denen die Dystonie im Kontext eines umfassenderen Phänotyps auftritt, wurde die Bezeichnung als „komplexe Dystonie“ vorgeschlagen (Marras et al. 2016). Unter die komplexen Dystonien fällt eine bunte Vielfalt an Syndromen u.a. Dihydropterinreduktase-Mangel, Mohr-Tranebjaerg-Syndrom, Leber-hereditäre-Optikusneuropathie und GM1-Gangliosidose Typ III. Die mit solchen Krankheiten verbundenen Symptome reichen von Visusverlust über Kardiomyopathie bis hin zu Leberzirrhose (Marras et al. 2016). Daneben kann die Dystonie auch als Symptom im Rahmen von Syndromen vorkommen, die zugleich kognitive Einschränkungen, Entwicklungsverzögerung oder Intelligenzminderung als weitere phänotypische Kennzeichen umfassen. Beispiele dafür sind das Lesch-Nyhan-Syndrom, die Biotin-responsive Basalganglien-Erkrankung, die Fucosidose, die Neuroferritinopathie, das Nieman-Pick-Syndrom (NPC1 und NPC2) sowie das Rett-Syndrom (Phukan et al. 2011; Marras et al. 2016).

An diesen kurzen Aufzählungen ist bereits erkennbar, dass komplexe Dystonien zwar selten, aber vielfältig sind und sich klinisch und genetisch sehr heterogen präsentieren. Es sind über 250 Gene bekannt, in denen Mutationen zu Dystonie-Erkrankungen oder Syndromen führen können, in denen die Dystonie einen Teil des möglichen phänotypischen Spektrums darstellt (Zech et al. 2017).

1.3 Vorarbeiten der Arbeitsgruppe

Die experimentellen Arbeiten an meiner Promotion umfassten zwei Arbeitsteile und wurden in den Jahren 2016 - 2017 ausgeführt. Der erste Teil beschäftigte sich mit der Erforschung Alkohol-responsiver Dystonien. Dazu wurden neun unter Alkohol-responsiver Dystonie leidende Patienten ausgewählt, deren DNA-Proben von der *Dystonia Coalition* (USA) erhalten werden konnten. Mit der

DNA dieser Patienten wurde eine Exom-Sequenzierung durchgeführt und der erhaltene Datensatz auf Varianten mit einer Populationsfrequenz von $\leq 0,01$ in der Allgemeinbevölkerung vorgefiltert. Außerdem wurde bereits eine Qualitätsfilterung durchgeführt.

Innerhalb der Arbeitsgruppe besteht seit langem eine hohe Expertise in der Erforschung von Dystonien. Beispielsweise haben sich einige Arbeiten mit Mutationen in den Genen *TUBB4A* und *SGCE* befasst, welche zu Formen Alkohol-responsiver Dystonien führen (Müller et al. 2002; Hedrich et al. 2004; Lohmann et al. 2013). Daher konnte ich für meine Versuche auf bereits vorhandene *Primer* und erprobte Protokolle zur Sequenzierung dieser beiden Gene zurückgreifen.

Der zweite Teil meiner experimentellen Arbeiten befasste sich mit der Identifizierung der genetischen Krankheitsursache bei zwei Kindern mit generalisierter Dystonie. Die Indexpatienten wurden durch ein Team aus erfahrenen Ärzten um Prof. Dr. Alexander Münchau (tätig am Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck und am Zentrum für seltene Erkrankungen des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (UKSH) in Lübeck) ausführlich neurologisch untersucht. Daneben wurden weitere diagnostische Untersuchungen wie z.B. EEG, Bildgebung des Kopfes und Blutuntersuchungen durchgeführt, um mögliche bekannte Krankheitsursachen für die bei den Patienten beobachteten Bewegungsstörungen auszuschließen. Den Indexpatienten und deren Eltern wurde Blut abgenommen und eine Trio-Exom-Sequenzierung durchgeführt. Meine Arbeit begann jeweils mit der Filterung der erhaltenen Exom-Datensätze.

Die DNA-Proben aller untersuchten Dystonie-Patienten sowie der betrachteten Kontrollprobanden waren bereits in extrahierter Form vorhanden. In weiterführenden Analysen eingesetzte Zellen (SH-SY5Y-Zellen und Fibroblasten) wurden durch andere Mitglieder der Arbeitsgruppe kultiviert.

1.4 Fragestellungen

Genetische Faktoren bei Alkohol-responsiver Dystonie:

Ziel meiner Untersuchungen war es, weitere Gene (neben *TUBB4A* und *SGCE*) zu finden, in denen Mutationen zu einer Alkohol-responsiven Form der Dystonie führen.

Identifizierung der genetischen Ursache bei zwei Kindern mit generalisierter Dystonie:

Mithilfe des Ansatzes der Trio-Exom-Sequenzierung sollte die genetische Ursache für das bei den jeweiligen Indexpatienten beobachtete Krankheitsbild erforscht werden. Die Plausibilität der Kandidatenvarianten als krankheitsverursachende Mutationen sollte durch Screening gesunder Kontrollprobanden sowie ggf. anschließende Analysen zur Gewebeexpression und funktionelle Studien überprüft werden. Außerdem sollten weitere Patienten mit vergleichbaren Phänotypen auf das Vorhandensein der genetischen Variante getestet werden, um die pathogenetische Relevanz durch Nachweis in einem nicht verwandten Individuum validieren zu können.

2 Material, Methoden und Patienten

Die dieser Dissertation zugrundeliegenden experimentellen Arbeiten fanden im Zeitraum von März 2016 bis Januar 2017 statt. Im Folgenden werden die hierfür verwendeten Materialien aufgelistet sowie die genutzten Methoden erläutert und einige Eckdaten zu den untersuchten Patienten und Kontrollprobanden aufgeführt. Die Exom-Datensätze der betrachteten Patienten wurden im Jahr 2015 erstellt.

2.1 Material

Die nachstehenden Tabellen zeigen die in den experimentellen Arbeiten eingesetzten Reagenzien, Geräte und Programme.

2.1.1 Chemikalien

Substanz	Genauere Produktbezeichnung	Hersteller
Accutase		PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Agar	Bacto Agar	BD (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Agarose	Biozym LE Agarose	Biozym (Hessisch-Oldendorf, Deutschland)
Ampicillin, Salz		SIGMA Life Science (St. Louis, Missouri, USA)
Ampuwa®		Fresenius Kabi (Bad Homburg, Deutschland)
Basic Nucleofactor solution – primary fibroblasts		Lonza (Basel, Schweiz)
Betaine	Betaine solution 5 M, PCR Reagent	SIGMA Life Science (St. Louis, Missouri, USA)
Borsäure		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Bromphenolblau		Riedel- de Haën (Seelze, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)		SIGMA Life Science (St. Louis, Missouri, USA)
DNA - Leiter	100 bp DNA Ladder 1 kb DNA Ladder	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland)
dNTPs	dNTPs Mix 10 mM each	MP Biomedicals (Santa Ana, Kalifornien, USA)
Dulbecco's Modifizierte Medien	Dulbecco's modified eagle medium (DMEM)	Gibco (Dublin, Irland)
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)		Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)

Substanz	Genauere Produktbezeichnung	Hersteller
Ethanol		J.T. Baker (Center Valley, Pennsylvania, USA)
Exonuklease	Exonucleasel conc. 20 U/ μ l	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
FastAP	FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase 1000 units for 1000 reactions	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Fluoromount	DAPI Fluoromount-G [®]	Southern Biotech (Birmingham, Alabama, USA)
Formamid		Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Glycerol	Glycerin	SIGMA Life Science (St. Louis, Missouri, USA)
Hefeextrakt	Bacto yeast extract	BD (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
HiDi Formamide	HiDi Formamide	Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)
HPLC-Wasser	Water HPLC Gradient Grade	J.T. Baker (Center Valley, Pennsylvania, USA)
Midori Green	Midori Green Advance DNA Stain	NIPPON Genetics Europe GmbH (Düren, Deutschland)
Natrium-Azetat (NaAc)	Sodium acetate buffer solution pH 5,2 +/- 0,1, 3M	SIGMA Life Science (St. Louis, Missouri, USA)
Natriumazid (NaN ₃)		Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Nucleofactor solution V		Lonza (Basel, Schweiz)
Paraformaldehyd (PFA)		Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Phosphat-gepufferte Salzlösung	Phosphate buffered saline (PBS)	PAA Laboratories (Pasching, Österreich)
Primer		Eurofins genomics (Ebersberg, Deutschland)
Propanol	2-Propanol (Isopropanol)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Q5 -Polymerase	Q5 Hot Start High Fidelity 2x Master Mix	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland)
Puffer für Restriktionsenzyme	NEB1.1	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland)
Restriktionsenzyme	<i>KpnI</i> , <i>XhoI</i> , <i>DpnI</i>	New England Biolabs GmbH (Frankfurt a.M., Deutschland)
Rinderalbumin	Bovine serum albumin (BSA)	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Sequenzpuffer	Big Dye Terminator v1.1 & v3.1 5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)
Taq-Polymerase	Taq DNA Polymerase 250 U, 5U/ μ l	MP Biomedicals (Santa Ana, Kalifornien, USA)
Taq-Puffer	10x Incubation Mix T.Pol with MgCl ₂	MP Biomedicals (Santa Ana, Kalifornien, USA)

Substanz	Genauere Produktbezeichnung	Hersteller
Terminatormix	Big Dye Terminator v3.1 Sequencing Standard Kit	Applied Biosystems (Foster City, Kalifornien, USA)
Tris		Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Triton X-100		Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)
Trypton	Bacto Tryptone	BD (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Ultrapure water with 0,1 % gelatine		Millipore (Billerica, Massachusetts, USA)
Ziegen-Serum	Normal goat serum	Sigma-Aldrich (St. Louis, Missouri, USA)

2.1.2 Stammlösungen und Medien

Stammlösung/ Medium	Zusammensetzung
5x Tris-Borat-EDTA-Puffer (TBE)	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA
Antikörper-Verdünnungslösung	1 x PBS 3 % BSA [w/v] 0,05 % NaN ₃ [w/v]
Blockier-Lösung	4 % Ziegenserum [v/v] 0,1 % BSA [w/v] 0,1 % Triton X-100 [v/v] 0,05 % NaN ₃ [w/v] In 1 x PBS
Ladepuffer für die Agarosegel-Elektrophorese	50 % Glycerin [v/v] 20 mM EDTA Bromphenolblau
LB-Agar	LB-Medium + 2 % Agar [w/v]
LB-Medium	1 % NaCl [w/v] 1 % Trypton [w/v] 0,5 % Hefeextrakt [w/v] In dH ₂ O
S.O.C.-Medium Invitrogen	S.O.C.-Medium

2.1.3 Kits

Kit	Genauere Produktbezeichnung	Hersteller
Amaxa Cell Line Nucleofector kit V		Lonza (Basel, Schweiz)
cDNA-Synthese -Kit	Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Gel-Extraktion	QIAquick Gel Extraction Kit (250)	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
MaxiPrep	EndoFree Plasmid Maxi Kit (10)	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
MiniPrep	QIAPrep Spin Mini Prep Kit 250	QIAGEN (Hilden, Deutschland)
Mutagenese-Kit	QuikChange II Site-Directed Mutagenesis Kit	Agilent Technologies (Santa Clara, Kalifornien)

2.1.4 Antikörper und Vektoren

Antikörper/ Vektor	Hersteller
Mouse anti-FLAG	Novus biologicals (Littleton, Colorado, USA)
Goat anti-Mouse IgG, Alexa Fluor 488	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Venus-156-239-Gβ1-WT-Plasmid	N. Lambert (Georgia Regents University)

2.1.5 Zellen

Zellen	Genauere Produktbezeichnung	Hersteller
Elektrokompetente <i>E. coli</i>	One Shot® TOP10 Electrocomp™ <i>E. coli</i>	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Fibroblastenkulturen		Von Patienten abstammend
Humane Neuroblasten-Zelllinie	SH-SY5Y	ATCC (Manassas, Virginia, USA)

2.1.6 Geräte

Gerät	Genauere Produktbezeichnung	Hersteller
ApoTome		Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
Brutschrank		Heraeus (Hanau, Deutschland)
Cycler	Flex Cycler	Analytikjena AG (Jena, Deutschland)
	MJ Mini Personal Thermal Cycler	BIORAD (Hercules, Kalifornien, USA)
	PTC-100 Programmable Thermo Controller	MJ Resaerch (Waltham, Massachusetts, USA)
	PTC-200 Peltier Thermal Cycler	MJ Research (Waltham, Massachusetts, USA)
	Vapo.protect Mastercycler pro	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Elektroporator	Electroporator 2510	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Gel-Elektrophorese	Electrophoresis Power Supply EPS 301	Amersham pharmacia biotech (Little Chalfont, UK)
	Electrophoresis Power Supply EPS 500/400	Amersham pharmacia biotech (Little Chalfont, UK)
Heizblock	VWR Digital Heatblock	HLC (Bovenden, Deutschland)
Kamera		Canon (Tokio, Japan)
Mikroskop	Axiovert 200M Inverted Microscope	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
NanoDrop	Nanodrop Spectrophotometer ND-1000	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen, Deutschland)
Sequencer	3130 XL Genetic Analyser	Applied Biosystems / HITACHI (Foster City, Kalifornien, USA)
	3500 XL Genetic Analyer	Applied Biosystems / HITACHI (Foster City, Kalifornien, USA)
UV-Lichtquelle	DarkHood DH-50	Biostep GmbH (Burkhardtsdorf, Deutschland)
Werkbank	Bench-top laminar flow hood	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
Zellzählgerät	Countess automated cell counter	Invitrogen (Carlsbad, Kalifornien, USA)
Zentrifugen	Biofuge A	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)
	Centrifuge 5804	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
	Microfuge 22 R Centrifuge	Beckmann Coulter (Brea, Kalifornien, USA)
	Multifuge 1 S-R	Thermo Fisher Scientific (Waltham, Massachusetts, USA)

2.1.7 Programme

Software	Hersteller
AxioVision Rel 4.8	Zeiss (Oberkochen, Deutschland)
BioEdit Sequence Alignment Editor version 7.2.5 (Copyright © 1997-2013)	Tom Hall, Ibis Biosciences, (Carlsbad, Kalifornien, USA) Download unter www.mbio.ncsu.edu/bioedit/bioedit.html
Gene Runner Version 6.0.25 Beta (Copyright © 1992-2016)	Frank Buquicchio Download unter www.generunner.net
Mutation Surveyer [®] V3.30 DNA Variant Analysis Software	SoftGenetics [®] , (State College, Pennsylvania, USA)
Oligo Explorer 1.1.0 (Copyright © 2000-2002)	Teemu Kuulasma (Kuopio Finnland)
Sequencing Analysis Software Version 5.3.1	Applied Biosystems Foster City, Kalifornien, USA

2.1.8 Websites

Website	Internetadresse
Berkely Drosophila Genome Project (BDGP) Splice Site prediction	https://fruitfly.org
Combined Annotation Dependent Depletion (CADD)	https://cadd.gs.washington.edu
DECIPHER	https://decipher.sanger.ac.uk
ExAC Browser (Beta) / Exome Aggregation Consortium	https://exac.broadinstitute.org
Expression Atlas	https://www.ebi.ac.uk/gxa/home
e!Ensembl Genome Browser	https://ensembl.org/index.html
gnomAD	http://gnomAD.broadinstitute.org
MutationTaster	www.mutationtaster.org
OMIM – Online Mendelian Inheritance in Man [®]	https://www.omim.org
Proteinatlas	https://www.proteinatlas.org
PubMed	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
SNP check	https://secure.ngri.org.uk/SNPCheck/snpcheck.htm
UCSC Genome Browser	https://genome.ucsc.edu
UniProt	https://www.uniprot.org

2.2 Patienten und Kontrollen

Für die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Untersuchungen lag jeweils ein positives Votum der Ethikkommission der Universität zu Lübeck vor. Die Titel der Anträge an die Ethikkommission sind mit Nennung des Aktenzeichens und des Datums der Genehmigungsschreiben im Anhang dieser Arbeit unter „7.4 Votum der Ethikkommission“ zu finden.

Patienten mit Alkohol-responsiver Dystonie:

Über die *Dystonia Coalition* (USA) waren insgesamt 318 DNA-Proben von Patienten mit Alkohol-responsiver Dystonie verfügbar. Aus den 318 wurden neun Patienten (Dys480, Dys499, Dys572, Dys631, Dys780, Dys861, Dys1233, L-8352, L-8353) mit positiver Familienanamnese ausgewählt und mit den entsprechenden DNA-Proben eine Exom-Sequenzierung durchgeführt. Die Exom-Datensätze lagen mir zu Beginn meiner Promotionsarbeit in einer kombinierten Excel-Datei vor. Zwei der neun Individuen (L-8352 und L-8353) waren miteinander verwandt.

Zur Validierung der im Rahmen meiner Untersuchungen identifizierten Kandidatengene wurden die DNA-Proben der 309 weiteren Patienten mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Von diesen Patienten waren 206 weiblich und 103 männlich. Das durchschnittliche Erkrankungsalter (Daten von 267 Individuen verfügbar) lag bei 37,3 Jahren (mit einer Spanne von 0 – 71 Jahren). Der Alkoholkonsum wurde durchschnittlich im Alter von 54,5 Jahren begonnen (Spanne zwischen 18 und 85 Jahren). Im Falle von 244 Personen lagen Daten zur Familienanamnese vor. Diese war bei 59 Individuen positiv.

Junge Patienten mit generalisierter Dystonie:

Außerdem habe ich im Rahmen meiner Doktorarbeit nach der genetischen Krankheitsursache bei zwei jungen Patienten mit generalisierter Dystonie gesucht.

Im ersten Fall (Familie 1) handelte es sich bei der Indexpatientin um ein im Jahr 2001 geborenes Mädchen, das unter einer komplexen Dystonie leidet (Abb. 3). Nach komplikationsloser Schwangerschaft und Geburt fiel im Alter von wenigen Monaten zum ersten Mal ein Bewegungsmangel auf. Die sogenannten Meilensteine der Entwicklung im Bereich von Kognition und Motorik wurden erst deutlich verzögert erreicht. Die Patientin konnte im Alter von 5 Jahren laufen und etwa im Alter von 10 Jahren einige Worte sprechen. In den frühen Jugendjahren kam es zu einer Progression der motorischen Auffälligkeiten und es entwickelten sich Gesichtszuckungen, Rumpfvordrehungen und ruckartige Beinbewegungen. Außerdem leidet die Patientin unter einer geistigen Entwicklungsverzögerung. Weitere klinische Zeichen sind eine sehr begrenzte Sprachproduktion, eine generelle Hypotonie, eingeschränkte Bewegungs- und Haltungskontrolle, ein



Abbildung 3: Foto der Indexpatientin aus Familie 1.

Man erkennt dystone Fehlhaltungen von Hals, Rumpf und Extremitäten (aus Steinrücke et al. 2016, Abb.1 A).

dystonischer Gang sowie ein aktions-induzierter Myoklonus. Die Exom-Sequenzierung der erkrankten Indexpatientin und ihrer nicht betroffenen Eltern, dem Ansatz der Trio-Exom-Sequenzierung entsprechend, wurde bei der Firma Centogene AG (Rostock) durchgeführt.

Zur Überprüfung identifizierter Kandidatengene und zur Ermittlung weiterer Mutationsträger wurden DNA-Proben von Patienten mit ähnlichen Krankheitsbildern mittels Sanger-Sequenzierung untersucht.

Es handelte sich hierbei um DNA-Proben von 51 nicht verwandten, größtenteils deutschen Patienten (davon 21 männlich, durchschnittliches Alter $14,4 \pm 11,1$ Jahre mit einer Spanne von 2-50 Jahren), die unter einer

Kombination aus epileptischen Anfällen, psychomotorischer Entwicklungsverzögerung, Intelligenzminderung und verzögerter Sprachentwicklung litten. Für diese Patienten waren zuvor Mutationen in dem Gen *SCNA2* ausgeschlossen worden. Darüber hinaus wurden DNA-Proben von 40 serbischen Patienten analysiert, die von einem RETT-

Syndrom-ähnlichen Krankheitsbild betroffen waren. Davon waren 37 Personen weiblich mit einem mittleren Alter von $10,2 \pm 4,0$ Jahren (Spanne 4 -20 Jahre). Diese Patienten waren zuvor negativ auf Mutationen im Gen *MECP2* getestet worden.

Im zweiten Fall einer von mir bearbeiteten Trio-Exom-Sequenzierung wurden die DNA-Proben einer deutschstämmigen Familie (Familie 2) untersucht. Der erkrankte (männliche) Indexpatient leidet unter einer rechts- und armbetonten isolierten generalisierten Dystonie. Er wurde in der 41. Schwangerschaftswoche spontan geboren. Die motorische Entwicklung stellte sich etwas verzögert dar, jedoch konnte er mit 12 Monaten frei laufen. Die kognitive und die Sprachentwicklung verliefen unauffällig. Erste Symptome in Form eines Schreibkrampfes traten im Alter von 7 Jahren auf.

Innerhalb von zwei Jahren breiteten sich die Verkrampfungen auf den gesamten rechten Arm, die rechte Schulter und den Rücken aus. Außerdem traten unwillkürliche kreisende Arm- und krallende Handbewegungen rechts auf. Daneben konnten im Verlauf auch dystone Fehlhaltungen am linken Arm und den Beinen beobachtet werden. Die schwere Dystonie führte konsekutiv zu einer deutlichen Rückenskoliose sowie erheblichen Stand- und Gangproblemen, sodass der Patient etwa ab dem 10. Lebensjahr einen Rollstuhl zur Fortbewegung benötigte. Die beiden Eltern sowie der Halbbruder des Patienten sind nicht von der Krankheit betroffen.

Weiterhin wurden die DNA-Proben von 160 (davon 90 männlichen) an verschiedenen Dystonie-Formen leidenden Patienten untersucht. Das durchschnittliche Erkrankungsalter betrug 17,4 Jahre (Spanne zwischen 0 – 30 Jahre; Daten für 148 Individuen verfügbar). Von 120 Patienten, für welche Informationen zur Familienanamnese vorlagen, war diese bei 44 Personen positiv.

Kontrollen:

Die in den verschiedenen Projekten verwendeten Kontrollproben entstammten einem Kollektiv von insgesamt 374 gesunden deutschen Individuen. Davon waren 182 männlich und 192 weiblich. Das durchschnittliche Alter betrug 73,2 Jahre (Stand 31.12.2016). Die Proben wurden im Institut für Neurogenetik im Rahmen der EPIPARK-Kohorte gesammelt.

2.3 Methoden

Das von mir angewandte Spektrum an Methoden umfasste sowohl computer-gestützte Analysen („*Dry lab*“) als auch verschiedenste molekulargenetische Verfahren („*Wet lab*“). Die einzelnen Arbeitsschritte werden im Folgenden detailliert vorgestellt.

2.3.1 Computer-gestützte Methoden

Zu den eingesetzten computer-gestützten Methoden gehörten die Filterung von Exom-Datensätzen zur Identifizierung von potenziell pathogenen genetischen Varianten sowie *in silico*-Analysen bestimmter DNA-Sequenzen zur Überprüfung, ob in ihnen das sogenannte Alkohol-responsive Element enthalten ist (siehe 1.2.3.3 Alkohol-responsive Gene).

2.3.1.1 Filtern der Exom-Datensätze

Im Rahmen einer Exom-Sequenzierung werden pro Individuum zahlreiche vom menschlichen Referenzgenom abweichende Veränderungen detektiert. Für diese werden von den ausführenden Firmen Datensätze bereitgestellt, die etliche weiterführende Informationen enthalten, u.a. die Position, das betroffene Gen, die Art der Variante und die Populationsfrequenz.

Als erster Schritt auf der Suche nach einer krankheitsauslösenden Mutation müssen durch Filterung der Datensätze möglichst viele „harmlose“ Polymorphismen von weiteren Betrachtungen ausgeschlossen werden. Denn aus finanziellen und zeitlichen Gründen ist es nur möglich, eine sehr geringe Zahl an Kandidatengenen zu überprüfen und gegebenenfalls in folgenden Versuchen deren funktionellen Auswirkungen weiter zu erforschen.

Filterung der Exom-Datensätze von neun Patienten mit Alkohol-responsiver Dystonie

Als Ausgangspunkt lag mir eine Excel-Datei mit den kombinierten Exom-Datensätzen von neun unter Alkohol-responsiver Dystonie leidenden Patienten vor. Zuvor war die Datei bereits auf Varianten mit einer Populationsfrequenz von $\leq 0,01$ in der Allgemeinbevölkerung vorgefiltert und eine Qualitätsfilterung durchgeführt worden.

Da es sich bei der Alkohol-responsiven Dystonie um eine seltene Bewegungsstörung handelt, wurde nur nach Varianten mit einer Populationsfrequenz von $< 0,001$ gesucht. Beruhend auf der Hypothese, dass sich die krankheitsverursachende Mutation auf die jeweilige Proteinstruktur auswirken muss, wurden lediglich Varianten, die sich innerhalb von Exons befinden oder Spleiß-Stellen betreffen, beibehalten. Synonyme Varianten wurden ausgeschlossen (s. Abb. 4).

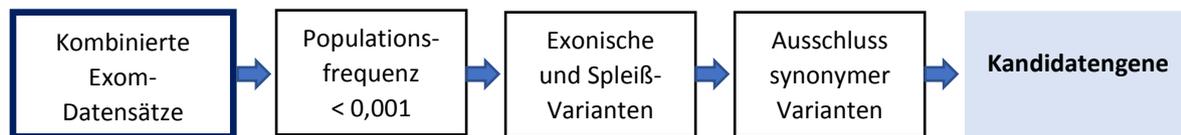


Abbildung 4: Filterschritte zur Identifizierung von potenziell krankheitsverursachenden Varianten (Kandidatengen) ausgehend von den kombinierten Exom-Datensätzen von neun Patienten mit Alkohol-responsiver Dystonie. Die verwendete Datei war bereits vorgefiltert worden (Qualitätsfilter, Populationsfrequenz $\leq 0,01$).

Filterung der Trio-Exom-Datensätze

In diesen Fällen standen am Beginn der Filterkaskaden jeweils Trio-Exom-Datensätze mit genetischen Varianten der erkrankten Indexpatienten sowie ihrer gesunden Eltern. Um unter den mehr als 100.000 aufgelisteten Varianten die potenziell krankheitsverursachenden Mutationen identifizieren zu können, wurden die nachfolgend erklärten Filterschritte unternommen.

Als erster Schritt wurde nach den drei in Betracht gezogenen Vererbungsmodi gefiltert: *de novo* heterozygot, homozygot und compound heterozygot. Für den compound heterozygoten Erbgang wurde zunächst nach Varianten gefiltert, die sowohl beim Indexpatienten als auch einem Elternteil in heterozygoter Form vorhanden sind. In einem späteren Schritt wurde „per Hand“ nach Genen gesucht, in denen der Indexpatient genau zwei Varianten im gleichen Gen aufweist, wobei eine von der Mutter und die andere vom Vater vererbt sein musste. Im Falle des erkrankten männlichen Indexpatienten wurde zusätzlich ein X-chromosomaler Erbgang in Erwägung gezogen. Hierfür wurden Varianten, die bei der Mutter in heterozygoter und beim Patienten in hemizygoter Form vorhanden waren, nach X-chromosomalen Varianten gefiltert. Da der Patient als männliches Individuum nur ein X-Chromosom besitzt, bedeutet ein „hemizygoter“ Zustand, dass 100 % der X-Allele betroffen sind.

Angesichts der Seltenheit der jeweils beobachteten Krankheitsbilder und der Überlegung, dass die Mutationen eine hohe Penetranz aufweisen und daher in der gesunden Bevölkerung nicht vorkommen dürften, wurden nur Varianten mit einer Populationsfrequenz von $\leq 0,01$ berücksichtigt. Intronische sowie synonyme Varianten innerhalb der Exons wurden herausgefiltert und nur exonische nicht-synonyme SNVs (SNV = *single nucleotide variant*: Nukleotid-Austausch, der nur eine einzelne Position betrifft), Deletionen und Insertionen sowie Spleiß-Stellen-Varianten weiter betrachtet. Um die Anzahl der falsch-positiven Treffer durch systematische Fehler sowie Fehler beim

Sequenzieren oder *Alignment* zu minimieren, wurden weitere Qualitätsfilter angewandt, welche die „Ablesehäufigkeit“, „Frequenz“, „Qualität“ und die „in-Haus-Statistik“ betrafen. Die gewählten Kriterien und *Cut-off*-Werte sind in Tabelle 1 aufgeführt.

Tabelle 1: Gewählte Filterkriterien zur Filterung der Trio-Exom-Datensätze.

Spalte	Erlaubte Werte/ Stichworte		
Vererbungsmodus	De novo heterozygot	Compound heterozygot	homozygot
	Index: Mutter: Vater	Index: Mutter: Vater	Index: Mutter: Vater
	Het: n/a: n/a Het: abs: n/a Het: n/a: abs	Het: n/a: Het Het: abs: Het Het: Het: n/a Het: Het: abs	Hom: Het: Het
Maximale Populationsfrequenz	≤ 0,01		
Distanz zum nächsten Exon	< 3		
Lokalisation der Variante	Exonic, splicing		
Exonische Veränderung durch die Variante	Frameshift/ nonframeshift deletion, insertion, substitution; nonsynonymous SNV; stopgain; stoploss		
Ablesehäufigkeit	≥ 20		
Frequenz der Variante beim Indexpatienten	25 ≤ x ≤ 75	25 ≤ x ≤ 75	≥ 75
Qualitäts-Index	≥ 100		
In-Haus-Statistik	0/1 of n 0/2 of n 0/3 of n	0/1 of n 0/2 of n 0/3 of n	1/1-6 of n 2/1-6 of n 3/1-6 of n

Die Bezeichnungen unter „Erlaubte Werte/Stichworte“ entsprechen den jeweiligen Benennungen in den Excel-Dateien mit den Trio-Exom-Datensätzen. Die Abkürzungen „Hom“ und „Het“, bedeuten, dass die an dieser Stelle detektierte Variante bei der entsprechenden Person in *Het* = heterozygoter oder *Hom* = homozygoter Form vorhanden ist. „n/a“ bzw. „abs“ stehen für den Wildtyp bzw. dass keine Daten zu der Position vorhanden sind. Beim männlichen Indexpatienten wurde zusätzlich ein X-chromosomaler Erbgang geprüft (hier nicht dargestellt). In der Zeile „In-Haus-Statistik“ haben die Angaben nach dem Muster x/y of n folgende Bedeutung: x = Anzahl der Exome, in der die Variante in homozygoter Form detektiert wurde, y = Anzahl der Exome, in der die Variante in heterozygoter Form detektiert wurde, n = Anzahl der in der ausführenden Firma untersuchten Exome. SNV = *single nucleotide variant* (Nukleotid-Austausch, der nur eine einzelne Position betrifft).

In der Spalte der „in-Haus-Statistik“ wurden für die heterozygoten Vererbungsgänge maximal 3 heterozygote und keine homozygoten Treffer erlaubt. Für den homozygoten Erbgang wurden maximal 3 homozygote und/ oder maximal 6 heterozygote Detektionen der betrachteten Variante erlaubt. Würde eine in der Allgemeinbevölkerung seltene Variante überdurchschnittlich oft bei Sequenzierungen durch diese Firma gefunden werden, würde dies auf einen systematischen Fehler und damit auf einen falsch-positiven Treffer hindeuten. Schließlich wurden im Fall der *de novo*-

Varianten Gene aussortiert, die mehrere sehr seltene Veränderungen enthielten. Multiple Varianten sprechen für ein eher veränderliches Gen, in dem allgemein häufiger Polymorphismen vorkommen und dafür, dass die einzelnen Varianten nicht so beeinträchtigend sind.

Als letzter Schritt wurden die wissenschaftlichen Datenbanken *PubMed*, *OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man)* *Expression Atlas* und *UniProt* nach Informationen zur Genfunktion, zu eventuell bereits bekannten mit Mutationen in diesem Gen assoziierten Erkrankungen und Expressionsdaten durchsucht. Auch in den Exom-Datensätzen angegebene Scores von *in silico*-Prädiktionsprogrammen bezüglich der möglichen Pathogenität der Varianten wurden berücksichtigt, um einige wenige, vorrangig interessante Kandidatengene zu definieren, die dann im „*Wet Lab*“ mittels molekulargenetischer Methoden weiter untersucht wurden (s. Abb. 5).

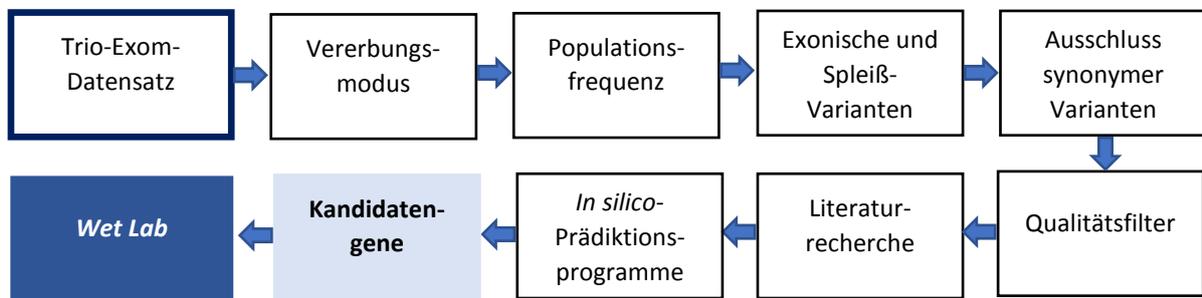


Abbildung 5: Schematische Darstellung der notwendigen Filter- und Arbeitsschritte zur Identifizierung von potenziell krankheitsverursachenden Varianten (Kandidatengenen) ausgehend von einem Trio-Exom-Datensatz.

2.3.1.2 *In silico*-Analyse: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in den durch Filterung von Exom-Daten identifizierten Kandidatengenen

Aus der Literatur ist bekannt, dass einige Gene, deren Regulation sich nach Genuss von Alkohol ändert, in ihren Exons oder in ihrem Promotorbereich ein sogenanntes Alkohol-responsives Element (ARE) aufweisen (Kwon et al. 2004; Pignataro et al. 2007).

Als weitere computergestützte Vorarbeit im Rahmen der Suche nach genetischen Faktoren bei Alkohol-responsiven Dystonien erfolgte daher die Überprüfung, ob das ARE im Bereich der cDNA bzw. bis zu 5000 bp vor oder hinter der codierenden Sequenz der identifizierten Kandidatengene zu finden sei. Die Kandidatengene waren nach Filterung der kombinierten Exom-Datensätze von neun an Alkohol-responsiver Dystonie erkrankten Individuen definiert worden (siehe 2.3.1.1 Filtern der Exom-Datensätze und Abbildung 4 im Methodenteil bzw. Abschnitte 3.1.2 und 3.1.6 im Ergebnisteil). Bei den betrachteten Genen handelte es sich um: *MAP4K3*, *MAP2K2*, *MBTPS1*, *PRKCQ*, *SCFD2* und *SNAP91*. Ebenfalls untersucht wurde der entsprechende Bereich für die bekanntermaßen mit Alkohol-responsiver Dystonie assoziierten Gene *SGCE* und *TUBB4A*.

Dafür wurde mit Hilfe des Genombrowsers *Ensembl* (www.ensembl.org/index.html) die cDNA-Sequenz des interessierenden Gens heruntergeladen. Waren mehrere cDNA-Transkripte verfügbar, wurden alle, die ein vollständiges Protein codieren, betrachtet. Der Genombrowser der University of California, Santa Cruz (*UCSC Genome Browser*, <https://genome.ucsc.edu>) wurde genutzt, um jeweils die Nukleotidsequenz 5000 bp vor Translationsstart und nach Translationsende des entsprechenden Gens herunterzuladen. Hier wurden die Positionsangaben der ersten beim *UCSC Genome Browser* gelisteten Genvariante genutzt. Die Sequenz wurde in das Programm *Gene Runner* eingegeben. Mit der Suchfunktion „Find“ wurde innerhalb der eingefügten Nukleotidsequenz nach dem ARE, bestehend aus den Basen TCTGCGTCTCT gesucht. Das Programm *Gene Runner* betrachtet dabei sowohl den Vorwärts- als auch den Rückwärtsstrang. Konnte so kein Treffer gefunden werden, wurden nach und nach mehr Fehlpaarungen erlaubt, denn es ist bekannt, dass nicht alle Basen des ARE gleich stark konserviert sind. Innerhalb des Motivs „tCTGcGTcTcT“ weisen die in Großbuchstaben geschriebenen Basen eine hohe Konservierung auf, während die restlichen Basen eine gewisse Degeneration zeigen (Pignataro et al. 2009).

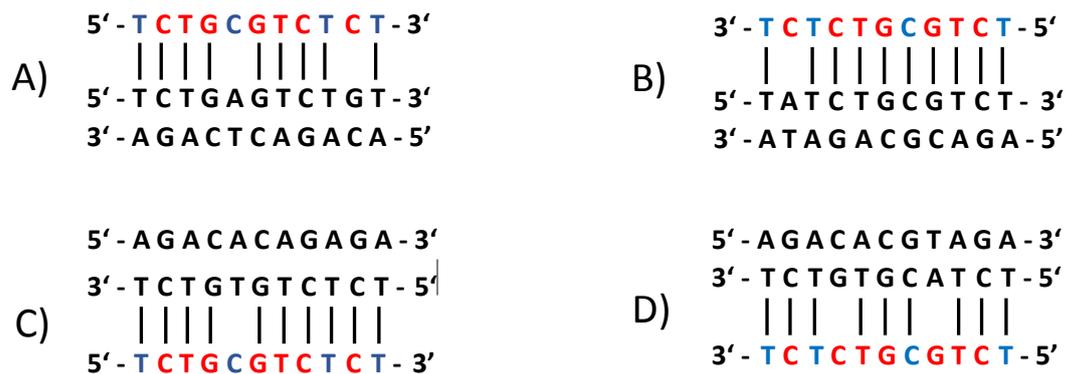


Abbildung 6: Illustration der Überprüfung, ob in der DNA-Sequenz bestimmter Gene das sogenannte Alkohol-responsive Element enthalten ist mithilfe der Software „Gene Runner“ (am Beispiel zufällig ausgewählter DNA-Sequenzen).

Bei der in roter und blauer Farbe dargestellten Sequenz handelt es sich um die Basenabfolge des Alkohol-responsiven Elements (ARE). Konservierte Basen sind in rot geschrieben, als veränderlich beschriebene Positionen in blau. Die Sequenzen der Doppelstrang-DNA sind hier zur Illustration zufällig ausgewählt worden.

A) Vergleich des ARE in 5'-3'-Richtung mit dem Vorwärts-DNA-Strang. Es gibt zwei Fehlpaarungen. Davon betrifft die erste eine veränderliche Base und die zweite eine konservierte Base. B) Vergleich des ARE in 3'-5'-Richtung mit dem Vorwärts-DNA-Strang. Es gibt eine Fehlpaarung. Diese betrifft eine konservierte Base. C) Vergleich des ARE in 5'-3'-Richtung mit dem Rückwärts-DNA-Strang. Es gibt eine Fehlpaarung an einer veränderlichen Position. D) Vergleich des ARE in 3'-5'-Richtung mit dem Rückwärts-DNA-Strang. Zwei konservierte Basen sind von Fehlpaarungen betroffen.

Für den cDNA-Bereich wurden maximal 3, für den Bereich 5000 bp davor und dahinter maximal 2 Fehlpaarungen erlaubt. Da in der Literatur außerdem die Möglichkeit genannt wird, dass das Motiv des ARE bezüglich der Orientierung in beide Richtungen wirksam ist (Kwon et al. 2004) wurde die Nukleotidsequenz ebenfalls nach der gespiegelten Basenabfolge „TCTCTGCGTCT“ abgesucht. Eine Illustration zum besseren Verständnis findet sich in Abbildung 6. Auch in diesem Fall wurden nach und nach mehr Fehlpaarungen erlaubt. Anschließend wurden die gefundenen Treffer mit

Fehlpaarungen manuell daraufhin untersucht, ob es sich bei den betroffenen Positionen um stark konservierte Basen des ARE handelte.

2.3.2 Molekulargenetische Methoden

Die Versuchsaufbauten der von mir genutzten molekulargenetischen Methoden werden auf den folgenden Seiten ausführlich vorgestellt. Zunächst folgt eine Darstellung der Methoden, die in allen im Rahmen meiner Promotionsarbeit durchgeführten Projekten angewendet wurden (konventionelle Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und Sanger-Sequenzierung). Danach folgen Erläuterungen der Verfahren, die zur weiteren Evaluierung des Kandidatengens *GNB1* genutzt wurden (Expressionsanalyse, Mutagenese, Klonierung, Immunfärbung).

2.3.2.1 PCR

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine Methode zur Vervielfältigung von Nukleinsäure-Abschnitten. Um einen bestimmten DNA-Bereich amplifizieren zu können, werden spezifische *Primer* (DNA-Oligonukleotide mit einer Länge von etwa 20-25 bp) designt, welche komplementär an den Enden des zu vervielfältigenden DNA-Abschnitts binden. Während der PCR wird dann genau der zwischen den beiden *Primern* liegende DNA-Bereich vermehrt.

Der Ablauf einer PCR gliedert sich typischerweise in 30 – 40 Zyklen aus drei verschiedenen Phasen: der Denaturierung, dem *Annealing* und der Elongation. Im ersten Schritt, der Denaturierung, werden die Doppelstränge des DNA-*Templates* bei 95°C aufgetrennt. Während des anschließenden *Annealings* binden die *Primer* an die Einzelstränge. Die Auswahl der *Annealing*-Temperatur orientiert sich an der Schmelztemperatur der verwendeten *Primer*, welche meist zwischen 55°C und 65°C liegt. In der Phase der Elongation verlängert das Enzym DNA-Polymerase die *Primer* mit den im Reaktionsansatz enthaltenen Nukleotiden. So entsteht ein zu dem Einzelstrang-*Template* komplementärer neuer DNA-Strang.

Neben der im Folgenden beschriebenen „konventionellen“ PCR gibt es weitere PCR-Reaktionen wie die Reverse Transkriptions-PCR, die Real Time-PCR oder die Mutagenese-PCR, die für bestimmte Fragestellungen eingesetzt werden. Weitere von mir angewendete PCR-Reaktionen stelle ich weiter unten im Zusammenhang mit komplexeren Versuchsaufbauten vor, in deren Kontext sie durchgeführt wurden.

Konventionelle PCR

Die konventionelle PCR wird zum Beispiel verwendet, um ausgehend von einer genomischen DNA-Probe ein bestimmtes Exon eines interessierenden Gens zu amplifizieren. Der Standard-

Reaktionsansatz für eine PCR ist in Tabelle 2 und die Standard-Konditionen für die verschiedenen PCR-Phasen sind in Tabelle 3 dargestellt. Die eingesetzten *Annealing*-Temperaturen für die einzelnen verwendeten *Primer* sowie abweichende Elongations-Zeiten und variierende Zusammensetzungen der PCR-Ansätze sind in der *Primer*-Tabelle im Anhang vermerkt.

Tabelle 2:
Reaktionsansatz
für eine Standard-PCR.

Substanz	Volumen (in µl)
HPLC-Wasser	4,23
dNTPS	3,0
Taq-Puffer	1,5
Vorwärts-Primer (c = 10ng/µl)	0,6
Rückwärts-Primer (c = 10ng/µl)	0,6
Taq-Polymerase	0,07
DNA (c = 10 ng/µl)	5

Tabelle 3:
Konditionen für eine
Standard-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	5 Min.	1
Denaturierung	95°C	30 Sek.	35
<i>Annealing</i>	<i>Annealing</i> -Temperatur (zwischen 55°C und 65°C)	30 Sek.	
Elongation	72°C	30 Sek.	
Finale Elongation	72°C	10 Min.	1
Kühlung	4°C		1

2.3.2.2 Sanger-Sequenzierung

Die Sanger-Sequenzierung dient dazu, die genaue Basenabfolge eines interessierenden Nukleinsäure-Abschnitts darzustellen. Dafür müssen verschiedene Versuchsschritte durchlaufen werden: PCR, Gel-Elektrophorese, Exo Fast-Behandlung, Sequenz-Reaktion, Fällung und die eigentliche Sequenzierung (Abb. 7).

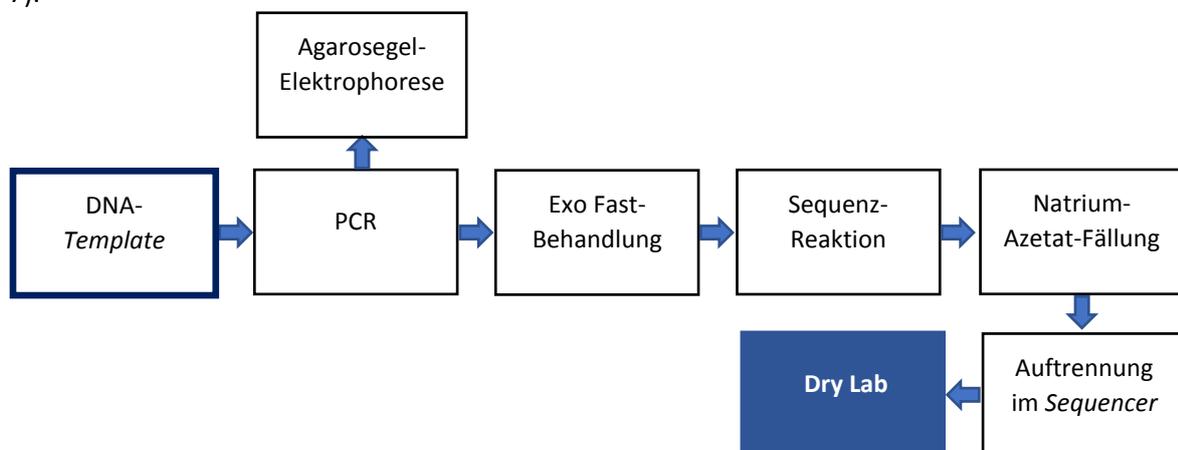


Abbildung 7: Arbeitsschritte im Rahmen einer Sanger-Sequenzierung – vom DNA-Template zur digitalen Darstellung der Sequenz.

Am Ende der Versuchsfolge wird die Basenfolge schließlich in einem sogenannten *Sequencer* detektiert und kann dann mithilfe eines Computer-Programms dargestellt und ausgewertet werden (*Dry Lab*).

2.3.2.3 Gel-Elektrophorese

Die Agarosegel-Elektrophorese ist ein Verfahren zur Auftrennung von Molekülen unterschiedlicher Größe und Dichte in einem angelegten Spannungsfeld. Je kleiner die aufgetragenen Moleküle (z.B. PCR-Produkte) sind, desto weiter wandern sie in einer vorgegebenen Zeit. Durch Vergleich mit einer mitgelaufenen DNA-Basenpaarleiter, welche DNA-Fragmente definierter Länge enthält, lässt sich so die Länge eines PCR-Produkts abschätzen.

Abhängig von der erwarteten Länge der aufzutrennenden DNA-Fragmente, wurden unterschiedliche Agarose-Konzentrationen eingesetzt, da diese die Porengröße des Gels bedingen. Bis zu einer erwarteten Länge von bis zu 1000 bp habe ich 1,5 %-ige Agarosegele verwendet und für längere DNA-Fragmente 1 %-ige Agarosegele.

Durchführung

Zur Herstellung eines 1,5 %-igen Agarosegels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1 x TBE gegeben und das Gemisch für ca. 3 Minuten bei 800 Watt in einer Mikrowelle erhitzt. Anschließend wurden 5 µl *Midori Green* hinzu pipettiert und die Komponenten mithilfe eines Magnetrührers für ca. 10 Minuten vermischt. Währenddessen wurde ein Schiffchen geeigneter Größe in das entsprechende Gestell eingespannt und schließlich die Gellösung in das Schiffchen gegossen. Die Kämme mit der gewünschten Taschenbreite wurden in die vorgesehenen Halterungen eingesetzt und das Gel für ca. 30 Minuten zum Aushärten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Dann wurde das Gel in die Elektrophorese-Kammer mit 1 x TBE-Puffer gelegt, sodass es komplett mit Puffer bedeckt war. Die PCR-Produkte wurden mit einem Ladepuffer gemischt (3 µl PCR-Produkt + 3 µl Ladepuffer). Anschließend wurden die DNA-Basenpaarleiter und die PCR-Produkte in die Geltaschen pipettiert und durch Anlegen eines elektrischen Feldes mit 120 V und 400 A für 20 Minuten aufgetrennt. Die DNA-Banden wurden schließlich unter einer UV-Lichtquelle betrachtet und dokumentiert.

2.3.2.4 Exo Fast-Behandlung im Rahmen der Sequenzierung

Die Behandlung des PCR-Produkts mit dem Enzym Exonuklease I sowie der thermosensitiven alkalischen Phosphatase FastAP dient der Aufreinigung des PCR-Produkts bevor es in weiteren Reaktionsschritten z.B. zur Sequenzierung eingesetzt wird. Die alkalische Phosphatase dephosphoryliert alle Arten von DNA-Enden und die Exonuklease baut einzelsträngige DNA in 3'-5'-Richtung ab. Somit werden *Primer* (einzelsträngige Oligonukleotide) und freie dNTPs, die während der PCR-Reaktion nicht verbraucht wurden, aus der Mixtur entfernt bzw. inaktiviert.

Durchführung

Exonuklease I und FastAP wurden im Verhältnis 1:2 gemischt und zu dem PCR-Produkt gegeben (1 µl Exo Fast auf 10 µl PCR-Produkt). Dieser Reaktionsansatz wurde mithilfe eines *Cyclers* zunächst für 15 Minuten auf 37°C und anschließend zur Inaktivierung der Enzyme für 15 Minuten auf 85°C erhitzt. Danach erfolgte eine Kühlung bei 4°C bis das Exo Fast-Produkt weiterverwendet wurde.

2.3.2.5 Sequenz-Reaktion

Vergleichbar mit einer PCR-Reaktion, erfolgt beim Kettenabbruch-Verfahren nach Sanger die Synthese eines neuen DNA-Strangs komplementär zu einem vorgegebenen DNA-*Template*. Ein Sequenz-Ansatz enthält ein DNA-*Template* (z.B. ein PCR-Produkt nach Exo Fast-Behandlung), einen *Primer* (Vorwärts- oder Rückwärts-*Primer*), eine DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotide (dNTPs) sowie zusätzlich fluoreszenz-markierte 2',3'-Dideoxynukleotide (ddNTPs). Den ddNTPs fehlt - im Gegensatz zu den dNTPs - das zur Verlängerung des DNA-Strangs notwendige freie 3'-OH-Ende, sodass jeweils nach dem Einbau eines ddNTPs die Synthese an dieser Position abbricht. Die Mengen der dNTPs und ddNTPs im Reaktionsansatz stehen in einem definierten stochastischen Verhältnis zueinander und ihr Einbau in die zu verlängernden DNA-Stränge erfolgt zufällig. Dadurch entstehen DNA-Fragmente unterschiedlicher Länge, die an ihrem 3'-OH-Ende jeweils ein fluoreszenz-markiertes ddNTP enthalten. In einem sogenannten *Sequencer* werden diese DNA-Fragmente ihrer Länge entsprechend aufgetrennt. Mithilfe eines Lasers wird dann detektiert, ob es sich bei dem endständigen fluoreszenz-markierten Nukleotid um ein ddATP, ddTTP, ddCTP oder ddGTP handelt. Die so ermittelte Basenfolge kann schließlich in einem Computer-Programm dargestellt werden.

Durchführung

Der verwendete Standard-Reaktionsansatz für eine Sequenz-PCR ist in Tabelle 4 und die Standard-Konditionen für die verschiedenen Phasen der Sequenz-PCR sind in Tabelle 5 dargestellt.

Tabelle 4:
Reaktionsansatz
für eine Standard-
Sequenz-PCR

Substanz	Volumen (in µl)
Exo Fast-Produkt	1
5 x Sequenz-Puffer	1,5
<i>Primer</i> (Vorwärts- oder Rückwärts), c = 10 ng/µl	0,5
Terminatormix 3.1	0,5
HPLC-Wasser	6,5

Tabelle 5:
Konditionen einer
Standard-Sequenz-
PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	96 °C	1 Min.	1
Denaturierung	96 °C	10 Sek.	25
Amplifikation	60 °C	1 Min. 20 Sek.	
Kühlung	4 °C		1

2.3.2.6 Natrium-Azetat-Fällung

Bevor die Basenabfolge der in der Sequenz-PCR entstandenen DNA-Fragmente mithilfe eines *Sequencers* ermittelt wird, erfolgt als Zwischenschritt die Ethanol-Fällung. Hierbei wird die in wässriger Lösung enthaltene DNA in Gegenwart von Natrium-Azetat durch Aussalzen gefällt und danach durch Zentrifugation pelletiert. Das DNA-Pellet wird dann mit 70 %-igem Ethanol gewaschen und so von den Salzen befreit und kann anschließend in einem anderen Puffer gelöst werden (Hermey 2011). In meinen Versuchen wurde das DNA-Pellet in HiDi-Formamid resuspendiert.

Durchführung

Der Ablauf einer Fällung gliederte sich in folgende Arbeitsschritte: Zunächst wurde das Produkt der Sequenz-PCR mit einer Lösung aus Wasser, Natrium-Azetat und Ethanol (s. Tab. 6) gemischt und für 15 Minuten bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Es folgte eine 45-minütige Zentrifugation bei 3700 rpm (etwa 2200 x g). Der Überstand wurde verworfen. Anschließend wurden jeweils 50 µl 70 % Ethanol hinzugegeben und nun für 30 Minuten bei 3700 rpm zentrifugiert. Wiederum wurde der Überstand verworfen und die Reaktionsgefäße mit den DNA-Pellets bei 50°C für 10 Minuten getrocknet. Schließlich wurden 15 µl HiDi-Formamid zur DNA pipettiert. Zum Lösen erfolgte für einige Stunden eine Inkubation im Dunkeln bei 4°C.

Tabelle 6:
Reaktionsansatz
für eine Natrium-
Azetat-Fällung.

Substanz	Konzentration	Volumen (in µl)
HPLC-Wasser		10
NaAc	3 M	2
Ethanol	95 vol-%	50
Produkt der Sequenz-PCR		10

Funktionelle Untersuchungen *GNB1*

Im Rahmen der Suche nach der genetischen Ursache bei der erkrankten Indexpatientin aus Familie 1 wurde eine vielversprechende Variante im Gen *GNB1* entdeckt (c.353A>G, p.D118G), deren funktionelle Auswirkungen durch die im folgenden erläuterten Versuche erforscht wurden.

Entsprechend werden in den nachstehenden Texten explizit dieses Gen, oben genannte Variante und passende *Primer* erwähnt.

Für die weiterführenden Untersuchungen wurde unter anderem eine *GNB1*-Mutagenese durchgeführt. Die zur Erzeugung von Venus-156-239-G β 1-Mutanten erforderlichen Laborarbeiten wurden zu gleichen Teilen gemeinschaftlich mit Hauke Baumann (M. Sc., ebenfalls Mitglied der Arbeitsgruppe „Genetics of Rare Diseases“ des Instituts für Neurogenetik) ausgeführt. Nähere Informationen hierzu finden sich im Kapitel „2.3.5 *GNB1*-Mutagenese, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation und Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer-Assay“.

2.3.3 Expressionsanalyse

Die notwendigen Arbeitsschritte der Expressionsanalyse sind schematisch in Abbildung 8 dargestellt.

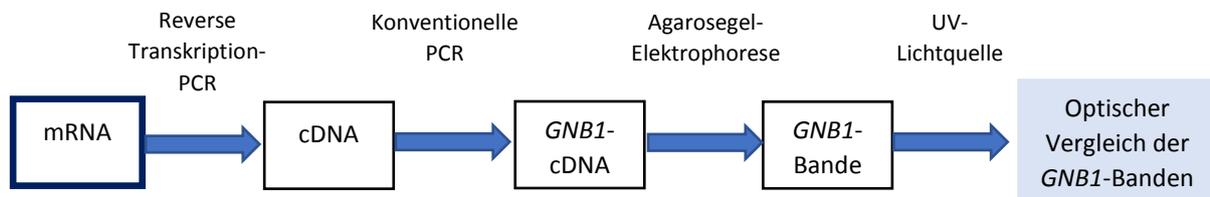


Abbildung 8: Arbeitsschritte zum Vergleich der Expressionsstärke von *GNB1* in verschiedenen Geweben.

Eingesetzt wurde gewebsspezifische mRNA aus Blut, Fibroblasten, dopaminergen, kortikalen und striatalen Neuronen sowie induzierten-pluripotenten Stammzellen. Die im Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennten *GNB1*-cDNA-Banden wurden mithilfe einer UV-Lichtquelle sichtbar gemacht. Basierend auf der Dicke der Banden ließ sich die *GNB1*-Expressionsstärke in den getesteten Geweben optisch semiquantitativ vergleichen.

Zunächst wurde die mRNA verschiedener Gewebe (Blut, Fibroblasten, dopaminerge Neurone, kortikale Neurone, striatale Neurone, induzierte-pluripotente Stammzellen) mittels einer Reversen Transkriptions-PCR in cDNA umgeschrieben. Anschließend wurde die cDNA des Gens *GNB1* in einer konventionellen PCR amplifiziert. Nach elektrophoretischer Auftrennung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel ließ sich die Expressionsstärke von *GNB1* in den verschiedenen Geweben optisch anhand der Dicke der Banden vergleichen. Als in allen untersuchten Geweben vorhandenes Referenzgen wurde außerdem auf gleiche Weise die Expressionsstärke von β -*Actin* dargestellt.

2.3.3.1 Reverse Transkriptions-PCR

Die Reverse Transkriptions-PCR (RT-PCR) dient dazu, mRNA in sogenannte cDNA umzuschreiben. Das Enzym Reverse Transkriptase (eine RNA-abhängige DNA-Polymerase) synthetisiert zunächst den zum mRNA-Einzelstrang komplementären cDNA-Strang, sodass ein RNA-DNA-Hybridstrang entsteht. In

einem nächsten Schritt wird dann der zu dem ersten cDNA-Strang komplementäre DNA-Strang synthetisiert, sodass sich ein cDNA-Doppelstrang ergibt.

Durchführung

Zur Durchführung der Reversen Transkriptions-PCR wurde das kommerzielle Kit "Maxima First Strand cDNA Synthesis Kit for RT-qPCR with dsDNase" (Thermo Scientific) verwendet und die Reaktion nach Hersteller-Protokoll ausgeführt. Die enthaltenen Komponenten wurden aufgetaut, gemischt, kurz zentrifugiert und anschließend auf Eis gelagert. 1 µl 10 x dsDNase -Puffer, 1 µl dsDNase und 500 ng *Template*-RNA wurden in einem sterilen, RNase-freien Röhrchen auf Eis gemischt und das Gesamtvolumen mit Nuklease-freiem Wasser auf 10 µl aufgefüllt. Das Gemisch wurde für 2 Minuten bei 37°C inkubiert und danach wieder auf Eis gelagert. Anschließend wurden 4 µl 5 x Reaction Mix, 2 µl Maxima Enzyme Mix und 4 µl Nuklease-freies Wasser in das Röhrchen gegeben, vermischt und kurz zentrifugiert. Darauf folgte eine Inkubation für 10 Minuten bei 25°C und danach für 15 Minuten bei 50°C. Die Reaktion wurde durch eine fünfminütige Erhitzung auf 85°C beendet.

Die erhaltene cDNA wurde anschließend in einer PCR-Reaktion amplifiziert (Tab. 7). Als *Primer* wurden einerseits cDNA-*Primer* verwendet, die in verschiedenen Exons des Gens *GNB1* binden (*GNB1_cDNA_Ex4F* und *GNB1_cDNA_Ex8R*) sowie andererseits cDNA-*Primer*, die in verschiedenen Exons des *β-Actin*-Gens binden (*Beta-Actin_F* und *Beta-Actin_R*). Anschließend wurden die PCR-Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen und die Expressionsstärke von *GNB1* in den verschiedenen Geweben optisch semiquantitativ anhand der Dicke der Banden verglichen. *β-Actin* wird als wichtiger Bestandteil des Zytoskeletts in praktisch allen Geweben exprimiert und diente als Ladekontrolle bzw. Referenzgen. Wäre keine *β-Actin*-Bande vorhanden gewesen, hätte dies darauf hingedeutet, dass der Ansatz keine cDNA enthalten hat.

Tabelle 7:
Reaktionsansatz
für eine PCR zur
Expressionsanalyse.

Substanz	Volumen (in µl)
HPLC-Wasser	4
dNTPs	3,0
Taq-Puffer	1,5
Vorwärts- <i>Primer</i>	0,6
Rückwärts- <i>Primer</i>	0,6
Taq-Polymerase	0,07
cDNA	4

2.3.4 Immunfärbung

Ziel dieses Versuchsaufbaus zur Immunfärbung war es, darzustellen in welchen Zellkompartimenten das Genprodukt von *GNB1* exprimiert wird und ob sich die Expression von Wildtyp-*GNB1* und der *GNB1*-Mutante c.353A>G unterscheidet. Zu diesem Zweck wurden SH-SY5Y-Zellen und Fibroblasten transient mit *GNB1*-haltigen Plasmiden transfiziert. Dazu musste mithilfe einer Mutagenese-PCR ein Plasmid hergestellt werden, dass *GNB1*-c.353A>G enthält. Da für die Transfektion in SH-SY5Y-Zellen und Fibroblasten jeweils große Mengen an Plasmid-DNA eingesetzt werden mussten, wurden die Plasmide in *E. coli*-Kulturen kloniert. Anschließend wurde die DNA in Mini- bzw. Maxipräparationen wieder aufgereinigt und die *GNB1*-Sequenzen wurden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Die zahlreichen Zwischenschritte der Immunfärbung werden in den folgenden Abschnitten erläutert. Die ersten Schritte bis zur Erzeugung eines pcDNA-Vektors mit *GNB1*-Sequenz sind in Abbildung 9 dargestellt.

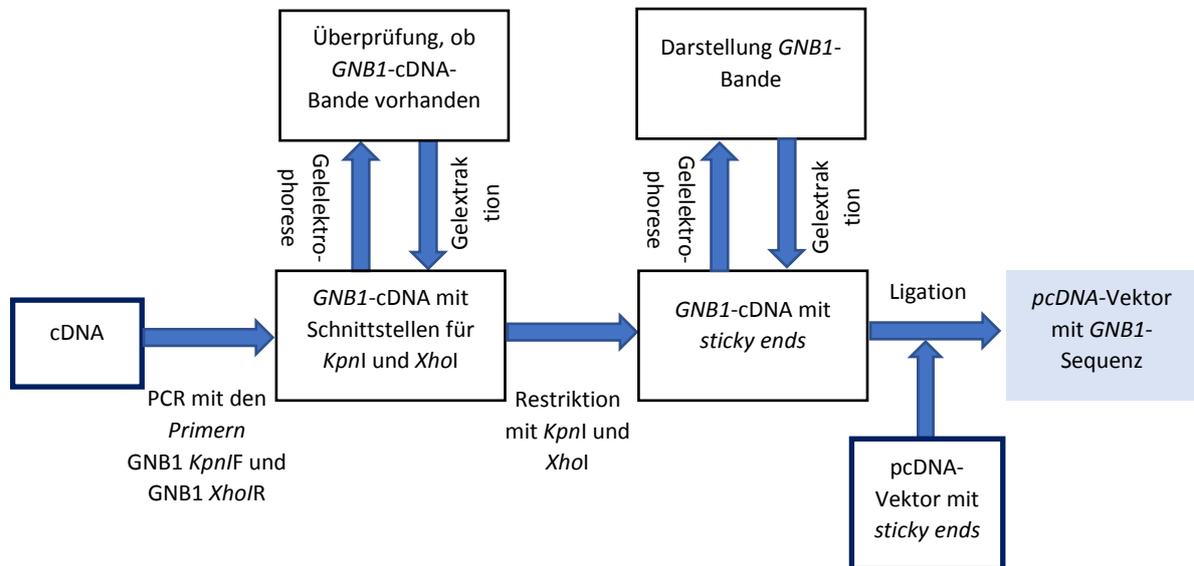


Abbildung 9: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Erzeugung eines pcDNA-Vektors mit *GNB1*-Sequenz. Nach der PCR bzw. dem Restriktionsverdau wurden die Reaktionsprodukte mittels einer Gelelektrophorese aufgetrennt. Anschließend wurde die Bande, die der Länge nach der gewünschten *GNB1*-cDNA-Bande entsprach, ausgeschnitten und die *GNB1*-cDNA extrahiert. Die *GNB1*-cDNA ändert sich durch diese Versuchsschritte nicht, sondern wird nur überprüft und aufgereinigt. Da der pcDNA-Vektor und die *GNB1*-cDNA mit den gleichen Restriktionsenzymen geschnitten wurden (*KpnI* und *XhoI*), sind die jeweiligen sticky ends komplementär zueinander und können in einer Ligationsreaktion miteinander verbunden werden.

2.3.4.1 Einführung von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme

Als erster Schritt wurde eine PCR mit cDNA und den Primern „*GNB1 KpnIF*“ und „*GNB1 XhoIR*“ durchgeführt. Der Reaktionsansatz ist in Tabelle 8 und genauere Angaben zu den PCR-Konditionen sind in Tabelle 9 dargestellt. Ziel dieses ersten Versuchsschrittes war es, cDNA des Gens *GNB1* zu erzeugen, welche an ihren Enden Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *XhoI* aufwies.

Ein Ausschnitt der *GNB1*-cDNA mit den eingefügten Schnittstellen für die beiden Restriktionsenzyme ist in Abbildung 10 illustriert.

Tabelle 8:

PCR-Reaktionsansatz zur Einführung von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme.

Substanz	Volumen (in μl)
HPLC-Wasser	5
Vorwärts-Primer (<i>GNB1 KpnIF</i>)	1,25
Rückwärts-Primer (<i>GNB1 XhoIR</i>)	1,25
2 x Q5-Polymerase	12,5
cDNA (2131 K 5.2.14)	5

Tabelle 9:

PCR-Konditionen zur Einführung von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme.

Schritt	Temperaturen	Zeiten	Zyklen
Initiale Denaturierung	98°C	30 Sek. (mit Hot-Start)	1
Denaturierung	98°C	10 Sek.	35
Annealing	55°C	30 Sek.	
Elongation	72°C	45 Sek.	
Finale Elongation	72°C	5 Min.	1
Kühlung	4°C		1

Anschließend wurde das PCR-Produkt mit 10 μl Ladepuffer vermischt und auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 130 V. Die Bande, die das gewünschte PCR-Produkt enthielt, wurde ausgeschnitten und anschließend eine Gelextraktion durchgeführt.

2.3.4.2 Gelextraktion

Für die Gelextraktion wurde das Kit „QIAquick Gel Extraction Kit“ (QIAGEN) genutzt und die Anweisungen nach Hersteller-Protokoll ausgeführt. Zunächst wurden 400 μl Q6-Puffer in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß pipettiert und mithilfe eines Heizblocks auf 50°C erwärmt. Dann wurde die DNA-Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und in das Reaktionsgefäß mit Q6-Puffer überführt und abgewartet bis sich die Gelbande gelöst hatte. Als nächstes wurden 400 μl Isopropanol zugegeben und die Lösung gemischt. Die Flüssigkeit wurde in eine Zentrifugations-Säule (*spin column*) überführt und kurz auf 13.000 rpm (etwa 16.000 x *g*) zentrifugiert. Der Durchlauf wurde verworfen. Die Zentrifugations-Säule wurde nun für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Durchlauf wiederum verworfen. Danach wurde die Zentrifugations-Säule in ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und 30 μl Elutionspuffer auf die Mitte der Membran pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 1 Minute bei Raumtemperatur wurde das Reaktionsgefäß nochmals für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Das DNA-haltige Eluat wurde schließlich behalten.

2.3.4.3 Restriktion mit den Enzymen *XhoI* und *KpnI*

Die aus dem Gel extrahierte *GNB1*-cDNA wurde im nächsten Schritt mit den beiden Restriktionsenzymen *KpnI* und *XhoI* geschnitten. Dadurch entstanden im Bereich der Schnittstellen kurze Stücke überstehender einzelsträngiger DNA, sogenannte „sticky ends“. Die Schnittstellen der beiden Enzyme sind in Abbildung 10 dargestellt.

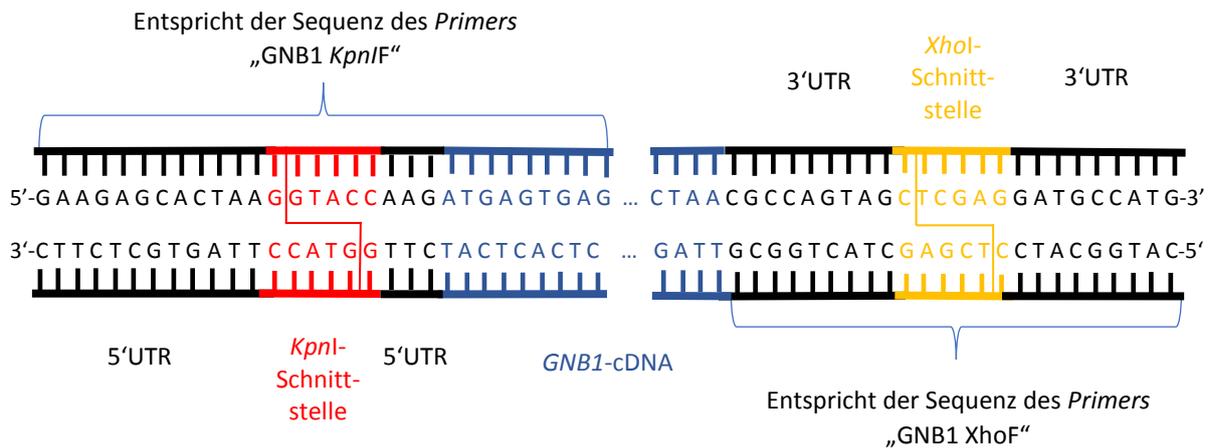


Abbildung 10: Darstellung eines Ausschnitts der *GNB1*-cDNA-Sequenz mit eingefügten Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *XhoI*.

Die gezeigte Basenabfolge entspricht einem Ausschnitt der DNA-Sequenz, wie sie nach der PCR zur Einführung von Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *XhoI* als PCR-Produkt entstanden ist. Von der *GNB1*-cDNA-Sequenz sind jeweils nur wenige der ersten und der letzten Basenpaare zu sehen. Die angrenzende untranslatierte Region (UTR) ist jeweils in schwarz dargestellt. In diesen Bereich wurden die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *XhoI* mithilfe der spezifischen Primer „GNB1 KpnIF“ und „GNB1 XhoIF“ eingefügt. An den Schnittstellen (rot und gelb markiert) weicht die Sequenz von genomischer DNA ab.

Für den Restriktionsverdau wurden die in Tabelle 10 aufgelisteten Komponenten gemischt und für 1 Stunde bei 37°C inkubiert. Danach wurden 15 µl Ladebuffer zum Reaktionsansatz hinzugefügt und das Gemisch auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen. Es erfolgte eine Auftrennung bei 130 V (für 20 Minuten) und eine erneute Gelextraktion (Beschreibung s.o.) der DNA.

Tabelle 10:
Reaktionsansatz
für den Restriktionsverdau
mit *KpnI* und *XhoI*.

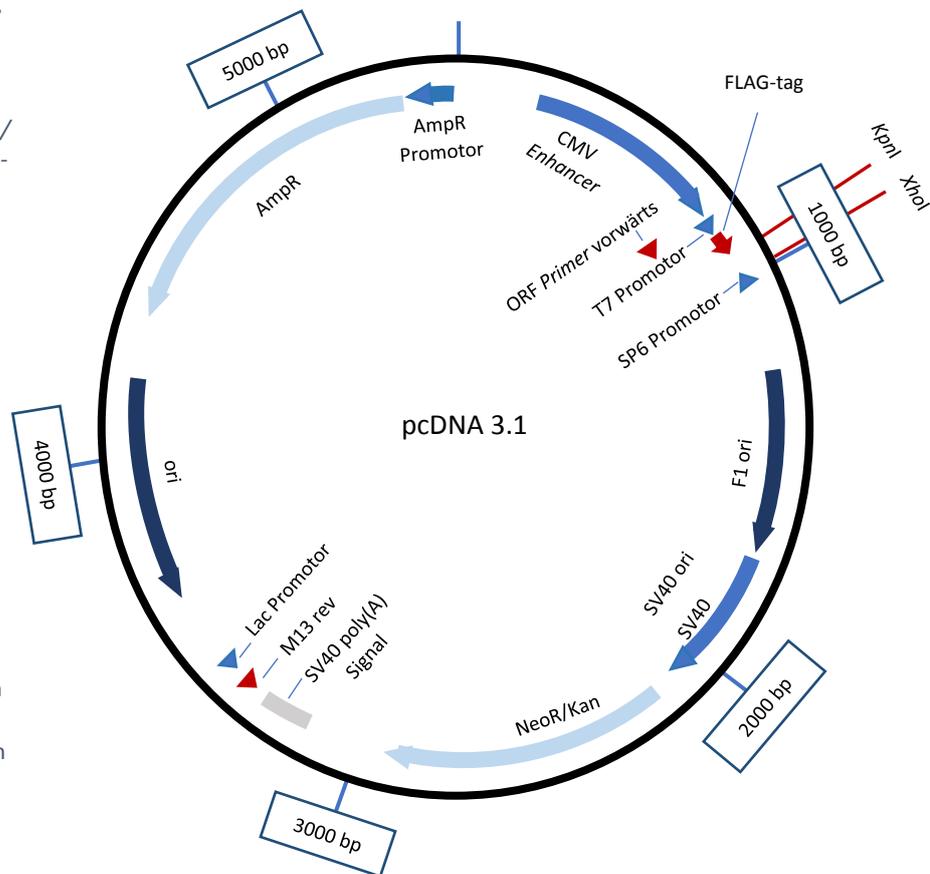
Substanz	Volumen (in µl)
HPLC-Wasser	2
NEB 1 buffer (1.1)	4
<i>KpnI</i>	2
<i>XhoI</i>	2
Eluat (DNA-Bande)	30

2.3.4.4 Ligation in pcDNA-Vektor

Anschließend wurde die *GNB1*-cDNA als *Insert* in ein Plasmid (pcDNA-Vektor 3.1) eingebracht (Ligation). Wie in Abbildung 11 dargestellt, weist der pcDNA-Vektor ebenfalls Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *XhoI* auf und wurde vorher mit den beiden Enzymen „aufgeschnitten“. Die *sticky ends* des *Inserts* waren daher komplementär zu denen des Plasmids und das *Insert* wurde somit an einer definierten Stelle in das Plasmid eingebaut. Das im Reaktionsansatz enthaltene Enzym Ligase verbindet die losen *sticky ends* fest miteinander.

Abbildung 11: Vereinfachte schematische Darstellung des Vektors pcDNA3.1 (adaptiert nach: <http://www.transomic.com/Vectors-and-Maps/pcDNA3-1.aspx> (letzter Zugriff: 02.05.2018)).

Für die notwendigen Arbeitsschritte der Immunfärbung wichtige Elemente des pcDNA-Vektors sind die Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *XhoI* (zwischen diesen wurde die *GNB1*-Sequenz eingefügt). Der FLAG-tag, der für eine künstliche Peptidsequenz codiert, erlaubt, dass darüber Antikörper an das *GNB1*-Genprodukt binden können und dessen Expressionsmuster so durch einen Fluoreszenzmarkierten Antikörper sichtbar gemacht werden kann.



Die Komponenten des Reaktionsansatzes (Tab. 11) wurden für eine Stunde bei Raumtemperatur miteinander inkubiert. Danach erfolgte eine weitere Inkubation von zehn Minuten bei 65°C, um die Ligase zu deaktivieren. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß auf Eis gestellt.

Tabelle 11: Reaktionsansatz für die Ligation des Inserts in den pcDNA-Vektor.

Substanz	Volumen (in µl)
Insert aus Verdau	7
pcDNA-Vektor	2
T4 Puffer	1,1
T4 Ligase	1

2.3.4.5 Transformation in elektrokompente *E. coli*

Als nächstes wurde das *Insert*-haltige Plasmid in elektrokompente *E. coli*-Bakterien transformiert. Dazu wurde das Verfahren der Elektroporation genutzt. Eine schematische Darstellung der Versuchsabfolge von der Transformation bis zu Sequenzierung des *GNB1*-pcDNA-Vektors findet sich in Abbildung 12. Zuerst wurden 500 µl S.O.C.-Medium in ein steriles 10 ml-Röhrchen vorgelegt. Dann wurden 1,5 µl des Ligations-Produktes in ein auf Eis gelagertes Reaktionsgefäß mit der *E. coli*-Suspension pipettiert. Die Bakterien suspension (ca. 50 µl) wurde in eine gekühlte Küvette überführt. Es folgte die Elektroporation mithilfe des Electroporators 2510. Danach wurde die Bakterien suspension in das Röhrchen mit S.O.C.-Medium gegeben und für 1 Stunde bei 37°C geschwenkt.

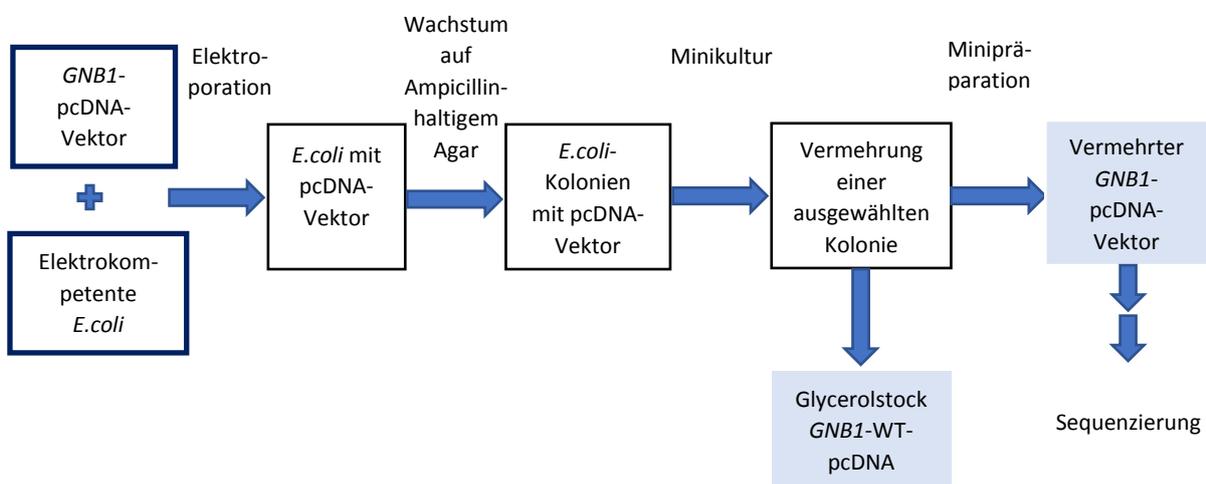


Abbildung 12: Arbeitsschritte zur Klonierung des *GNB1*-pcDNA-Vektors.

Der pcDNA-Vektor mit *GNB1*-Insert wurde per Elektroporation in elektrokompente *E. coli* transformiert. Anschließend wurden 20 µl der Bakterien suspension auf einem Ampicillin-haltigen Agar über Nacht bei 37°C inkubiert, sodass nur *E. coli* wachsen und Kolonien bilden konnten, die den pcDNA-Vektor, welcher auch für ein Ampicillin-Resistenz-Gen codiert, aufgenommen hatten. Eine Kolonie wurde gepickt, in Ampicillin-haltiges LB-Medium gegeben und damit für 7-8 Stunden bei 37°C eine Minikultur angesetzt. Davon wurden 0,5 ml als Glycerolstock eingefroren. Mit der restlichen Bakterienkultur wurde eine Minipräparation durchgeführt, um den klonierten *GNB1*-pcDNA-Vektor aufzureinigen. Anschließend wurden die Vektoren mit den Restriktionsenzymen *KpnI* und *XhoI* geschnitten und das *GNB1*-Insert sequenziert, um zu überprüfen, ob die Sequenz dem WT entspricht und während der Versuchsschritte keine unerwünschten Mutationen entstanden waren.

2.3.4.6 Klonierung

Um die *E. coli*-Bakterien, die ein Plasmid aufgenommen hatten, von denjenigen ohne Plasmid zu trennen, wurden 20 µl der Bakterien suspension auf einem Ampicillin-haltigen Agar (enthielt 50 µg/ml Ampicillin) aufgetragen und mithilfe eines Glasspatels gleichmäßig verteilt. Die Agarplatte wurde

über Nacht bei 37°C inkubiert. Da der pcDNA-Vektor ein Ampicillin-Resistenz-Gen enthält (s. Abb. 11), konnten sich die Plasmid-haltigen Bakterien vermehren und Kolonien bilden.

Am nächsten Tag wurden einige der über Nacht gewachsenen Kolonien mit einer Pipettenspitze gepickt und jeweils pro Kolonie eine Minikultur angelegt. Dazu wurden jeweils 5 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium (50 µg/ ml Ampicillin) mit den gepickten Kolonien beimpft und anschließend für 7 bis 8 Stunden bei 37°C geschwenkt. Schließlich wurden 0,5 ml der Bakteriensuspension mit 0,5 ml 80 % Glycerol bei -80°C als Glycerolstock eingefroren.

2.3.4.7 Minipräparation

Die Minipräparation dient zur Aufreinigung der in den Bakterien vermehrten Plasmid-DNA. Zunächst werden die Bakterien pelletiert, resuspendiert und anschließend (partiell) lysiert. Dadurch wird die Plasmid-DNA freigesetzt. Nach einem Neutralisationsschritt werden die Plasmide durch Zentrifugation von den Bakterien getrennt. Bei der Verwendung kommerzieller Kits zur Minipräparation (z.B. von QIAGEN oder ThermoFisher) wird die DNA dann an eine positiv geladene Matrix einer Säule gebunden und in einem letzten Schritt mit einem Puffer von der Säule eluiert.

Minipräparation-Protokoll:

Zur Durchführung der Minipräparation wurde das Kit „QIAPrep Spin Mini Prep Kit“ von QIAGEN verwendet. Pro Ansatz wurden jeweils 4 ml der Minikultur in ein 15 ml-Falcon-Röhrchen überführt. Das Falcon-Röhrchen wurde für 5 Minuten bei 4700 rpm in der Multifuge 1 S-R (etwa 4600 x g) zentrifugiert und der Überstand verworfen. Danach wurde das Bakterienpellet in 250 µl P1-Puffer gelöst und die Flüssigkeit in ein 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Als nächstes wurden 250 µl P2-Puffer hinzu pipettiert und vermischt. Nach Zugabe von 350 µl N3-Puffer wurde das Reaktionsgefäß geschwenkt bis sich die Flüssigkeit weiß verfärbte. Anschließend folgte eine 10-minütige Zentrifugation bei 13.000 rpm in der Microfuge 22 R (etwa 16.000 x g). Darauffolgend wurden 900 µl des klaren Überstandes in ein Filtertube pipettiert und dieses kurz auf 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Dann wurden 750 µl Waschpuffer (PE) auf den Filter gegeben, das Tube abermals kurz auf 13.000 rpm zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Gefäß wurde nochmals für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert und der Filter in ein frisches 1,5 ml-Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Im folgenden Schritt wurden 35 µl Elutions-Puffer (EB) in die Mitte der Membran pipettiert. Nach einer einminütigen Inkubation bei Raumtemperatur erfolgte eine letzte Zentrifugation für eine Minute bei 13.000 rpm. Die als Durchfluss erhaltene Flüssigkeit wurde behalten, denn dabei handelte es sich um die in Elutions-Puffer gelöste DNA.

2.3.4.8 Überprüfung der Sequenz des *Inserts*

Anschließend wurde wiederum ein Restriktionsverdau mit den Enzymen *KpnI* und *XhoI* durchgeführt (siehe 2.3.4.3 Restriktion mit den Enzymen *XhoI* und *KpnI*) und das Gemisch auf einem Agarosegel aufgetrennt, um zu überprüfen, ob die jeweiligen Plasmide das *Insert* enthielten. In diesem Fall sollten zwei unterschiedlich große Banden zu sehen sein: eine dem *GNB1-Insert* entsprechende und eine dem Rest des Plasmids entsprechende Bande. Danach wurden die Ansätze mit den *Insert*-haltigen Plasmiden mithilfe der *Primer* T7 und BGHR sequenziert, um zu überprüfen, ob das *Insert* der *GNB1*-WT-Sequenz entsprach und nicht zufällig während der Klonierung ungewollte Mutationen entstanden waren.

Für die Sequenzierung von Plasmid-DNA nach Mini- und Maxipräparationen wurde ein leicht modifizierter Reaktionsansatz (Tab. 12) und ein anderes *Cycler*-Programm (Tab. 13) verwendet.

Tabella12:
Reaktionsansatz zur Sequenzierung von Plasmid-DNA.

Substanz	Volumen (in μl)
Plasmid cDNA (c = 100 ng/ μl)	1
5 x Sequenz-Puffer	1,5
<i>Primer</i> (Vorwärts- oder Rückwärts) c = 10 ng/ μl	1
Terminatormix 3.1	1
HPLC - Wasser	5,5

Tabella13:
Konditionen zur Sequenzierung von Plasmid-DNA.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	94 °C	5 Min.	1
Denaturierung	94 °C	20 Sek.	25
Amplifikation	60 °C	2 Min. 5 Sek.	
Kühlung	4 °C		1

2.3.4.9 Mutagenese-PCR

Das Kit „site-directed mutagenesis Quick Change XL II“ wurde genutzt, um an definierten Positionen eines Vektor-Konstrukts spezifische Punktmutationen einzuführen.

Für die Mutagenese-PCR wurden jeweils modifizierte *Primer* eingesetzt, welche an der gewünschten Position die geänderte Base enthielten. Der Vorwärts- und der Rückwärts-*Primer* waren komplementär zueinander und ermöglichten die Amplifikation beider Stränge des gesamten Plasmids. Um hierbei die Wahrscheinlichkeit des Einführens weiterer ungewollter Mutationen zu minimieren, wurde als Polymerase Pfu verwendet, welche eine „proofreading“-Aktivität besitzt. Außerdem wurden aus dem gleichen Grund vergleichsweise wenige Zyklen gefahren.

Durchführung:

Um pcDNA-Vektoren zu erzeugen, die die *GNB1*-Mutation c.353A>G enthielten, wurden 50 ng der zuvor gewonnen und überprüften *GNB1*-WT-Plasmid-DNA in einer Mutagenese-PCR eingesetzt.

Hierfür wurden die *Primer* „GNB1 c.A353G F“ und „GNB1 c.A353G R“ verwendet.

Tabelle 14 und 15 zeigen die im Vergleich zur konventionellen PCR veränderte Zusammensetzung des Reaktionsansatzes und die abweichende Dauer und Anzahl der PCR-Zyklen. Die Sequenz der eingesetzten Mutagenese-*Primer* ist in der Primerliste im Anhang dargestellt.

Tabelle 14:
Reaktionsansatz für
eine Mutagenese-PCR.

Substanz	Volumen (in µl)
HPLC-Wasser	13,7
Pfu-Puffer	2,5
dNTP-Mix	0,6
Vorwärts- <i>Primer</i>	1,3
Rückwärts- <i>Primer</i>	1,3
Pfu-Polymerase	0,6
WT-Plasmid-DNA (c = 10 ng/ µl)	5

Tabelle 15:
Konditionen für eine
Mutagenese-PCR.

Schritt	Temperatur	Zeit	Zyklen
Initiale Denaturierung	95°C	1 Min.	1
Denaturierung	95°C	30 Sek.	19
<i>Annealing</i>	55°C	1 Min.	
Elongation	68°C	18 Min.	
Finale Elongation	68°C	18 Min.	1
Kühlung	4°C		1

Danach wurde das PCR-Produkt mit 0,9 µl des Restriktionsenzym *DpnI* bei 37°C für eine Stunde inkubiert. *DpnI* verdaut nur methylierte DNA – hier also die methylierte Bakterien-DNA des *GNB1*-WT-Plasmid-*Templates*. Die in der PCR neu synthetisierten und die gewünschte Mutation tragenden Plasmide waren hingegen nicht methyliert und wurden daher auch nicht geschnitten.

Hieran anschließend folgten die gleichen Schritte, die auch mit der WT-Plasmid-DNA ausgeführt wurden (Transformation in *E. coli*, Klonierung, Minipräparation, Sequenzierung der gewonnenen DNA zur Überprüfung, ob das Plasmid tatsächlich die gewünschte Mutation aufwies). In Abbildung 13 ist die durchgeführte Versuchsfolge schematisch zusammengefasst.

Da für die Transfektion in Fibroblasten und SH-SY5Y-Zellen größere Mengen an Plasmid-DNA eingesetzt werden mussten, als in der Minipräparation gewonnen werden konnte, wurde als weiterer Schritt eine Maxipräparation eingeschoben. Hierfür wurden in Erlenmeyerkolben jeweils Kulturen mit 100 ml Ampicillin-haltigem Flüssigmedium (50 µg/ ml Ampicillin) angelegt und diese mit Bakterien aus den Glycerolstocks angeimpft, die zuvor aus den entsprechenden Minikulturen

angelegt und eingefroren worden waren. Die Kulturen wurden für 7 bis 8 Stunden bei 37°C geschwenkt.

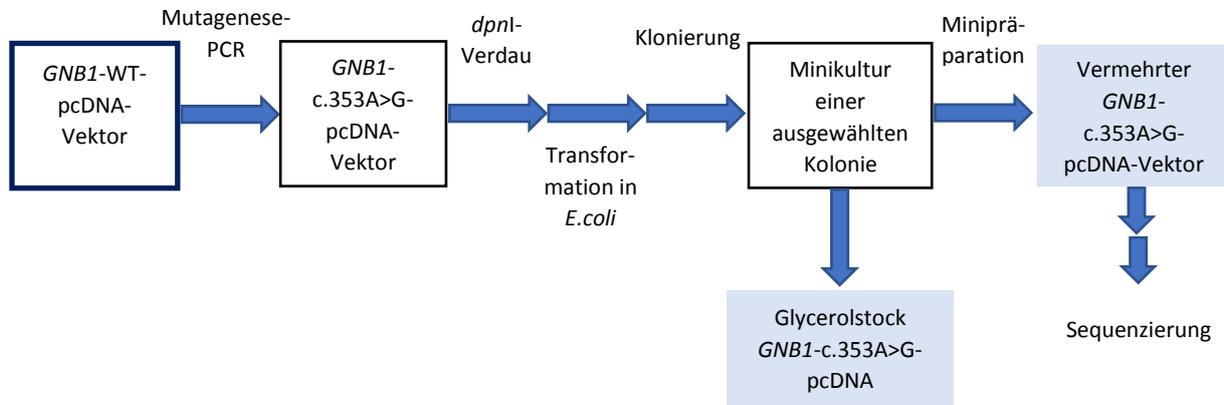


Abbildung 13: Arbeitsschritte zur Mutagenese des *GNB1*-pcDNA-Vektors und Klonierung.

Mittels einer Mutagenese-PCR wurde die zu untersuchende Mutation c.353A>G innerhalb der *GNB1*-Sequenz eingeführt. Ein Teil der (nach den notwendigen Zwischenschritten) erhaltenen Minikultur wurde wiederum als Glycerolstock eingefroren. Aus dem Rest der Minikultur wurde der pcDNA-Vektor mittels Minipräparation aufgereinigt und anschließend sequenziert, um zu überprüfen, ob der Vektor tatsächlich die gewünschte *GNB1* c.353A>G-Mutation enthält.

2.3.4.10 Maxipräparation

Die Maxipräparation dient wie die Minipräparation der Aufreinigung von Plasmid-DNA, welche in einer Über-Nacht-Kultur vermehrt wurde. Das zugrundeliegende Prinzip entspricht dem der Minipräparation, mit dem Unterschied, dass hier ein größeres Volumen an Flüssigmedium angeimpft wird und man daher am Ende auch eine größere Menge aufgereinigter DNA erhält. Ein weiterer Unterschied zur Minipräparation ist, dass die Plasmide nicht durch Zentrifugation, sondern durch Filtration vom Rest der lysierten Bakterien getrennt werden.

Maxipräparation-Protokoll:

Zur Durchführung der Maxipräparation wurde das Kit „EndoFree Plasmid Maxi Kit“ von QIAGEN verwendet. Pro angesetzter Über-Nacht-Kultur (100 ml) wurde die Bakteriensuspension auf zwei 50 ml-Falcon-Röhrchen aufgeteilt. Die Falcon-Röhrchen wurden für 15 Minuten mit 4700 rpm in der Multifuge 1 S-R bei 4°C zentrifugiert (entspricht etwa 4600 x g). Währenddessen wurde als Vorbereitung 2,5 ml ER-Puffer aus oben genanntem Kit in ein 50 ml-Falcon gefüllt und auf Eis gestellt. Der durch die Zentrifugation entstandene Überstand wurde verworfen. Zunächst wurden 10 ml P1-Puffer in eines der beiden Falcons gegeben und alle Bakterien dieses ersten Falcons darin gelöst. Anschließend wurde die Flüssigkeit in das zweite Falcon überführt und auch die darin enthaltenen Bakterien in dem Puffer resuspendiert. Danach wurden 10 ml P2-Puffer zur Bakteriensuspension gegeben, gut vermischt und für 5 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Darauf folgend wurden 10

ml P3-Puffer hinzugegeben und gut vermischt. Das Falcon wurde 5 Sekunden lang bei 2000 rpm (etwa 850 x g) zentrifugiert und der durchsichtige Überstand dann in das im Kit enthaltene Filter-Gefäß überführt. Die Flüssigkeit wurde mithilfe eines Kolbens über den Filter in das vorbereitete Falcon-Röhrchen mit 2,5 ml ER-Puffer gedrückt und mit diesem vermischt. Es folgte eine 30-minütige Inkubation auf Eis. In der Zwischenzeit wurde eine Säule aus dem Kit mit 10 ml QBT äquilibriert. Dann wurde das Filtrat auf die Säule gegeben. Die Flüssigkeit lief durch die Säule, wobei die DNA an die Matrix der Säule band und durch diese zurückgehalten wurde. Im Anschluss wurde die Säule zwei Mal mit 30 ml QC-Puffer gewaschen. Die Flüssigkeiten wurden jeweils verworfen. Schließlich wurde die DNA mit 15 ml QN-Puffer aus der Säule in ein frisches 50 ml-Falcon-Röhrchen eluiert. In der Zwischenzeit wurden 10,5 ml Isopropanol in ein weißes Röhrchen mit Steckdeckel gefüllt. Das Eluat wurde dann in das Isopropanolröhrchen überführt und das Röhrchen gründlich geschüttelt. Dieses wurde danach für 30 Minuten bei 15.000 x g und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Anschließend wurden 700 µl 70 % EtOH zu dem am Boden des Röhrchens befindlichen DNA-Pellet gegeben. Das Pellet und das Ethanol wurden in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß überführt und dieses nun für 10 Minuten bei 13.000 rpm (etwa 16.000 x g) zentrifugiert. Der Überstand wurde wieder verworfen. Dann wurde das Pellet für mehrere Minuten bei 50°C getrocknet. Im Anschluss wurden 250 µl TE-Puffer zum Pellet pipettiert und leicht vermischt. Das Reaktionsgefäß wurde gevortext bis sich das Pellet vollständig aufgelöst hatte. Schließlich wurde die Flüssigkeit noch für 15-20 Minuten bei 37°C auf einem beheizbaren Schüttler (500 rpm) inkubiert. Als letzter Schritt wurde die DNA-Konzentration mit einem NanoDrop-Spectrophotometer gemessen.

Nach der Maxipräparation wurden die *Inserts* der aufgereinigten Plasmide nochmals per Sanger-Sequenzierung auf die Richtigkeit ihrer DNA-Sequenz überprüft (d.h. dass das WT-*Insert* keine Mutation und das *Insert* mit Mutation nur die gewünschte Variante an der gewünschten Stelle enthalten durfte). Die Plasmide wurden dann mittels Elektroporation in SH-SY5Y-Zellen bzw. Fibroblasten transfiziert.

2.3.4.11 Transiente Transfektion von SH-SY5Y-Zellen und Fibroblasten

Für die Transfektion von SH-SY5Y-Zellen und Fibroblasten wurden Objektträger-Deckelchen in jeweils einer 24-Well-Platte verteilt. Jedes Well wurde mit 1 ml 100 % Ethanol für 20 Minuten gewaschen, dann wurde das Ethanol wieder abgesaugt. Anschließend wurde jedes Well 3-mal mit 1 ml AMPUWA gewaschen und danach mit 1 ml Gelatine beschichtet. Danach wurden jeweils 100 µl Transfektionsmix und 5 µg Plasmid in ein 1,5 ml-Reaktionsgefäß gefüllt. Bei dem Transfektionsmix für die SH-SY5Y-Zellen handelte es sich um „Nucleofactor solution V“ (LONZA) und bei dem

Transfektionsmix für die Fibroblasten um „Basic Nucleofactor solution – primary fibroblasts“ (LONZA).

Die SH-SY5Y-Zellen bzw. die Fibroblasten wurden mit Accutase aus ihren Zellkulturflaschen abgelöst, die Zellen in 12 ml Gesamtvolumen DMEM aufgenommen und mithilfe eines Zellzählgeräts gezählt.

Jeweils 1×10^6 SH-SY5Y-Zellen bzw. Fibroblasten wurden in ein 15 ml-Falcon pipettiert und die Falcons dann mit 1000 rpm (etwa $200 \times g$) für 5 Minuten bei Raumtemperatur zentrifugiert.

Darauffolgend wurde der Überstand abgesaugt und die Zellpellets wurden im entsprechenden Transfektionsmix resuspendiert. Die Zellsuspension wurde dann luftblasenfrei mit einer LONZA-Pipette in eine Küvette überführt. Die Transfektion erfolgte per Elektroporation. Anschließend wurden jeweils 500 μ l DMEM zu den Zellen gegeben. Dann wurde je 1 Tropfen der transfizierten Zellen in jedes Well der entsprechenden 24-Well-Platte pipettiert. Nach 24 Stunden wurde das Medium abgesaugt und jedes Well mit 1 ml 1xPBS gewaschen.

Danach wurde 1 ml 4 % Paraformaldehyd (PFA) zu den Zellen gegeben und für 20 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Das PFA wurde anschließend von den Zellen abpipettiert und jedes Well 3-mal mit 1 x PBS gewaschen. Beim letzten Mal wurde das PBS auf den fixierten Zellen gelassen und anschließend die Platte mit den Zellen im Kühlschrank gelagert. Der schematische Ablauf dieser gerade vorgestellten sowie der folgenden Arbeitsschritte der Immunfärbung sind in Abbildung 14 dargestellt.

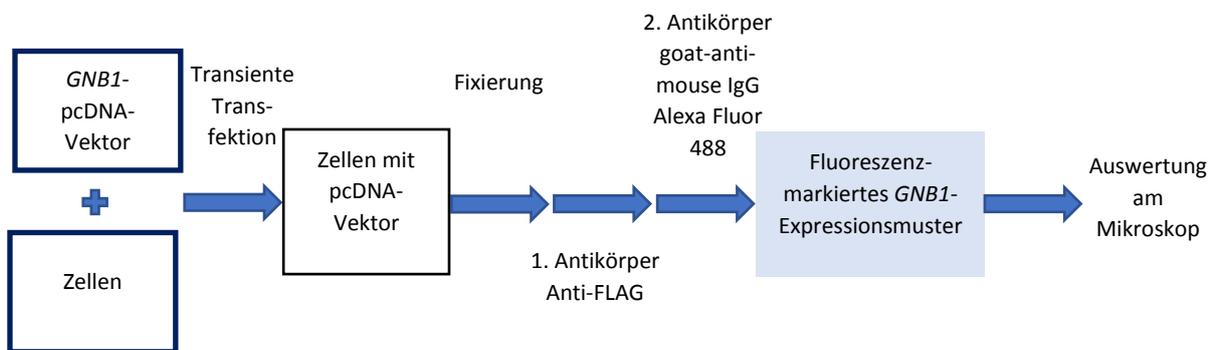


Abbildung 14: Schematische Darstellung der Arbeitsschritte zur Immunfärbung.

SH-SY5Y-Zellen und Fibroblasten wurden einerseits mit *GNB1*-WT-pcDNA-Vektor transfiziert und andererseits mit *GNB1*-c.353A>G-pcDNA-Vektor. Zur Darstellung des β 1-Expressionsmusters wurden die Zellen aufeinanderfolgend mit zwei Antikörper-Lösungen behandelt und das Fluoreszenz-markierte Expressionsmuster anschließend am Mikroskop ausgewertet.

2.3.4.12 Behandlung mit Antikörpern

Die Behandlung der Plasmid-haltigen Zellen mit Antikörpern diente dazu, innerhalb der Zellen die Kompartimente sichtbar zu machen, in denen die Genprodukte von WT-*GNB1* bzw. *GNB1*-c.353A>G exprimiert werden. Dazu wurde zunächst ein erster muriner Antikörper auf die Zellen gegeben,

welcher gegen den FLAG-tag gerichtet war, der ebenfalls vom eingebrachten Plasmid codiert wird. Beim FLAG-tag handelt es sich um eine künstliche Polypeptid-Sequenz bestehend aus den Aminosäuren DYKDDDDK (D = Aspartat, Y = Tyrosin, K = Lysin), die an ein zu untersuchendes Protein angefügt werden kann. Innerhalb der Plasmid-Sequenz befindet sich die Sequenz des FLAG-tags zwischen der des T7-Promotors und der *KpnI*-Schnittstelle (s. Abb. 11). So wurde der FLAG-tag gemeinsam mit Gβ1 (dem Genprodukt von *GNB1*) exprimiert. Durch Hinzugabe eines zweiten, fluoreszierenden Antikörpers, der gegen den ersten Antikörper gerichtet ist, kann so die Lokalisation des interessierenden Proteins innerhalb der Zelle sichtbar gemacht werden. In meinen Experimenten handelte es sich beim zweiten Antikörper um einen von Ziegen abstammenden, mit dem Fluoreszenz-Farbstoff Alexa Fluor 488 konjugierten Antikörper.

Insgesamt wurden 8 Objektträger-Deckelchen mit Zellen auf ihrer Oberseite auf Parafilm gelegt. Dabei handelte es sich jeweils 2-mal um Fibroblasten mit *GNB1*-WT- bzw. *GNB1*-c.353A>G-Plasmid sowie je 2-mal um SH-SY5Y-Zellen mit *GNB1*-WT- bzw. *GNB1*-c.353A>G-Plasmid. Auf jedes Objektträger-Deckelchen wurden 100 µl Blockier-Lösung gegeben (siehe 2.1.2 Stammlösungen und Medien). Nach einer einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Lösung abgesaugt. Es erfolgte eine Waschung mit jeweils 100 µl 1 x PBS. Nun wurden 100 µl der 1. Antikörper-Lösung (anti-FLAG, 1:500) auf jedes Objektträger-Deckelchen gegeben und für eine Stunde bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubiert. Die Lösung wurde wieder abgesaugt und die Zellen abermals mit 100 µl 1 x PBS gewaschen. Danach wurden 100 µl der 2. Antikörper-Lösung (goat anti-mouse IgG, Alexa Fluor 488) auf jedes Objektträger-Deckelchen gegeben. Nach einer erneuten einstündigen Inkubation bei Raumtemperatur im Dunkeln wurde die Lösung wiederum abgesaugt und die Zellen ein letztes Mal mit 100 µl 1 x PBS gewaschen. Schließlich wurden je 100 µl Fluoromount (incl. DAPI zur Zellkernfärbung) zugegeben und die Zellen über Nacht bei Raumtemperatur gelagert. Schließlich wurden Bilder der gefärbten Zellen mit einem Zeiss Axiovert 200 M Mikroskop mit ApoTome aufgenommen und mit der Axiovision Rel 4.8 Software (Zeiss) analysiert.

2.3.5 *GNB1*-Mutagenese, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation und Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer-Assay

Durch die Kooperation mit der Diagnostikfirma Centogene AG erfuhr die Arbeitsgruppe von 13 weiteren neuen Varianten im Gen *GNB1* bei 15 Patienten mit Entwicklungsverzögerung und zusätzlichen anderen Symptomen. Es handelte sich dabei um 9 *de novo* Missense- sowie 2 Spleiß-Stellen- und 2 Leseraster-Verschiebungs-Mutationen. Für die 9 Missense-Varianten sowie für die im Rahmen meiner Doktorarbeit identifizierte *GNB1* p.D118G-Variante wurden funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Die hierfür genutzten Assays „Bimolekulare

Fluoreszenzkomplementation“ (BiFC) und „Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer“ (BRET) wurden im *Department of Neuroscience, The Scripps Research Institute* in Florida von Ikuo Masuho und Kollegen durchgeführt. Die Vorbereitungen hierzu fanden jedoch als Teil meiner Promotionsarbeit am Institut für Neurogenetik statt.

Für die Assays wurden HEK293T/17-Zellen transient mit dem Dopamin 1-Rezeptor (D1R), der G-Protein-Untereinheit $G\alpha_{olf}$, den an Venus-Fragmente gekoppelten G-Protein-Untereinheiten $G\beta 1$ (Venus-156-239- $G\beta 1$) und $G\gamma 7$ (Venus-1-155- $G\gamma 7$) sowie dem Effektor masGRK3ct-Nluc transfiziert. In den Assays wurden Venus-156-239- $G\beta 1$ -WT und - $G\beta 1$ -Mutanten miteinander verglichen. Letztere wurden mittels *site-directed mutagenesis* im Rahmen meiner Doktorarbeit gemeinschaftlich mit Hauke Baumann (M. Sc., naturwissenschaftlicher Doktorand der Arbeitsgruppe) erzeugt. Die von uns durchgeführten Versuchsschritte sind untenstehend zusammengefasst. Die einzelnen jeweils eingesetzten Methoden wurden bereits in vorherigen Kapiteln ausführlich beschrieben. Als *Template* für die Mutagenese diente ein Venus-156-239- $G\beta 1$ -WT-Plasmid, welches von N. Lambert (Georgia Regents University, USA) zur Verfügung gestellt wurde. Die Sequenz des Plasmids ist im Anhang unter „7.2 Sequenz des Venus-Plasmids“ dargestellt.

Das Venus-Plasmid wurde mittels Elektroporation in *E. coli* transformiert, in einer Minikultur kloniert und in einer Minipräparation aufgereinigt. Von den angesetzten Minikulturen wurden Glycerolstocks angelegt und bei - 80°C eingefroren. Anschließend wurde eine Sanger-Sequenzierung mit den Primern „T7“, „BGHR“, „*GNB1* cDNA Exon 4F“ und „*GNB1* cDNA Exon 8R“ durchgeführt, um die *GNB1*-Sequenz zu überprüfen. Danach wurde mit den zehn im Anhang aufgelisteten *GNB1*-Mutagenese-Primerpaaren jeweils eine Mutagenese-PCR angesetzt. Nach dem anschließenden *DpnI*-Verdau folgten wieder eine Transformation in *E. coli*, Klonierung in Minikulturen und eine anschließende Minipräparationen. Von den Minikulturen wurden wiederum Glycerolstocks eingefroren. Die in den Minipräparationen aufgereinigten Plasmide wurden mit den oben genannten Primern sequenziert, um zu überprüfen, ob die Plasmide die gewünschte Mutation an der richtigen Stelle enthielten. Außerdem wurde sichergestellt, dass während der Versuchsschritte keine unerwünschten Varianten an anderen Stellen der *GNB1*-cDNA-Sequenz entstanden waren. Dann wurden für die zehn verschiedenen modifizierten und überprüften Plasmide Maxikulturen angelegt. Dazu wurden 100 ml Ampicillin-haltiges LB-Medium (50 µg/ml Ampicillin) mit Bakterien aus den jeweiligen Glycerolstocks beimpft. Es folgten eine Maxipräparation und eine erneute Überprüfung der jeweiligen Sequenzen per Sanger-Sequenzierung.

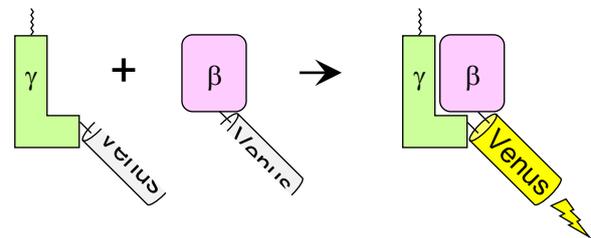
Jeweils 15 µl mit je 80 ng/µl der 10 mutierten und überprüften Vektoren wurden zur Durchführung der BiFC- und BRET-Assays an Ikuo Masuho gesendet. Beschreibungen des genauen Aufbaus und Ablaufs von BiFC- und BRET-Experimenten zur Untersuchung der Interaktion von G-Protein-Untereinheiten sind in der Literatur zu finden (Hynes et al. 2004; Masuho et al. 2015).

Im Folgenden stelle ich die durchgeführten Assays kurz vor. Der genaue Versuchsaufbau ist ausführlich in Lohmann et al., 2017 dargestellt.

Im ersten Teil der von Masuho und Kollegen durchgeführten funktionellen Experimente wurde der Einfluss der *Missense*-Mutation auf die Fähigkeit von $G\beta 1$, Dimere mit der $G\gamma 7$ -Untereinheit zu bilden, betrachtet. Die Untersuchung erfolgte mittels Bimolekularer Fluoreszenzkomplementation (BiFC). $G\beta 1$ und $G\gamma 7$ sind jeweils mit einem nicht-fluoreszierenden Venus-Fragment fusioniert. Interagieren $G\beta 1$ und $G\gamma 7$ miteinander (Dimer-Bildung) so werden die beiden Venus-Fragmente zusammengebracht und es entsteht das gelb-fluoreszierende Protein Venus, dessen Intensität gemessen werden kann (Abb. 15).

Abbildung 15: Interaktion von $G\beta 1$ und $G\gamma 7$ im Rahmen einer Bimolekularen Fluoreszenzkomplementation (BiFC) (aus Lohmann et al. 2017, Abb. 2 A).

Schematische Präsentation des BiFC-Assays zur Untersuchung der $G\beta\gamma$ -Dimer-Interaktion. Zwei nicht fluoreszierende Venus-Fragmente sind mit $G\beta$ bzw. $G\gamma$ fusioniert. Kommt es zur $G\beta\gamma$ -Dimer-Bildung, werden die Fragmente zueinander gebracht und es entsteht das gelb-fluoreszierende Venus-Protein.



Weiterhin wurden Veränderungen in der Formation des heterotrimeren G-Proteins bestehend aus $G\beta 1$, $G\gamma 7$ und $G\alpha_{\text{olf}}$ mittels eines BRET-Assays untersucht. Interagiert das $G\beta 1\gamma 7$ -Dimer (inklusive fusioniertem Venus-Protein) mit dem Luciferase (Nluc)-markierten Effektor - der G-Proteingekoppelten Rezeptor Kinase GRK (masGRK3ct-Nluc) - kommt es zu einem Energietransfer zwischen Venus und Nluc und somit zu einem BRET-Signal. Die Zugabe von $G\alpha_{\text{olf}}$ führt zu einer Konkurrenz zwischen $G\alpha_{\text{olf}}$ und GRK um die Bindung an das $G\beta 1\gamma 7$ -Dimer und somit zu einer Verringerung des BRET-Signals. Beeinträchtigungen der $G\alpha\beta\gamma$ -Trimer-Formation durch die untersuchten $G\beta 1$ -Mutationen führen also unter diesen Versuchsbedingungen zu einem im Vergleich zum Wildtyp erhöhten BRET-Signal (Abb. 16).

Schließlich wurde in einem dritten Teilversuch die Signalweitergabe über den Dopamin 1-Rezeptor ($D1R$)-Signalweg nach Stimulierung durch den Agonisten Dopamin betrachtet. Die Aktivierung des Rezeptors durch Liganden-Bindung führt intrazellulär zu einer Dissoziation des $G\alpha\beta\gamma$ -Trimers. Somit wird das $\beta\gamma$ -Dimer frei, kann einen Komplex mit masGRK3ct-Nluc bilden und so zu einem Anstieg des BRET-Signals führen (Abb. 17).

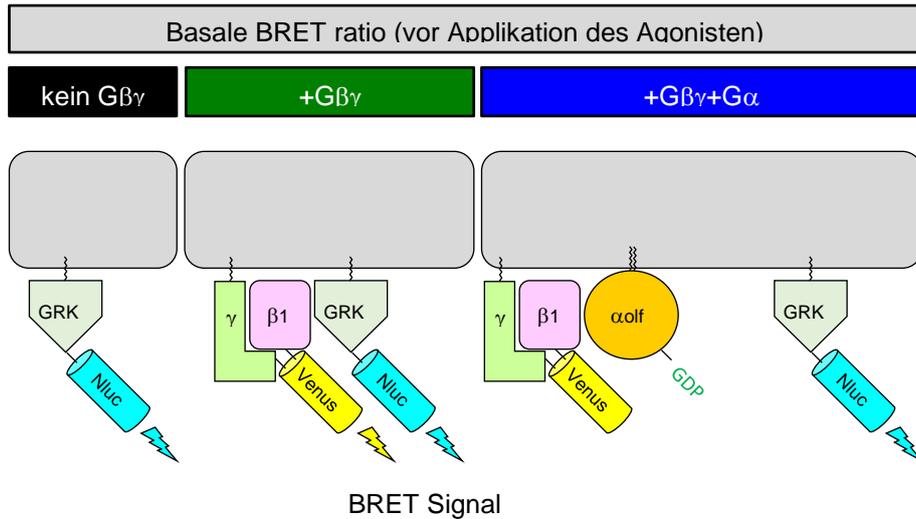


Abbildung 16: Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Formation des heterotrimeren G-Proteins bestehend aus $G\beta 1$, $G\gamma 7$ und $G\alpha_{olf}$ mittels eines BRET-Assays (aus Lohmann et al. 2017, Abb. 2 D). Das basale BRET-Signal entsteht, wenn ein Energietransfer zwischen der an GRK-gebundenen Luciferase Nluc (masGRK3ct-Nluc) und dem an das $G\beta\gamma$ -Dimer gebundenen Venus-Protein möglich ist, d.h. wenn $G\beta\gamma$ und GRK miteinander interagieren. Die zusätzliche Expression der $G\alpha$ -Untereinheit separiert $G\beta\gamma$ von masGRK3ct-Nluc und verringert dadurch das BRET-Signal. Einschränkungen in der $\alpha\beta\gamma$ -Trimer-Bildung führen zur Zunahme des BRET-Signals. GRK: G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase, GDP: Guanosindiphosphat.

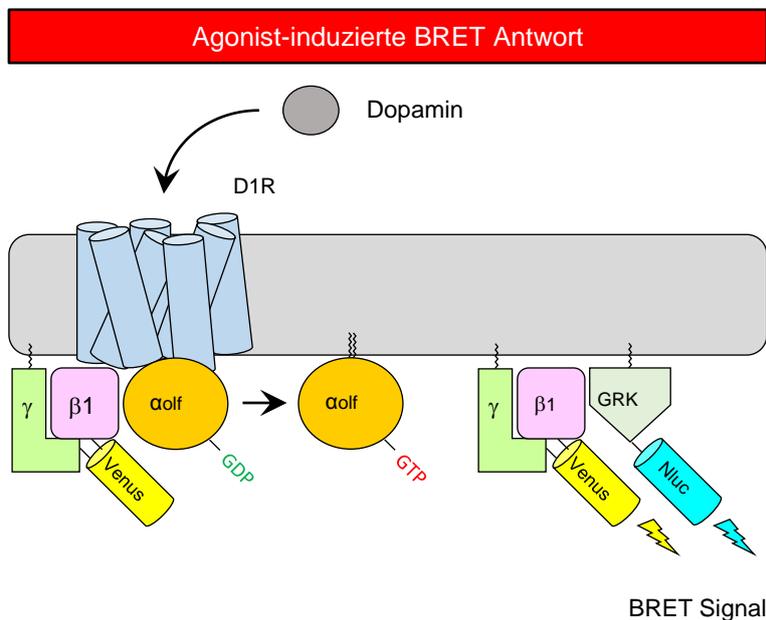


Abbildung 17: Agonist-induzierte BRET-Antwort (aus Lohmann et al. 2017, Abb. 2 G). Schematische Darstellung des Versuchsaufbaus zur Untersuchung der Agonist-stimulierten Signaltransduktion über den G-Protein-gekoppelten Dopamin 1-Rezeptor (D1R). Die Dopamin-Stimulierung führt zur Dissoziation der $G\alpha_{olf}$ -Untereinheit vom Heterotrimer. Dadurch werden die an das Venus-Protein gebundenen $\beta\gamma$ -Untereinheiten frei und können mit masGRK3ct-Nluc interagieren. Das BRET-Signal entsteht durch einen Energietransfer zwischen Nluc und Venus. GRK: G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase; GDP: Guanosindiphosphat, GTP: Guanosintriphosphat

3 Ergebnisse

Auf den folgenden Seiten stelle ich die im Rahmen meiner Promotionsarbeit gewonnenen Zwischen- und Endergebnisse in Form von Text, Tabellen und Abbildungen vor.

3.1 Ergebnisse der Ursachenforschung bei Alkohol-responsiven Dystonien

In diesem Abschnitt werde ich die Ergebnisse der Suche nach genetischen Faktoren bei Alkohol-responsiven Dystonien präsentieren. Dabei werden die durch computer-gestützte Analysen gewonnene Erkenntnisse durch die Resultate der molekulargenetischen Untersuchungen an DNA-Proben von über 300 Patienten ergänzt.

3.1.1 Ausschluss von Mutationen in den Genen *SGCE* und *TUBB4A*

Am Anfang dieses Projekts stand die Prüfung, ob die neun Personen, von denen Exom-Daten vorlagen (Dys480, Dys499, Dys572, Dys631, Dys780, Dys861, Dys1233, L-8352 und L-8353), Mutationen in den Genen *SGCE* oder *TUBB4A* aufweisen, welche die Erkrankung bereits erklären würden.

3.1.1.1 Filtern des Exom-Datensatzes nach Mutationen in *SGCE* und *TUBB4A*

Die Filterung des kombinierten Exom-Datensatzes der neun an Alkohol-responsiver Dystonie erkrankten Individuen nach Varianten in den Genen *SGCE* und *TUBB4A* erbrachte keine Treffer für *TUBB4A*, zeigte aber zwei Varianten im *SGCE*-Gen. Betroffen waren die Individuen Dys572 und Dys1233 (s. Tab. 16). Diese Varianten wurden per Sanger-Sequenzierung nachgeprüft und konnten beide bestätigt werden.

Das „American College of Medical Genetics and Genomics“ sowie die „Association for Molecular Pathology“ haben eine Konsensus-Empfehlung zur Interpretation von Sequenz-Varianten herausgegeben, welche die Kategorien „benigne“, „wahrscheinlich benigne“, „Variante unklarer Signifikanz“, „wahrscheinlich pathogen“ sowie „pathogen“ umfasst. Die zugrundeliegenden Kriterien berücksichtigen u.a. Populationsdaten, *Scorings* von Prädiktionsprogrammen, funktionelle Studien und Daten zur Segregation. Nach einem Punktesystem erfolgt schließlich die Einordnung in die obengenannten Kategorien (Richards et al. 2015). Die *SGCE*-Variante p.L184P ist danach am ehesten als „wahrscheinlich pathogen“ einzuordnen. Denn sie wurde bereits in zwei Familien mit mehreren von Myoklonus-Dystonie Betroffenen als ursächliches Krankheitsgen beschrieben, kommt in der Populations-Datenbank *gnomAD* mit über 120.000 Exom-Datensätzen nicht vor und wird von

mehreren Prädiktionsprogrammen als pathogen eingestuft. In die Datenbank „ClinVar“ des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/clinvar/>) wurde diese Variante von drei verschiedenen Diagnostikfirmen eingegeben. Deren Interpretationen zur Pathogenität der Variante sind widersprüchlich und reichen von „Variante unklarer Signifikanz“, über „wahrscheinlich pathogen“ bis hin zu „pathogen“.

Tabelle 16: Charakterisierung der *SGCE*-Varianten p.L184P und p.Y267N anhand von Populationsdaten, Prädiktionsprogrammen und verfügbarer Literatur als Grundlage zur Interpretation der Pathogenität der Varianten.

Angaben zur Position der Variante		c.551T>C, p.L184P (Exon 5)	c.799T>A, p.Y267N (Exon 6)
Betroffenes Individuum		Dys1233	Dys572
Allelfrequenz (<i>gnomAD</i>)		Nicht gelistet	0,00003
Prädiktionsprogramme	SIFT	Toleriert	Toleriert
	PolyPhen-2	Wahrscheinlich schädlich	Benigne
	Mutation Taster	Krankheitsverursachend	Wahrscheinlich harmlos
	CADD-Score	18,38	10,72
Zahl bekannter Patienten/Familien		2 Familien, insgesamt mindestens 6 Betroffene	Keine Angaben gefunden
Funktionelle Studien		Keine gefunden	Keine gefunden

Die Scores der Prädiktionsprogramme entsprechen den Angaben in der, von der ausführenden Diagnostikfirma bereitgestellten, Excel-Datei mit den Exom-Datensätzen. Anmerkung zu *gnomAD*: die Variante p.L184P selbst ist nicht gelistet, jedoch 2 andere Varianten an dieser Position kommen vor: p.L184L und p.L184F. Die Varianten wurden in je 1 von 250854 bzw. 250830 abgelesenen Allelen gefunden. (Allelfrequenz je: 0,000004). Die Variante p.Y267N wurde in 7 von 249018 abgelesenen Allelen gefunden, davon waren 0 homozygote Allelträger. Beschreibungen zu Familien/ Betroffenen mit Myoklonus-Dystonie, die die *SGCE*-Mutation p.L184P tragen, finden sich in: (Klein et al. 2000; Hjermland et al. 2008; Raymond et al. 2008). Positionsangaben beruhen auf dem Transkript: NM_003919.

Die *Missense*-Variante c.799T>A, p.Y267N wurde meinen Recherchen zufolge bisher nicht in der Literatur publiziert. Sie erfüllt weder die Kriterien für eine (wahrscheinlich) benigne noch für eine (wahrscheinlich) pathogene Variante und ist damit am ehesten als „Variante unklarer Signifikanz“ einzustufen. Denn sie ist zwar in dem Krankheitsgen *SGCE* lokalisiert und die Populationsfrequenz ist sehr niedrig, jedoch fehlt weitere Evidenz für die Pathogenität der Variante und verschiedene betrachtete Prädiktionsprogramme stufen die Variante als potenziell neutral/ benigne ein. Einem strikten Ansatz folgend (unter der Annahme, dass beide Varianten krankheitsrelevant sein könnten) wurden zunächst die beiden Individuen mit *SGCE*-Varianten Dys1233 und Dys572 von den weiteren Filterschritten der Exom-Datensätze zur Identifikation von Kandidatengenen ausgeschlossen.

3.1.1.2 Screening der verbliebenen sieben Individuen

Um sicherzustellen, dass die verbliebenen sieben Individuen keine *TUBB4A*- oder *SGCE*-Varianten aufweisen, die in der Exom-Sequenzierung nicht entdeckt bzw. durch die Vorfilter herausgefiltert wurden, wurden jeweils alle codierenden Exons per Sanger-Sequenzierung überprüft. Bei den sieben Individuen Dys480, Dys499, Dys631, Dys780, Dys861, L-8352 und L-8353 konnten keine Varianten im Gen *SGCE* entdeckt werden.

Wie Tabelle 17 zeigt, findet sich bei den Individuen Dys631, Dys780, Dys861, L-8352, L-8353 im Gen *TUBB4A* die synonyme Variante p.V258V (rs2071347) in homozygoter Form. Dys480 und Dys499 sind von dieser Variante heterozygot betroffen. Diese Variante findet sich aber auch in der Allgemeinbevölkerung mit einer Allelfrequenz von 0,63. Bei der Person Dys499 findet sich zusätzlich in heterozygoter Form die synonyme Variante p.H307H (rs118102196). Diese weist in der Gesamtpopulation eine Frequenz von etwa 0,01 auf. Da es sich in beiden Fällen um synonyme Varianten handelt, die sich also nicht auf die Proteinstruktur auswirken, wurden beide Varianten als nicht krankheitsrelevant eingestuft. Die Exomdaten der Individuen Dys480, Dys499, Dys631, Dys780, Dys861, L-8352 und L-8353 wurden daher in die weiteren Analysen eingeschlossen.

Tabelle 17: Ergebnisse des Screenings von sieben Individuen der Dystonia Coalition mit Alkohol-responsiver Dystonie auf Mutationen im Gen *TUBB4A*.

	Dys480	Dys499	Dys631	Dys780	Dys861	L-8352	L-8353
rs2071347 (Exon 4)	Het	Het	Hom	Hom	Hom	Hom	Hom
rs118102196 (Exon 4)	WT	Het	WT	WT	WT	WT	WT

Bei den untersuchten Individuen wurden keine Varianten in den Exons 1, 2 und 3 des Gens *TUBB4A* gefunden. Beruhend auf den Angaben von Transkript: ENST00000264071.7. Het: Heterozygot; Hom: Homozygot; WT: Wildtyp
rs2071347: c.774T>C, p.V258V; Allelfrequenz Gesamtpopulation: A:0,37, G:0,63 (1000 Genomes Project Phase 3)
rs118102196: c.921C>T, p.H307H; Allelfrequenz Gesamtpopulation: A ~0,01, G: 0,99 (1000 Genomes Project Phase 3)

3.1.2 Filterung der kombinierten Exom-Datensätze von Patienten mit Alkohol-responsiver Dystonie

Als nächster Schritt der Suche nach genetischen Ursachen bei Alkohol-responsiven Dystonien erfolgte die Filterung der Exom-Datensätze der untersuchten Patienten zur Identifizierung von Kandidatengenen. Da es sich bei der verwendeten Excel-Datei um eine kombinierte Darstellung der Varianten bei den ursprünglich ausgewählten neun Patienten handelte, steht am Anfang in Abbildung 18 „Kombinierte Exom-Datensätze von neun an Alkohol-responsiver Dystonie erkrankten

Individuen“. Als Teil der ausgeführten Filterkaskade wurden dann Varianten in den *SGCE*-Mutationsträgern Dys572 und Dys1233 von weiteren Betrachtungen ausgeschlossen. Die verschiedenen aufeinanderfolgenden Filterschritte und die damit einhergehende Reduktion der als potentiell krankheitsverursachend angesehenen Kandidatengene sind in Abbildung 18 dargestellt.

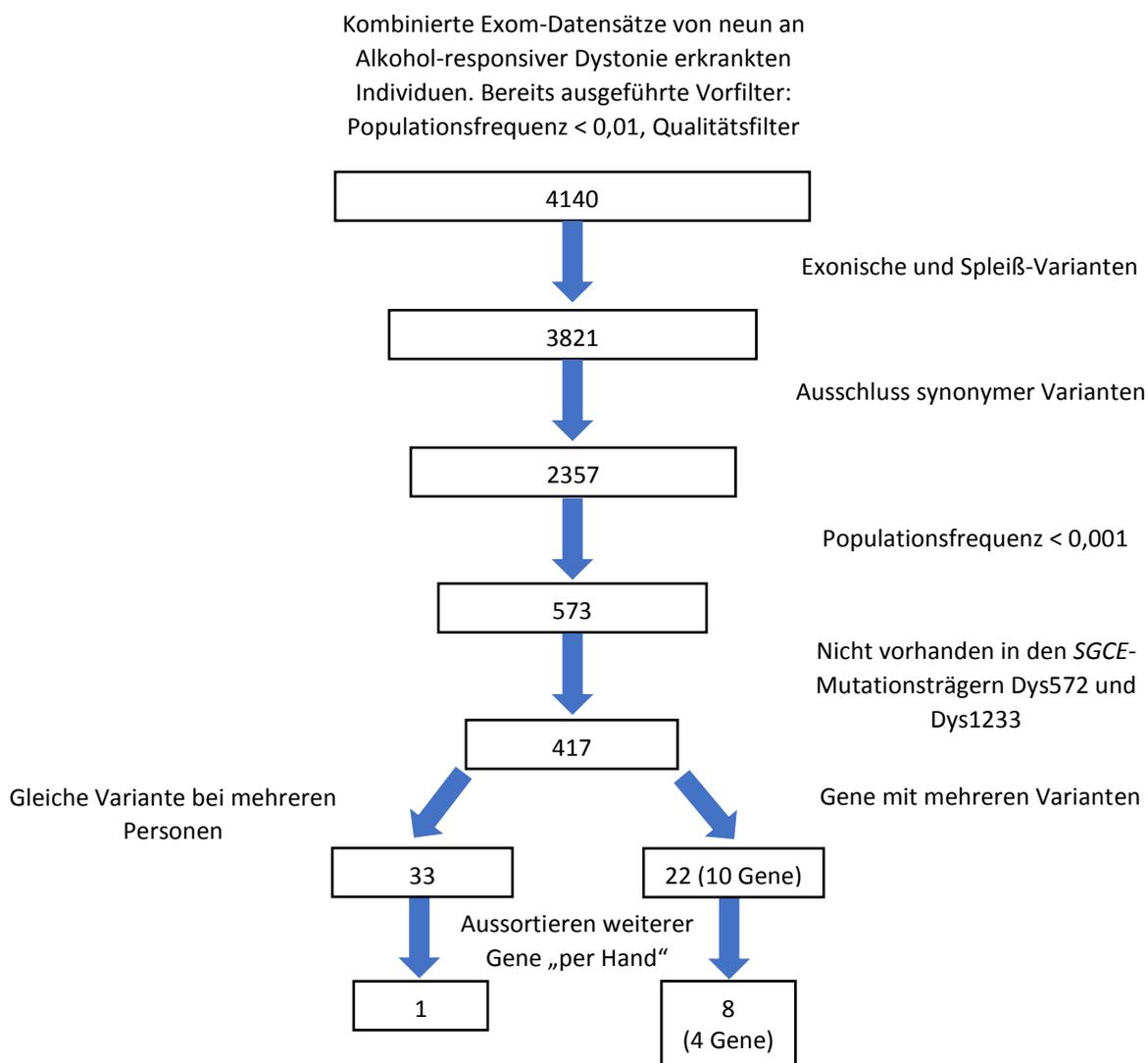


Abbildung 18: Filterschritte, die auf die kombinierten Exom-Datensätze von neun an Alkohol-responsiver Dystonie erkrankten Individuen angewendet wurden.

Zunächst wurde nach Varianten gefiltert, die zu Änderungen der Proteinstruktur führen (exonische und Spleiß-Varianten, Ausschluss synonymmer Varianten). Aufgrund der sehr niedrigen Prävalenz von Dystonie-Erkrankungen wurden nur Varianten mit einer Populationsfrequenz von < 0,001 weiter betrachtet. Ferner wurden Varianten in den Individuen Dys572 und Dys1233 ausgeschlossen, da bei diesen Personen Varianten im Gen *SGCE* nachgewiesen werden konnten, welche als (möglicherweise) krankheitsrelevant eingestuft wurden. Das Aussortieren weiterer Gene „per Hand“ umfasste folgende Schritte: Beim Vorkommen einer gleichen Variante bei mehreren Personen wurden alle Varianten ausgeschlossen, die nur die miteinander verwandten Individuen L-8352 und L-8353 betrafen. Im Falle von Genen, die verschiedene Varianten aufwiesen, wurden die Gene ausgeschlossen, bei denen die Varianten nur eine Person betrafen. Unter der Annahme, dass in den Verwandten L-8352 und L-8353 die gleiche Mutation krankheitsverursachend ist, wurden Varianten ausgeschlossen, wenn diese nur bei einer der beiden Personen zu finden waren.

Das Filtern nach exonischen und Spleiß-Varianten sowie der Ausschluss synonyme Varianten konnte die Anzahl der interessierenden Varianten in etwa halbieren. Im nächsten Filterschritt wurde nach Varianten gesucht, die in allen in der Datei angegebenen Subpopulation des *Exome Aggregation Consortiums* und des *1000GenomeProjects* eine Frequenz $< 0,001$ (oder keine Angabe) aufwiesen. Schließlich wurden Varianten ausgeschlossen, die auch in den *SGCE*-Mutationsträgern Dys1233 und Dys572 vorkamen, was zu einer Verringerung auf 417 Kandidaten führte.

Nun wurde einerseits nach Genen gesucht, in denen mehrere verschiedene Varianten gelistet waren und andererseits nach Varianten, die bei mehreren Personen auftauchten. Auf der einen Seite konnten 33 Varianten gefunden werden, die in mehreren Personen vorkamen. Von diesen wurden alle aussortiert, die lediglich L-8352 und L-8353 betrafen, jedoch keine der anderen erkrankten Personen. Da die Individuen L-8352 und L-8353 miteinander verwandt sind, ist es wahrscheinlich, dass einige Varianten bei beiden vorkommen ohne dass diese Dystonie-*verursachend* sind. Danach verblieb eine Variante, die in zwei der von Alkohol-responsiver Dystonie betroffenen Individuen (Dys631 und Dys780) gefunden wurde. Dabei handelte es sich um eine Insertion von drei Basenpaaren im Exon 1 des Gens *MN1* (c.1595_1596insGCA, p.Q532delinsQQ (NM_002430)). Auf der anderen Seite gab es 10 Gene mit mehreren Varianten. Hiervon wurden weitere Gene ausgeschlossen, bei denen die Varianten die gleiche Person (und keine weitere Person) betrafen. Beruhend auf der Annahme, dass in den verwandten Personen L-8352 und L-8353 die gleiche Mutation krankheitsverursachend ist, wurden Varianten ausgeschlossen, wenn diese nur bei einer der beiden Personen zu finden waren. Schließlich blieben vier Gene übrig, die Varianten in mehreren Betroffenen aufwiesen (s. Tab. 18).

Anschließend wurde eine Literaturrecherche durchgeführt und die Datenbanken *PubMed* und *OMIM* des *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) sowie *UniProt* und *Expression Atlas* des *European Molecular Biology Laboratory* (EMBL) nach Informationen zur jeweiligen Genfunktion und Expression durchsucht. Vor allem interessierte, ob die Genprodukte in neuronalen Geweben exprimiert werden und ob bereits Erkrankungen bekannt sind, die mit Mutationen in diesen Genen assoziiert sind. Des Weiteren wurden die in dem Datensatz angegebenen *Scores* diverser *in silico*-Prädiktionsprogramme betrachtet (s. Tab. 18) und verglichen.

Auf Basis der so gewonnenen Informationen erfolgte die Festlegung auf *MAP4K3*, *MBTPS1*, *PRKCQ* und *SCFD2* als Kandidatengene, die weiter untersucht werden sollten. Das Gen *MN1* wurde nicht in weitere Untersuchungen eingeschlossen, da sich die gefundene Variante p.Q532delinsQQ innerhalb eines Stretches von 28 Glutamin befindet und in diesem Bereich das Vorkommen einiger weiterer Insertionen und auch von Deletionen bekannt ist. Daher wurde vorrangig nicht von einer Pathogenität dieser Variante ausgegangen.

Tabelle 18: Angaben verschiedener *in silico*-Prädiktionsprogramme für die Kandidaten-Varianten in den Genen *MAP4K3*, *MBTPS1*, *PRKCQ* und *SCFD2* (A) sowie Angaben zur Expression und Funktion der Gene (B).

A)	<i>MAP4K3</i> Ex 15	<i>MAP4K3</i> Ex 29	<i>MBTPS1</i> Ex 9	<i>MBTPS1</i> Ex 13	<i>PRKCQ</i> Ex 13	<i>PRKCQ</i> Ex 17	<i>SCFD2</i> Ex 1	<i>SCFD2</i> Ex 8
Position der Variante	c.1116 T>A p.N372K	c.2142 A>G p.I714M	c.1130 C>G p.T377S	c.1735 G>A p.A579T	c.1442 C>T p.A481V	c.1955 G>A p.R652Q	c.38 G>C p.G13A	c.1930 G>A p.D644N
Betroffene Individuen	L-8352, L-8353	Dys861	Dys861	Dys631	Dys480	Dys780	Dys780	L-8352, L-8353
CADD-Score	14,5	16,21	26,9	32	17,31	12,87	2,738	18,17
SIFT	-	D	D	T	D	D	T	D
PolyPhen-2	B	D	D	P	D	P	B	D
LRT	D	D	D	D	D	D	N	D
Mutation Taster	D	D	D	D	D	D	N	D
Allel-frequenz (gnomAD)	0,00025 (0 hom)	0,00013 (0 hom)	0,00008 (0 hom)	0,00004 (0 hom)	0,00008 (0 hom)	0,00032 (1 hom)	0,00023 (0 hom)	Nicht gelistet
B)	<i>MAP4K3</i>		<i>MBTPS1</i>		<i>PRKCQ</i>		<i>SCFD2</i>	
Expression (Expression Atlas)	Verschiedene Gewebe; im Bereich des Nervensystems u.a.: Zerebellum, zerebraler Kortex (in geringerem Maße: Putamen, Globus Pallidus, Substantia nigra, Nucleus caudatus, Rückenmark)		Verschiedene Gewebe; im Bereich des Nervensystems u.a.: Putamen, Zerebellum, Nucleus caudatus, Globus pallidus (in geringerem Maße: Substantia nigra, Rückenmark)		Verschiedene Gewebe, im Bereich des Nervensystems u.a.: Substantia nigra, Nucleus caudatus, zerebraler Kortex		Verschiedene Gewebe, im Bereich des Nervensystems u.a.: Substantia nigra, Globus pallidus, Zerebellum, zerebraler Kortex, Nucleus caudatus, Putamen	
Beteiligung an biologischen Prozessen (UniProt)	intrazelluläre Signaltransduktion, JNK-Kaskade, Aktivierung von Protein-Kinasen-Aktivität, Stress-aktivierte Protein-Kinase-Signal-Kaskade		Regulation von Cholesterol-Biosynthese-Prozessen, Antwort auf ER-Stress, Antwort auf ungefaltete Proteine, Organisation von Lysosomen, Proteolyse, post-translationalale Protein-Modifikation		Verschiedene regulatorische Funktionen im Rahmen von T-Zell-Prozessen, Entzündungsreaktion Thrombozyten-Aktivierung und -Aggregation, intrazelluläre Signaltransduktion, Protein-Kinase-Aktivität, Axon-Lenkung		Protein-Transport, Andocken von Vesikeln, Beteiligung an der Exozytose	

Angaben zur Position beruhen auf folgenden Transkripten: *MAP4K3*: NM_003618; *MBTPS1*: NM_003791; *PRKCQ*: NM_006257; *SCFD2*: NM_152540. Kennzeichnungen bei UniProt: *MAP4K3*: Q8IVH8; *MBTPS1*: Q14703; *PRKCQ*: Q04759; *SCFD2*: Q8WU76. Die Angaben zur Expression und zur Beteiligung an biologischen Prozessen sind nur ausschnittsweise dargestellt und zum Teil zusammengefasst. Bei allen betrachteten Genen liegt eine Expression in etlichen verschiedenen Geweben vor. Hier werden nur Angaben zur Expression im Nervengewebe aufgeführt und zwar vornehmlich in anatomischen Strukturen, die im Rahmen einer Bewegungsstörung interessant sein könnten wie zerebraler Kortex,

Basalganglien, Zerebellum, Rückenmark. Für vollständige Annotationen zur Proteinfunktion und Expression siehe unter <https://www.uniprot.org> und <https://www.ebi.ac.uk/gxa/home>.

Hom: homozygot, ER: Endoplasmatisches Retikulum, JNK: c-Jun N-terminale Kinasen, Bedeutung der Angaben der Prädiktionsprogramme: SIFT: D: *deleterious* (schädlich), T: *tolerated* (toleriert); PolyPhen-2: D: *probably damaging* (wahrscheinlich schädlich), P: *possibly damaging* (möglicherweise schädlich), B: *benign* (benigne); LRT: D: *deleterious* (schädlich), N: neutral; MutationTaster: D: *disease causing* (krankheitsverursachend), N: *polymorphism [probably harmless]* (Polymorphismus, wahrscheinlich harmlos).

3.1.3 Validierung der Varianten per Sanger-Sequenzierung

Das Vorhandensein der in Tabelle 18 aufgelisteten acht Varianten in den Genen *MAP4K3*, *MBTPS1*, *PRKCQ* und *SCFD2* in den entsprechenden erkrankten Individuen wurde per Sanger-Sequenzierung nachgeprüft. Alle Varianten konnten so bestätigt werden. Zwei Beispiele der Sanger-Sequenzierung sind in Abbildung 19 zu sehen.

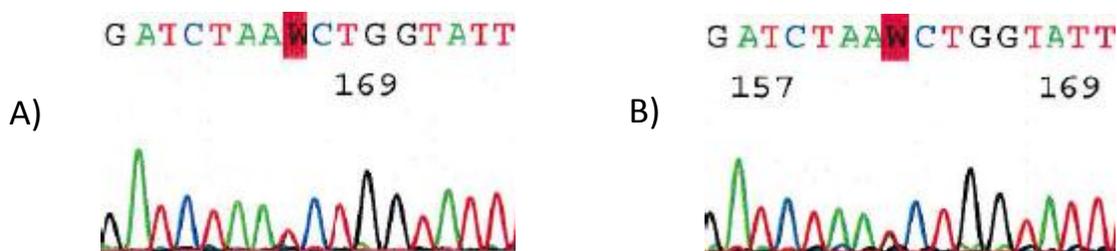


Abbildung 19: Ergebnisse der Validierung der im Exom-Datensatz identifizierte Kandidatenvarianten per Sanger-Sequenzierung am Beispiel des Gens *MAP4K3* und den Individuen L-8352 und L-8353.

Gezeigt ist jeweils ein Ausschnitt von Exon 15 des Gens *MAP4K3* (GATCTTAATCTG) mit den ersten 5 Basen des anschließenden Introns. In A) ist die Sequenz von Patient L-8352 und in B) die Sequenz von L-8353 zu sehen. An der mit „W“ markierten Position tragen die Patienten heterozygot die Allele T und A. Das Wildtyp-Allel ist T. Somit liegt bei beiden Patienten an dieser Stelle eine heterozygote *de novo*-Mutation vor.

3.1.4 *In silico*-Betrachtung: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in den Kandidatengen

Die cDNA-Sequenz der Kandidatengene *MAP4K3*, *MBTPS1*, *PRKCQ* und *SCFD2* sowie die Nukleotidsequenz jeweils 5000 bp vor Translationsstart und nach Translationsende wurden auf das Vorkommen des sogenannten Alkohol-responsiven Elements (ARE) „TCTGCGTCTCT“ hin untersucht. Ebenso verfahren wurde für die Gene *TUBB4A* und *SGCE*. Es wurde ebenfalls nach dem ARE in gegenläufiger Richtung gesucht „TCTCTGCGTCT“. Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 40 – 47 im Anhang dargestellt. Das ARE konnte in keinem der untersuchten DNA-Abschnitte in unveränderter Form gefunden werden.

Treffer innerhalb der cDNA-Sequenz

Für die Gene *PRKCQ* und *MBTPS1* ergaben sich im Bereich der cDNA-Sequenz nur Treffer mit mindestens 3 Fehlpaarungen. Dabei war in allen Fällen wenigstens eine der stark konservierten Basen des ARE betroffen. Im Fall der Gene *MAP4K3* und *SCFD2* ergaben sich für die „Vorwärtsrichtung“ des ARE ebenfalls nur Treffer mit mindestens 3 Fehlpaarungen. Für die „Rückwärtsrichtung“ des ARE konnte für beide Gene in mindestens einem Transkript jeweils ein Treffer mit nur 2 Fehlpaarungen gefunden werden. Auch für diese Gene war bei allen Treffern zumindest eine der hoch konservierten Basen von einer Fehlpaarung betroffen.

Treffer innerhalb von 5000 bp vor bzw. hinter der cDNA-Sequenz

Für die Nukleotidsequenz 5000 bp vor und hinter dem translatierten Bereich wurden aufgrund des großen Umfangs dieses Bereichs nur maximal 2 Fehlpaarungen erlaubt. Im Bereich von 5000 bp vor Translationsstart konnte für *PRKCQ* jeweils ein Treffer mit 2 Fehlpaarungen für die Vorwärts- und Rückwärtsrichtung des ARE gefunden werden, bei denen keine der konservierten Basen betroffen waren. In dem entsprechenden Bereich vor dem Gen *MBTPS1* konnte ebenfalls ein Treffer mit 2 Fehlpaarungen an degenerierten Positionen entdeckt werden. Alle diese Hits liegen mit einer Entfernung von über 3000 bp sehr weit vom translatierten Bereich der jeweiligen Gene entfernt. Auch im Falle der Gene *MAP4K3* und *SCFD2* konnten Treffer mit 2 Fehlpaarungen gefunden werden, allerdings mit betroffenen konservierten Basen.

Für den Bereich 5000 bp hinter Translationsende der jeweiligen Gene konnte für *SCFD2* das Motiv des ARE mit nur einer Abweichung entdeckt werden. Diese betraf aber eine konservierte Base des ARE. *PRKCQ* weist im Abstand von weniger als 500 bp nach Translationsende eine Basenabfolge auf, die vom Motiv des ARE in 2 Positionen abweicht, wobei jeweils degenerierte Positionen betroffen sind. Für die anderen Gene gilt, dass alle Treffer mindestens 2 Fehlpaarungen enthalten, jeweils mindestens eine an der Position einer konservierten Base.

Treffer in den Genen *TUBB4A* und *SGCE*

Als Vergleich wurden ebenso die cDNA-Sequenzen mit umgebenden 5000 bp vor und hinter dem translatierten Bereich von *TUBB4A* und *SGCE* auf das Vorhandensein des ARE überprüft. Innerhalb der codierenden Sequenz dieser mit Alkohol-responsiver Dystonie vergesellschafteten Gene konnte das Motiv des ARE sowohl in Vorwärts- als auch in Rückwärtsrichtung nur mit mindestens 2 abweichenden Positionen gefunden werden. Bei diesem Treffer im *SGCE*-Gen und auch bei den Hits mit 3 abweichenden Positionen, waren immer auch konservierte Basen des ARE betroffen. Im Bereich von 5000 bp vor Translationsstart konnte im Fall von *SGCE* eine näherungsweise

Übereinstimmung mit der Rückwärtsrichtung des ARE gefunden werden. Die beiden abweichenden Basen befinden sich an Positionen von degenerierten Basen.

Im Fall des Gens *TUBB4A* konnte knapp 1500 bp nach Translationsende eine Basenabfolge gefunden werden, die bis auf eine Position dem ARE in Rückwärtsrichtung entspricht. Von der Fehlpaarung ist eine nicht konservierte Base betroffen.

Die Untersuchung der Kandidatengene auf das Vorhandensein des ARE konnte nicht helfen, eine eindeutige Hierarchisierung der einzelnen Gene in Bezug auf ihre Plausibilität als Krankheitsursache vorzunehmen. Bei den Genen *MBTPS1* und *PRKCQ* konnten im Bereich von 5000 bp vor und hinter der translatierten Sequenz immerhin Basenabfolgen detektiert werden, die „nur“ an 2 als veränderlich beschriebenen Positionen vom ARE abweichen. Basierend auf den bereits zuvor während der Literaturrecherche gewonnenen Informationen und unter Berücksichtigung der *Scores* verschiedener *in silico*-Prädiktionsprogramme (Tab. 18), wurden die Gene *MBTPS1* und *PRKCQ* als vorrangig interessierende Kandidaten ausgewählt.

3.1.5 Überprüfung von Kontrollprobanden und Screening weiterer Patienten auf Varianten in den Genen *MBTPS1* und *PRKCQ*

Die Varianten *MBTPS1* c.1130C>G und c.1735G>A sowie *PRKCQ* c.1442C>T und c.1955G>A konnten jeweils in 180 gesunden Kontroll-Probanden nicht nachgewiesen werden.

Zur Validierung, ob es sich bei den gefundenen Kandidaten-Varianten, tatsächlich um Mutationen handelt, die zu Alkohol-responsiver Dystonie führen, wurden 309 weitere Patienten der *Dystonia Coalition* mit Alkohol-responsiver Dystonie gescreent. Untersucht wurden die Exons 9 und 13 des Gens *MBTPS1* sowie die Exons 13 und 17 des Gens *PRKCQ*. Zur Einstufung der möglichen Pathogenität von entdeckten Varianten wurde die Allelfrequenz in der untersuchten Kohorte mit der in der Allgemeinbevölkerung verglichen. Außerdem wurden verschiedene *in silico*-Prädiktionsprogramme angewendet.

3.1.5.1 *PRKCQ*

Bei keinem der weiteren 309 Patienten der *Dystonia Coalition* konnten die Kandidaten-Varianten c.1442C>T oder c.1955G>A entdeckt werden. Bei 97 der untersuchten Individuen wurde die synonyme Variante rs11258747 (p.R616R; c.1846C>A (NM_006257.4)) im Exon 17 in heterozygoter und in weiteren 24 Individuen in homozygoter Form gefunden. Dies entspricht einer Allelfrequenz von 0,235 in unsere Kohorte. Das *Exome Aggregation Consortium* gibt für die Gesamtbevölkerung eine Allelfrequenz von 0,182 und für die europäische (nicht finnische) Subpopulation von 0,224 an.

Der CADD-Score für diese Variante beträgt 12,39 und das Prädiktionsprogramm *MutationTaster* (www.mutationtaster.org) stuft diese Variante als Polymorphismus ein.

Weiterhin wurde in zwei der Patienten die heterozygote synonyme Variante rs201623843 (p.R644R; c.1930C>A (NM_006257.4)) entdeckt. Einer der beiden Betroffenen trägt zusätzlich die oben genannte Variante p.R616R. Die p.R644R-Variante hat damit in unserer Kohorte eine Allelfrequenz von 0,003. In der Gesamtbevölkerung wird die Frequenz mit 0,0002 angegeben und für nicht-finnische Europäer mit 0,0003. Für diese Variante ist der CADD-Score 14,92 und *MutationTaster* sagt einen krankheitsverursachenden Effekt voraus. Zudem gibt das Prädiktionsprogramm für Spleiß-Stellen des *Berkeley Drosophila Genome Projects* (im Folgenden als „fruitfly“ bezeichnet, zu finden unter <https://fruitfly.org>) die mögliche Veränderung der Stärke einer Spleiß-Stelle an (von 0,22 auf 0,64). Als unterer Grenzwert wurde 0,1 gesetzt. Der maximal erreichbare Score liegt bei 1. Ein Überblick über die Ergebnisse ist in Tabelle 19 zusammengefasst.

3.1.5.2 MBTPS1

In keinem der untersuchten 309 Individuen konnte eine Variante innerhalb der Exons 9 und 13 des Gens *MBTPS1* detektiert werden. In einem Patienten fand sich eine intronische Variante drei Basenpaare hinter Ende des Exons 13: rs192093489 (c.1782+3A>G (NM_003791.3)). Die im *ExAC*-Browser dafür angegebene Allelfrequenz liegt bei 0,0009 (die Allelfrequenz für (nicht finnische) Europäer beträgt 0,001). Der CADD-Score für diese Variante beträgt nur 2,122, aber *MutationTaster* sagt einen krankheitsverursachenden Effekt und *fruitfly* die Veränderung der Stärke einer Spleiß-Stelle (von 0,89 im WT auf 0,28 im mutierten Gen) voraus.

Tabelle 19: Vergleich der in der Kohorte von 309 Patienten der *Dystonia Coalition* gefundenen Varianten in den Genen *PRKCQ* und *MBTPS1* bezüglich der Populationsfrequenz und der Scores der Prädiktionsprogramme CADD, *MutationTaster* und *fruitfly*.

	Allelfrequenz in der untersuchten Kohorte der <i>Dystonia Coalition</i>	Allelfrequenz Nach Angaben des <i>ExAC</i> -Browsers	CADD-Score	<i>MutationTaster</i>	<i>fruitfly</i> : Änderungen der Stärke von Spleiß-Stellen Wildtyp → Mutante
<i>PRKCQ</i> p.R616R	0,235	0,182	12,39	Polymorphismus	Kein Unterschied
<i>PRKCQ</i> p.R644R	0,003	0,0002	14,92	Krankheitsverursachend	0,22 → 0,64
<i>MBTPS1</i> c.1782+3A>G	0,0016	0,0009	2,122	Krankheitsverursachend	0,89 → 0,28

Nach Betrachtung der Prädiktions-Scores und Vergleich der Allelfrequenzen in der untersuchten Kohorte mit denen in der Allgemeinbevölkerung (s. Tab. 19) können keine eindeutigen Schlussfolgerungen über die Pathogenität der gefundenen Varianten gemacht werden. Die p.R616R-Variante im Exon 17 des Gens *PRKCQ* scheint aufgrund ihrer Häufigkeit in der Allgemeinbevölkerung ein benigner Polymorphismus zu sein. Bei den Varianten p.R644R im Gen *PRKCQ* und der intronischen Variante im Gen *MBTPS1* spricht die Höhe des CADD-Scores eher gegen eine Pathogenität, während *MutationTaster* einen schädigenden Effekt voraussagt. Aussagen, ob es tatsächlich zu einem veränderten Spleißen und damit zu Veränderungen auf Proteinebene kommen würde, ließen sich nur mit vorhandener RNA der Betroffenen nachweisen. RNA-Proben der Probanden lagen aber zur Zeit der experimentellen Arbeiten an dieser Dissertation nicht vor. Da insgesamt also keine weiteren eindeutig vielversprechende Varianten in den Genen *MBTPS1* und *PRKCQ* in der untersuchten Kohorte der *Dystonia Coalition* gefunden werden konnten, lässt sich keine genauere Aussage darüber machen, ob die jeweiligen Varianten in den Individuen Dys861 und Dys631 (*MBTPS1*) bzw. Dys480 und Dys780 (*PRKCQ*) als krankheitsverursachende Mutationen in Frage kommen.

3.1.6 Zweite Filterung unter Einschluss der Exom-Daten eines Patienten mit *SGCE*-Variante unklarer Signifikanz

Es wurde beschlossen, noch einmal am Punkt der Filterschritte anzusetzen, um mögliche weitere Kandidatengene zu identifizieren. Bei der ersten Filterkaskade wurde ein in dem Sinne strikter Ansatz verfolgt, als dass alle Varianten, die auch in den Individuen Dys1233 und Dys572 vorkommen, herausgefiltert wurden. Während für die *SGCE*-Variante p.L184P bei Dys1233 bekannt ist, dass sie für die Entstehung von Alkohol-responsiven Dystonien ursächlich ist, liegen solche Daten für die Variante p.Y267N bei Dys572 nicht vor. Auch die Angaben diverser Prädiktionsprogramme (s. Tab. 20) weisen nicht eindeutig darauf hin, dass es sich hierbei um eine schädigende Mutation handelt. Vielmehr muss diese als „Variante unklarer Signifikanz“ bezeichnet werden, die möglicherweise nicht krankheitsverursachend ist.

Tabelle 20: Scores verschiedener Prädiktionsprogramme für die *SGCE*-Variante c.799T>A, p.Y267N.

	SIFT	LRT	PolyPhen-2	Mutation Taster	CADD
<i>SGCE</i> c.799T>A, p.Y267N	Toleriert	Neutral	Benigne	Polymorphismus (wahrscheinlich harmlos)	10,72

Daher wurde eine erneute Filterung des Exom-Datensatzes durchgeführt, bei der dieses Mal Varianten, die bei Dys572 vorkommen, nicht ausgeschlossen wurden. Ausgangspunkt waren die 573 Varianten, die die Filterkriterien „exonische und Spleiß-Varianten“, „Ausschluss synonymmer Varianten“ und „Populationsfrequenzen < 0,001“ erfüllen (s. Abb. 18, S.56). Anschließend wurde wieder nach Genen mit mehreren Varianten bzw. Varianten, die mehrere Personen betreffen, gesucht. Aus den gleichen Überlegungen wie in der ersten Runde wurden weitere Varianten per Hand aussortiert (s. Abb. 20).

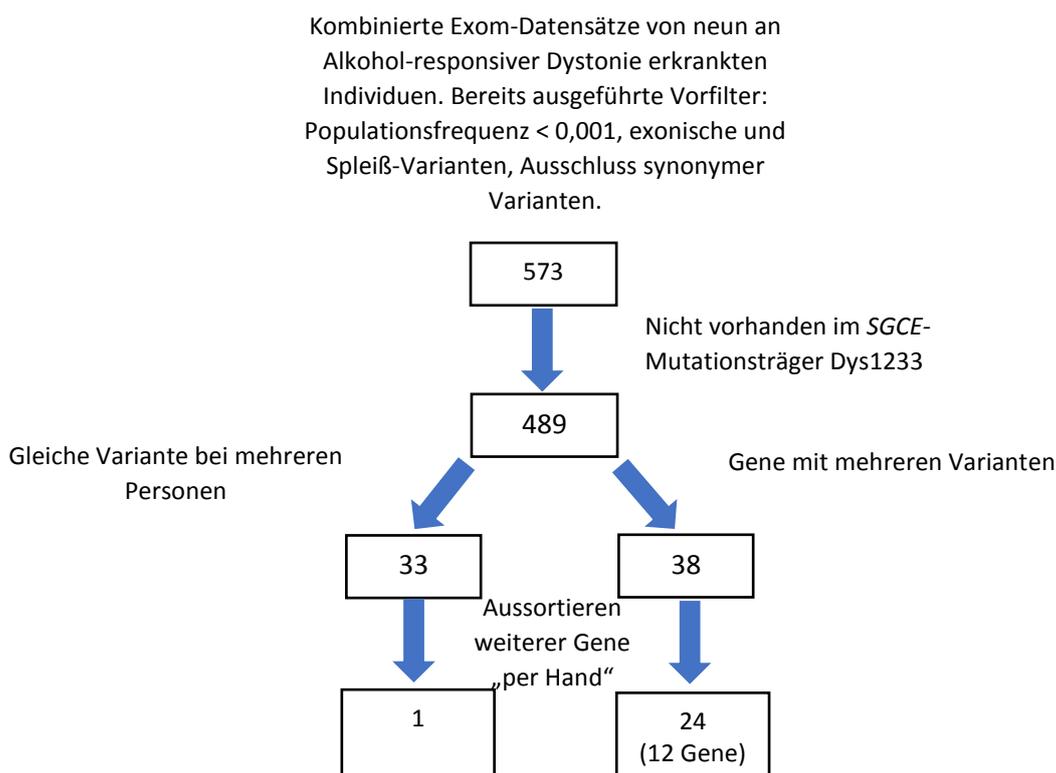


Abbildung 20: Filterschritte der kombinierten Exom-Datensätze von neun an Alkohol-responsiver Dystonie erkrankten Individuen ohne Ausschluss von Varianten bei Dys572.

Die kombinierten Exom-Datensätze waren bereits vorgefiltert worden (siehe Abbildung 18). In der ersten Filterung waren, einem strikten Ansatz folgend, Varianten in den Individuen Dys1233 und Dys572 ausgeschlossen worden, da bei beiden SGCE-Varianten nachgewiesen werden konnten. Da es sich aber nur bei der Variante in Dys1233 um eine wahrscheinlich pathogene Variante handelt, die Variante in Dys572 hingegen als „Variante unklarer Signifikanz“ eingestuft werden muss, die unter Umständen nicht die genetische Krankheitsursache bei diesem Patienten ist, wurden bei dieser Filterung nur Varianten in Dys1233 ausgeschlossen, jedoch bei Dys572 weiterbetrachtet. Am Ende der Filterkaskade wurden wiederum weitere Gene „per Hand“ aussortiert. Erläuterungen hierzu finden sich in der Legende zu Abb. 18.

Zusätzlich zu den in der ersten Runde identifizierten Kandidatengenen konnten so acht weitere auffindig gemacht werden, die bei mehreren der Betroffenen Varianten zeigen. Dies sind *TTN*, *SNAP91*, *AK9*, *MYO18A*, *MAP2K2*, *CDK12*, *WDR4*, *STK11IP*. Es konnten keine weiteren Varianten gefunden werden, die in gleicher Form bei mehreren Betroffenen auftreten. Wie schon zuvor wurde auch für die zusätzlichen Varianten eine Literaturrecherche ausgeführt sowie die Angaben

verschiedener Prädiktionsprogramme berücksichtigt. Basierend auf diesen Erkenntnissen wurden die Gene *MAP2K2* und *SNAP91* für weitere Untersuchungen ausgewählt. Genauere Angaben zu den Varianten, wie die cDNA-Position und die Auswirkungen auf Proteinebene finden sich in Tabelle 21.

Tabelle 21: Nach der zweiten Filterung der Exom-Datensätze von Patienten mit Alkohol-responsiver Dystonie ausgewählte Kandidatengene mit Angaben zur Position der bei den Betroffenen gefundenen Varianten.

Gen	Exon	cDNA	Protein	Betroffene Personen
<i>MAP2K2</i>	3	c.415A>G	p.S139G	Dys572
<i>MAP2K2</i>	7	c.842G>A	p.R281Q	Dys499
<i>SNAP91</i>	11	c.632G>A	p.R211Q	Dys572
<i>SNAP91</i>	29	c.2371C>G	p.P791A	Dys631

Angaben beruhen auf den Transkripten: *MAP2K2*: NM_030662, *SNAP91*: NM_001256717.

3.1.7 Validierung der zusätzlichen Varianten und Kontrollen

Das Vorhandensein der in Tabelle 21 genannten Varianten bei den Individuen Dys499, Dys572 und Dys631 konnte per Sanger-Sequenzierung bestätigt werden. Bei der Überprüfung von 165 gesunden Kontroll-Probanden konnte keine dieser Varianten nachgewiesen werden.

3.1.8 Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in den zusätzlichen Kandidatengenen

Wie schon in der ersten Runde der Untersuchungen wurde auch die codierende Sequenz der Gene *MAP2K2* und *SNAP91* sowie der Bereich jeweils 5000 bp vor Translationsstart und hinter Translationsende daraufhin untersucht, ob sie das sogenannte Alkohol-responsive Element enthalten. Für beide Gene konnten im gesamten betrachteten Bereich nur Treffer gefunden werden, die in mindestens 2 Positionen vom Motiv des ARE abweichen. Gleiches gilt für die Rückwärtsrichtung des ARE. Von den Abweichungen ist jeweils auch mindestens eine der hoch konservierten Basen des ARE-Motivs betroffen. Die genauen Ergebnisse sind in Tabelle 48 bis 51 im Anhang zu finden.

3.1.9 Screening weiterer Patienten auf Varianten in den zusätzlichen Kandidatengenen

Anschließend wurden wieder die DNA-Proben von 309 weiteren an Alkohol-responsiver Dystonie leidenden Personen auf Mutationen in den Exons 3 und 7 des Gens *MAP2K2* (Benennung entsprechend der Referenzsequenz NM_030662) und den Exons 11 und 29 des Gens *SNAP91* (NM_001256717) gescreent. Betrachtet wurden auch bis zu 20 bp vor und hinter den

entsprechenden Exons, um auch Varianten entdecken zu können, die möglicherweise zu einer Veränderung von Spleiß-Stellen führen.

Es wurden insgesamt eine intronische Variante im Gen *SNAP91* sowie 3 verschiedene intronische Varianten im Gen *MAP2K2* gefunden. Innerhalb der Exons wurde eine synonyme Variante im Exon 29 von *SNAP91* sowie je eine synonyme Variante in Exon 3 und Exon 7 von *MAP2K2* gefunden (Tab. 22). *Missense*- oder *Nonsense*-Varianten sowie Insertionen oder Deletionen wurden nicht entdeckt.

Tabelle 22: Beim Screening von 309 Patienten mit Alkohol-responsiver Dystonie gefundene Varianten in ausgewählten Exons und angrenzendem intronischen Bereichen der Gene *MAP2K2* und *SNAP91*.

Gen	Variante	Art der Variante	Zygotität	Anzahl Betroffene in Kohorte (n=309)	ExAC-Angaben	
					Allelfrequenz in Gesamtbevölkerung	Höchste Allelfrequenz in einer Subpopulation
SNAP91	c.554-11A>T 11 bp vor Exon 11	intron	het	1	Nicht gelistet	Nicht gelistet
SNAP91	c.2448G>A, p.L816L (rs77808123) Exon 29	syn	het	1	0,0006	0,0059 (Afr)
MAP2K2	c.304-19C>T (rs373352091) 19 bp vor Exon 3	intron	het	1	0,00008	0,0011 (andere)
MAP2K2	c.405G>C, p.G135G (rs10424722) Exon 3	syn	het	2	0,143	0,1532 (Afr)
MAP2K2	c.450+15G>T (rs10424545) 15 bp nach Exon 3	intron	het	2	0,0145	0,1559 (Afr)
MAP2K2	c.846C>T, p.P282P (rs11539506) Exon 7	syn	het	2	0,0032	0,0067 (Lat)
MAP2K2	c.919+12A>G (rs350911) 12 bp hinter Exon 7	intron	hom/ het	Allelfrequenz 0,731	0,7718	0,9304 (EAS)

Die Positionsangaben für *MAP2K2* beruhen auf den Transkripten NM_030662.3 und NP_109587.1 und die Angaben für *SNAP91* auf den Transkripten NM_001256717.1 und NP_001243646.1. intron = intronisch; syn = synonym; het = heterozygot; hom = homozygot; Afr = Afrikaner; EAS = East-Asian; Lat = Lateinamerikaner

Die meisten der entdeckten Varianten werden vom Prädiktionsprogramm *MutationTaster* als Polymorphismus eingestuft. Lediglich für die Varianten rs77808123 (c.2448G>A, p.L816L) in *SNAP91* und rs11539506 (c.846C>T, p.P282P) in *MAP2K2* wird ein krankheitsverursachender Effekt vorausgesagt. Für die Variante *MAP2K2* c.846C>T wird von *fruitfly* außerdem eine deutlich veränderte Stärke einer Spleiß-Stelle prognostiziert. An einer Position, an der im Wildtyp keine Spleiß-Stelle angegeben ist, wird für die Mutante eine Spleiß-Stelle mit einer Stärke von 0,94

vorhergesagt. Die Angaben des CADD-Scores liegen für alle Varianten außer für *SNAP91* c.2448G>A und *MAP2K2* c.405G>C, p.G135G (rs10424722) unter 10, für die beiden genannten Varianten unter 15 (s. Tab. 23).

Tabelle 23: Angaben diverser Prädiktionsprogramme zu den in den Genen *SNAP91* und *MAP2K2* gefundenen Varianten.

Gen	Variante	Mutation Taster	CADD-Score	fruitfly: Änderungen der Stärke von Spleiß-Stellen WT → Mutante
<i>SNAP91</i>	c.554-11A>T	P	8,294	X → 0,1 (Akzeptor Spleiß-Stelle)
<i>SNAP91</i>	c.2448G>A, p.L816L	D	13,15	-
<i>MAP2K2</i>	c.304-19C>T	P	0,636	0,87 → 0,83
<i>MAP2K2</i>	c.405G>C, p.G135G	P	12	0,78 → 0,74 0,79 → 0,87
<i>MAP2K2</i>	c.450+15G>T	P	3,789	-
<i>MAP2K2</i>	c.846C>T, p.P282P	D	9,071	X → 0,94 (Akzeptor Spleiß-Stelle)
<i>MAP2K2</i>	c.919+12A>G	P	5,790	-

P = Polymorphismus; D = *disease causing* (krankheitsverursachend); WT = Wildtyp

Erläuterungen zu den Angaben bei fruitfly: x = an dieser Position beim WT keine Spleiß-Stelle angegeben,

- = kein Unterschied zwischen WT und Mutante

In der Gesamtschau sprechen entweder die Häufigkeit der veränderten Allele in der Gesamtbevölkerung bzw. in einzelnen Subpopulation (s. Tab. 22) und/ oder die Angaben des Prädiktionsprogramms *MutationTaster* und der CADD-Score gegen eine Pathogenität der meisten identifizierten Varianten in den Genen *MAP2K2* und *SNAP91* (s. Tab. 23). Lediglich die Variante *MAP2K2* c.846C>T, für die die Entstehung einer neuen Akzeptor-Spleiß-Stelle vorausgesagt wird, erscheint weiterhin als möglicherweise krankheitsverursachende Variante interessant. Allerdings wurde diese auch nur in 2 von 309 an Alkohol-responsiver Dystonie erkrankten Patienten gefunden. Außerdem beträgt laut Angaben des *Exome Aggregation Consortiums* die durchschnittliche Populationsfrequenz dieser Variante 0,0032 und in der Subpopulation der Lateinamerikaner sogar 0,0067. Diese Allelfrequenz erscheint kritisch betrachtet zu hoch zu sein für eine seltene Bewegungsstörung wie es die Alkohol-responsive Dystonie ist. Denn für Dystonien wird allgemein eine Häufigkeit von etwa 16 pro 100.000 Einwohnern in der Bevölkerung angenommen (Steeves et al. 2012). Um letztendlich Aussagen treffen zu können, ob die oben genannte Variante tatsächlich zu schädigenden Effekten führt, wären weitere funktionelle Untersuchungen notwendig. Beispielsweise könnte überprüft werden, ob die Variante tatsächlich zu einem alternativen Spleißen führt, wenn

RNA des entsprechenden Patienten zur Verfügung stünde. Dies war während der Zeit meiner experimentellen Arbeiten im Labor nicht der Fall. Auch bei der Suche nach weiteren Trägern dieser Mutation in rund 200 Patienten, für die im Institut für Neurogenetik RNA-Proben vorhanden wären, konnten keine weiteren Betroffenen identifiziert werden. Daher lässt sich keine abschließende Aussage über die Pathogenität der Variante *MAP2K2* c.846C>T treffen.

3.2 Ergebnisse der Untersuchung der genetischen Krankheitsursache bei zwei jungen Patienten mit Dystonieerkrankungen

In einem zweiten Teil meiner Promotionsarbeit wurde, ausgehend von Trio-Exom-Sequenzierungen, nach der genetischen Ursache der Dystonieerkrankungen bei zwei jungen Patienten gesucht. Die Ergebnisse der zu diesem Zwecke durchgeführten Untersuchungen werden in den kommenden Abschnitten beschrieben.

3.2.1 Ergebnisse der Untersuchung der genetischen Krankheitsursache bei einer jungen Patientin mit komplexer generalisierter Dystonie

An dieser Stelle erfolgt eine Darstellung der einzelnen Ergebnisse, die schließlich zur Entdeckung der krankheitsursächlichen Mutation bei einer jungen Patientin mit komplexer generalisierter Dystonie führten (Steinrücke et al. 2016). Einzelne Schritte auf dem Weg dahin waren die Identifizierung von Kandidatengenen im Trio-Exom-Datensatz, deren Charakterisierung mit Hilfe von Exom- und Genom-Datenbanken, *in silico*-Prädiktionsprogrammen und verfügbarer Literatur sowie funktionelle Untersuchungen der vielversprechendsten Variante (Lohmann et al. 2017).

3.2.1.1 Filterung des Trio-Exom-Datensatzes von Familie 1

In Tabelle 24 sind die aufeinanderfolgenden Filterschritte dargestellt, welche auf den Trio-Exom-Datensatz der betrachteten Familie angewendet wurden, um mögliche krankheitsverursachende Kandidatengene zu identifizieren.

Im Falle des *de novo* heterozygoten Erbgangs standen am Ende dieser Filterkaskade 43 Varianten. Davon wurden weitere ausgeschlossen, wenn mehrere Varianten das gleiche Gen betrafen, sodass schließlich 15 Varianten als Kandidaten übrigblieben. Diese Varianten betrafen folgende Gene: *GNB1*, *LCE4A*, *KCNN3*, *NOP9*, *ZFH3*, *FAM171B*, *RPL29*, *CRIPAK*, *NOTCH4*, *FNDC1*, *AGMO*, *BHLHE22*, *PRUNE2*, *C9orf43*, *SYLT4*. Nach Rechenschritten zur Genfunktion, Expressionsdaten und möglichen mit Mutationen in diesen Genen assoziierten Krankheitsbildern erfolgte die Festlegung auf *GNB1*, *AGMO* und *PRUNE2* als vorrangig interessierende Kandidatengene.

Tabelle 24: Filterschritte zur Identifizierung von Kandidatengenen innerhalb des Trio-Exom-Datensatzes von Familie 1.

Filterschritte	<i>de novo</i> heterozygot	Anzahl Varianten	Compound heterozygot	Anzahl Varianten	homozygot	Anzahl Varianten
Vererbungsmodus	Het: Abs: Abs Het: Abs: n/a Het: n/a: Abs Het: n/a: n/a	5005	Het: n/a: Het Het: Abs: Het Het: Het: n/a Het: Het: Abs	19070	Hom: Het: Het	2789
Allelfrequenz im Index	$25 \leq x \leq 75$	3715	$25 \leq x \leq 75$	17594	≥ 75	2789
Ablesehäufigkeit	≥ 20	1316	≥ 20	14869	≥ 20	2348
Qualität	≥ 100	952	≥ 100	14790	≥ 100	2347
Distanz zum Exon:	-1, 0, 1, 2	398	-1, 0, 1, 2	7449	-1, 0, 1, 2	1132
Lokalisation der Variante	Spleiß-Stelle; exonisch	252	Spleiß-Stelle; exonisch	6408	Spleiß-Stelle; exonisch	979
Exonische Veränderung der Variante	Insertion; Deletion; Substitution; Nichtsynonyme Variante eines einzelnen Nukleotids; Verlust eines Stopp-Codons; Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons	210	Insertion; Deletion; Substitution; Nichtsynonyme Variante eines einzelnen Nukleotids; Verlust eines Stopp-Codons; Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons	3313	Insertion; Deletion; Substitution; Nichtsynonyme Variante eines einzelnen Nukleotids; Verlust eines Stopp-Codons; Entstehung eines vorzeitigen Stopp-Codons	453
Populationsfrequenz	$\leq 0,01$	172	$\leq 0,01$	408	$\leq 0,05$	7
In-Haus-Statistik	0/1 von 528 0/2 von 528 0/3 von 528	43	0/1 von 528 0/2 von 528 0/3 von 528	194	1/1-6 von 528 2/1-6 von 528 3/1-6 von 528	0

Het: heterozygot, Hom: homozygot, n/a bzw. Abs: Allel entspricht dem Wildtyp bzw. keine Angabe zu der Position vorhanden. Bei dem Vererbungsmodus betrifft die erste Position die Indexpatientin, die zweite Position die Mutter, die dritte Position den Vater. In der Zeile „In-Haus-Statistik“ steht die Angabe x/y von z für z = Anzahl der in der ausführenden Firma untersuchten Exome, x = Anzahl der Exome, in der die Variante in homozygoter Form detektiert wurde, y = Anzahl der Exome, in der die Variante in heterozygoter Form detektiert wurde.

Für den Vererbungsmodus „compound heterozygot“ wurde zunächst nach Varianten gefiltert, die bei der Indexpatientin und einem Elternteil vorkommen. Die weiteren Filterkriterien entsprachen denen des *de novo* heterozygoten Erbgangs. In diesem Fall verblieben nach der Filterkaskade noch 194 Varianten. Im Gegensatz zu den *de novo*-Varianten mussten Kandidatengene hier die Bedingung erfüllen, dass im gleichen Gen zwei Varianten vorkommen. Dies traf für 6 Varianten, also 3 Gene zu. Lediglich zwei Varianten, und damit ein Gen, entsprachen dem zusätzlichen Kriterium, dass eine

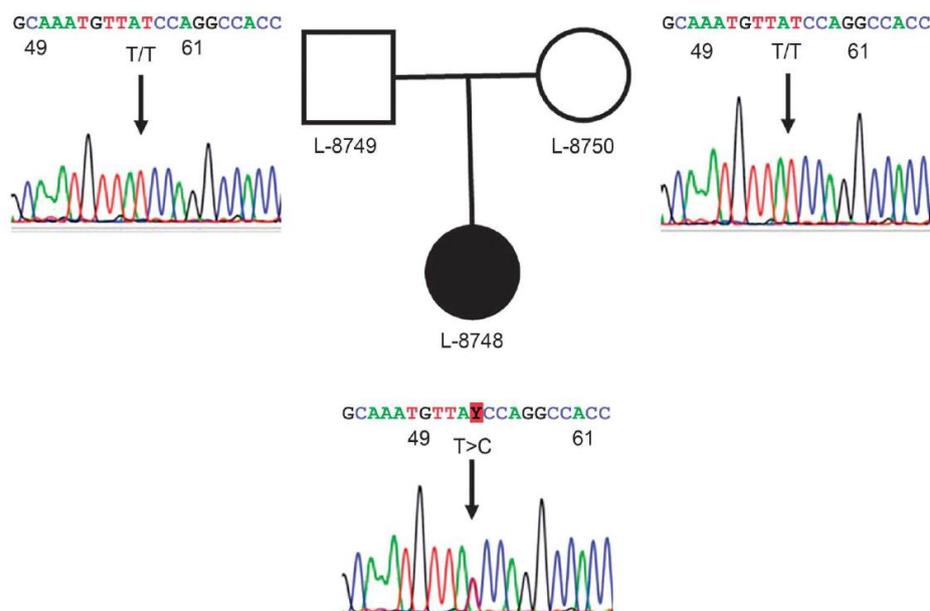
Variante von der Mutter und die andere Variante vom Vater vererbt wurde. Diese identifizierten Varianten betrafen das Gen *PTPN13*.

Auch der Fall einer neuen homozygoten Variante bei der Indexpatientin wurde in Erwägung gezogen. Als Unterschied zu den heterozygoten Vererbungsgängen wurde hier nach Varianten mit einer Populationsfrequenz von $\leq 0,05$ gefiltert. Keine der zuvor übriggebliebenen Varianten konnte das Filterkriterium zur In-Haus-Statistik erfüllen, sodass nach der Filterung keine Kandidaten-Variante für einen homozygot-rezessiven Erbgang verblieb.

3.2.1.2 Sanger-Sequenzierung der Kandidatenvarianten

Die durch die Filterkaskaden identifizierten Kandidaten-Varianten wurden mittels Sanger-Sequenzierung überprüft. Von den *de novo* heterozygoten Varianten ließ sich nur die *Missense*-Variante in *GNB1* (c.353A>G, p.D118G) als vorhanden in der Indexpatientin und nicht nachweisbar in ihren Eltern bestätigen (Abb. 21).

Abbildung 21:
Stammbaum der Familie 1 und Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung des Gens *GNB1* (Steinrücke et al. 2016, Abb. 1 B).



Im Gen *AGMO* wurden sowohl bei der Indexpatientin als auch bei ihrer Mutter eine das Leseraster-verschiebende Insertion gefunden (rs370025027; Allele: -/AA; cDNA-Position: 232, Protein Position: 21). Bezüglich des Gens *PRUNE2* stellte sich heraus, dass die Indexpatientin und ihr Vater in dem interessierenden Genbereich eine heterozygote Insertion von 12 Basenpaaren und die Mutter eine homozygote Insertion von 12 Basenpaaren tragen. Aufgrund der oben geschilderten Ergebnisse wurden die Varianten in den Genen *AGMO* und *PRUNE2* im Weiteren nicht mehr als relevant erachtet.

Des Weiteren ließen sich die heterozygoten Varianten im Gen *PTPN13* bestätigen. Die Variante c.1328G>A, p.S443N (Angabe nach Transkript NM_080685.2) findet sich bei der Indexpatientin und ihrer Mutter, die Variante c.4375T>C, p.S1459P bei der Indexpatientin und ihrem Vater. Damit ist ein compound heterozygoter Vererbungsgang gegeben. Nach der Sanger-Sequenzierung verblieben somit *GNB1* und *PTPN13* als potenziell krankheitsverursachende Gene von Interesse.

3.2.1.3 *In silico*-Prädiktionsprogramme

Zur Abwägung, ob die Variante in *GNB1* oder die Varianten in *PTPN13* wahrscheinlicher als krankheitsursächliche Mutationen in Frage kommen, wurden die *Scores* von diversen *in silico*-Prädiktionsprogrammen betrachtet (Tab. 25). Angaben zu diesen fanden sich im Trio-Exom-Datensatz der Firma Centogene AG.

Tabelle 25: Scores der *in silico*-Prädiktionsprogramme SIFT, PolyPhen-2, MutationTaster und CADD für Varianten in *GNB1* und *PTPN13*.

	<i>GNB1</i> (p.D118G)	<i>PTPN13</i> (p.S443N)	<i>PTPN13</i> (p.S1459P)
SIFT	Schädlich	Toleriert	Toleriert
PolyPhen-2	Wahrscheinlich schädlich	Benigne	Benigne
MutationTaster	krankheitsverursachend	Polymorphismus (wahrscheinlich harmlos)	Polymorphismus (wahrscheinlich harmlos)
CADD-Score	31	9,802	9,843

Der CADD-Score von 31 weist darauf hin, dass die *GNB1*-Variante zu den 0,1 % der schädlichsten Substitutionen des gesamten menschlichen Genoms gehört (Rentzsch et al. 2019). Hingegen sprechen der niedrige CADD-Score von unter 10 im Einklang mit den Vorhersagen der Prädiktionsprogramme SIFT, PolyPhen-2 und *MutationTaster* gegen schädigende Effekte der *PTPN13*-Varianten.

Einen weiteren Hinweis auf die Anfälligkeit eines Gens für schwerwiegende Funktionsbeeinträchtigungen durch genetische Varianten geben die Daten des *Exome Aggregation Consortiums* (ExAC) zur Anzahl der erwarteten und tatsächlich beobachteten *Missense*- und *Loss of Function*-Varianten sowie der zugehörige Z-Score bzw. pLI-Wert. Ein hoher, positiver Z-Score zeigt eine große Diskrepanz zwischen der beobachteten (niedrig) und erwarteten Anzahl (deutlich höher) der Varianten an. Darüber hinaus separiert das Maß „pLI“ (*probability of being loss-of-function* (LoF) *intolerant*) Gene ausreichender Länge in LoF-intolerant ($pLI \geq 0,9$) und LoF-tolerant ($pLI \leq 0,1$) (Lek et al. 2016). Ein hoher positiver Z-Wert für die *Missense*-Varianten und ein $pLI > 0,9$ zeigen also einen hohen Grad der Suszeptibilität eines Gens gegenüber genetischen Veränderungen an. Die Tatsache, dass in den 60.706 Individuen des *Exome Aggregation Consortiums* nur 29 verschiedene *Missense*-

Varianten und keine *Loss of Function*-Varianten gefunden wurden (Tab. 26) sowie der große Unterschied zu der jeweils erwarteten Anzahl an Varianten (Z-Wert der *Missense*-Varianten: 4,78, pLI = 1,00) , weisen somit auf die Unveränderlichkeit des Gens *GNB1* hin.

Tabelle 26: Angaben des Exome Aggregation Consortiums zur Häufigkeit von Varianten im Gen *GNB1* und *PTPN13* (letzter Zugriff: 28.08.2019).

	<i>GNB1</i>			<i>PTPN13</i>		
	Anzahl der erwarteten Varianten	Anzahl der beobachteten Varianten	<i>Constraint Metric</i>	Anzahl der erwarteten Varianten	Anzahl der beobachteten Varianten	<i>Constraint Metric</i>
Synonyme Varianten	71,8	74	Z = -0,16	253,1	286	Z = -1,28
<i>Missense</i> -Varianten	147,6	29	Z = 4,78	626,8	780	Z = -2,99
<i>Loss of Function</i>	15,5	0	pLI = 1,00	76,3	30	pLI = 0,00

Diese Beobachtung lässt vermuten, dass zufällige Variationen in *GNB1* eine derart schwerwiegende Auswirkung auf die Genfunktion haben, dass diese entweder direkt letal sind oder zu einer solch eingeschränkten biologischen Fitness führen, dass sich die Betroffenen nicht weiter bzw. nur eingeschränkt fortpflanzen können. Weiterhin sprechen die Zahlen für eine enorme Wichtigkeit des Genprodukts für die Funktionsfähigkeit des Gesamtorganismus, da ein kompletter Verlust der Genfunktion (*Loss of Function*) in keinem der Individuen beobachtet werden konnte und somit wahrscheinlich eine fehlende Überlebensfähigkeit bedingt. Die in der Indexpatientin identifizierte Variante *GNB1* p.D118G ist nicht unter den beobachteten 29 *Missense*-Varianten, d.h. sie wurde in keinem der 60.706 Individuen des *ExAC*-Browsers detektiert.

Im Gegensatz dazu, wurden im Gen *PTPN13* 780 verschiedenen *Missense*-Varianten beobachtet (Tab. 26) und damit mehr als erwartet wurden. Darüber hinaus konnten 30 *Loss of Function*-Varianten identifiziert werden. Dies spricht in der Zusammenschau dafür, dass eine ganze Reihe von Mutationen im Gen *PTPN13* ohne schwerwiegende Konsequenzen toleriert werden und dass das Gen *PTPN13* im Vergleich zu *GNB1* deutlich weniger konserviert und veränderlicher ist. Die *PTPN13*-Variante p.S443N wird im *ExAC*-Browser mit einer Populationsfrequenz von 0,00102 und die Variante p.S1459P mit 0,00023 gelistet.

Die Scores der genutzten Prädiktionsprogramme sowie die Daten des *Exome Aggregation Consortiums* ließen somit die *GNB1*-Variante als krankheitsverursachende Mutation deutlich plausibler erscheinen als die *PTPN13*-Varianten. Zusammengenommen führte dies zur Festlegung auf

GNB1 als aussichtsreichstes Kandidatengen, welches in funktionellen Studien weiter untersucht werden sollte.

GNB1 codiert die β 1-Untereinheit eines Guanin-Nukleotid bindenden Proteins: G β 1. Diese interagiert mit den G-Protein-Untereinheiten α - und γ . G β 1 kommt in Zusammenhang mit Liganden-aktivierten Rezeptoren, sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) vor und reguliert verschiedene in der Signalkaskade nachgeschaltete Effektor-Enzyme und Ionenkanäle (Lambright et al. 1996; Ford et al. 1998).

3.2.1.4 Überprüfung von Kontrollprobanden und Screening weiterer Patienten auf *GNB1*-Varianten

Die Sanger-Sequenzierung von 184 gesunden deutschen Kontrollprobanden ergab, dass keine dieser Personen die *GNB1*-Variante p.D118G trägt.

Zur Identifizierung weiterer *GNB1*-Mutationsträger wurden die DNA-Proben von 40 serbischen Patienten mit RETT-ähnlichem Krankheitsbild sowie von 51 Patienten mit Epilepsie und Entwicklungsverzögerung aus dem Institut für Humangenetik der Universität zu Lübeck untersucht. Dafür wurden alle der neun codierenden Exons des Gens *GNB1* (Exons 2 – 10, Transkript: NM_001282539) gescreent.

Lediglich in einer der serbischen Proben konnte eine exonische Variante entdeckt werden. Es handelt sich um die synonyme Variante rs143709588 (c.495G>A, p.T165T). Das Prädiktionsprogramm *MutationTaster* sagt für diese Variante einen krankheitsverursachenden Effekt voraus. Der CADD-Score wird mit 13,48 angegeben und das Spleiß-Stellen-Prädiktionsprogramm *fruitfly* gibt keine wesentliche Änderung in der Stärke von möglichen Spleiß-Stellen an. Diese Variante findet sich im *ExAC*-Browser gelistet mit 97 heterozygoten Trägern bei 110678 abgelesenen Allelen (0 homozygote Träger, Allel-Frequenz \approx 0,0009).

3.2.1.5 *GNB1*-Expressionsanalyse

Um festzustellen, ob das *GNB1*-Genprodukt in neuronalen Geweben exprimiert wird und somit potenziell zu den in der Patientin beobachteten neurologischen Krankheitsmanifestationen führen kann, wurde eine Expressionsanalyse auf mRNA-Level in verschiedenen Zelltypen durchgeführt. Untersucht wurde die Expression von Wildtyp-*GNB1* in induzierten pluripotenten Stammzellen (iPSC), kortikalen, striatalen und dopaminergen Neuronen sowie Blutzellen und Fibroblasten im Vergleich. Wie in Abbildung 22 (A) zu sehen, zeigte sich eine hohe Expression von *GNB1* in allen untersuchten Zelltypen. Als Referenz wurde außerdem die Expression von β -*Actin* untersucht, welches als Bestandteil des Zytoskeletts in allen Zelltypen vorkommt. Im Vergleich zu *GNB1* zeigte sich bei der

Expressionsanalyse von β -Actin eine deutlich schwächere (aber ebenfalls in allen Zelltypen nahezu gleich ausgeprägte) Bande (Abb. 22 B).

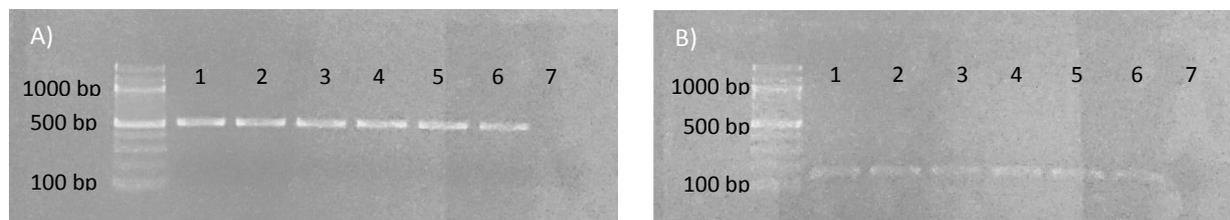


Abbildung 22: Expressionsanalyse von *GNB1* (A) und β -Actin (B) auf mRNA-Level in verschiedenen Zelltypen.

1: kortikale Neurone, 2: striatale Neurone, 3: dopaminerge Neurone, 4: induzierte pluripotene Stammzellen (iPSC), 5: Fibroblasten, 6: Blut, 7: Leerwert (Wasser).

3.2.1.6 *GNB1*-Immunfärbung in SH-SY5Y-Zellen und Fibroblasten

Mithilfe einer Immunfärbung sollte untersucht werden, ob sich die *GNB1* p.D118G (c.353A>G)-Variante auf die Lokalisation des Genprodukts innerhalb einer Zelle auswirkt. Hierfür wurden SH-SY5Y-Zellen einerseits transient mit einem *GNB1*-Wildtyp (WT)-Plasmid und andererseits mit einem *GNB1*-c.353A>G-Plasmid transfiziert. Es erfolgte die Auswahl von SH-SY5Y-Zellen, da diese einen neuronalen Zelltyp repräsentieren und somit geeignet erschienen, um die in der Indexpatientin beobachteten neurologischen Auffälligkeiten näher zu erforschen. Parallel erfolgte die Untersuchung von Fibroblasten, da diese größer sind und damit potenzielle Unterschiede in der Lokalisation des *GNB1*-Genprodukts G β 1 (G-Protein-Untereinheit β 1) deutlicher sichtbar sein sollten.

Es konnte gezeigt werden, dass G β 1 im gesamten Zytoplasma der Fibroblasten exprimiert wurde und nicht im Zellkern zu finden war. Eine verstärkte Expression war in einem dem Zellkern benachbarten unscharf begrenzten Areal des Zytoplasmas auffällig. Deutliche Unterschiede der Lokalisation von G β 1 innerhalb der untersuchten Fibroblasten zwischen Wildtyp und c.353A>G-Variante waren nicht ersichtlich (Abb. 23 A-F).

Bei den untersuchten SH-SY5Y-Zellen war ebenfalls eine Expression von G β 1 im gesamten Zytoplasma sowie in den abgehenden Dendriten, nicht aber im Zellkern erkennbar. Im Gegensatz zu den Fibroblasten war hier keine verstärkte Expression in einem bestimmten Areal erkennbar, die G β 1-Expression erschien im gesamten Zytoplasma relativ einheitlich. Auch hier waren keine eindeutigen Unterschiede zwischen mit *GNB1*-WT-Plasmid einerseits und *GNB1*-c.353A>G-Plasmid transfizierten SH-SY5Y-Zellen andererseits erkennbar (Abb. 23 G-L).

Sowohl für viele der betrachteten Fibroblasten als auch für die SH-SY5Y-Zellen ist kritisch anzumerken, dass deren äußere Erscheinung (unscharfe äußere Begrenzung, Zellkernkonfiguration) nicht dem erwarteten Aussehen normaler gesunder Zellen entsprach. Dies galt sowohl für die mit WT-Plasmid transfizierten als auch für die mit *GNB1*-c.353A>G-Plasmid transfizierten Zellen. Die

Ergebnisse sind also mit Vorsicht zu interpretieren. Der Versuch hätte einer Wiederholung bedurft. Auf diese wurde aber aus zeitlichen und finanziellen Gründen sowie in Anbetracht der nahezu gleichzeitig ausgeführten funktionellen Untersuchungen (BiFC- und BRET-Assay) verzichtet.

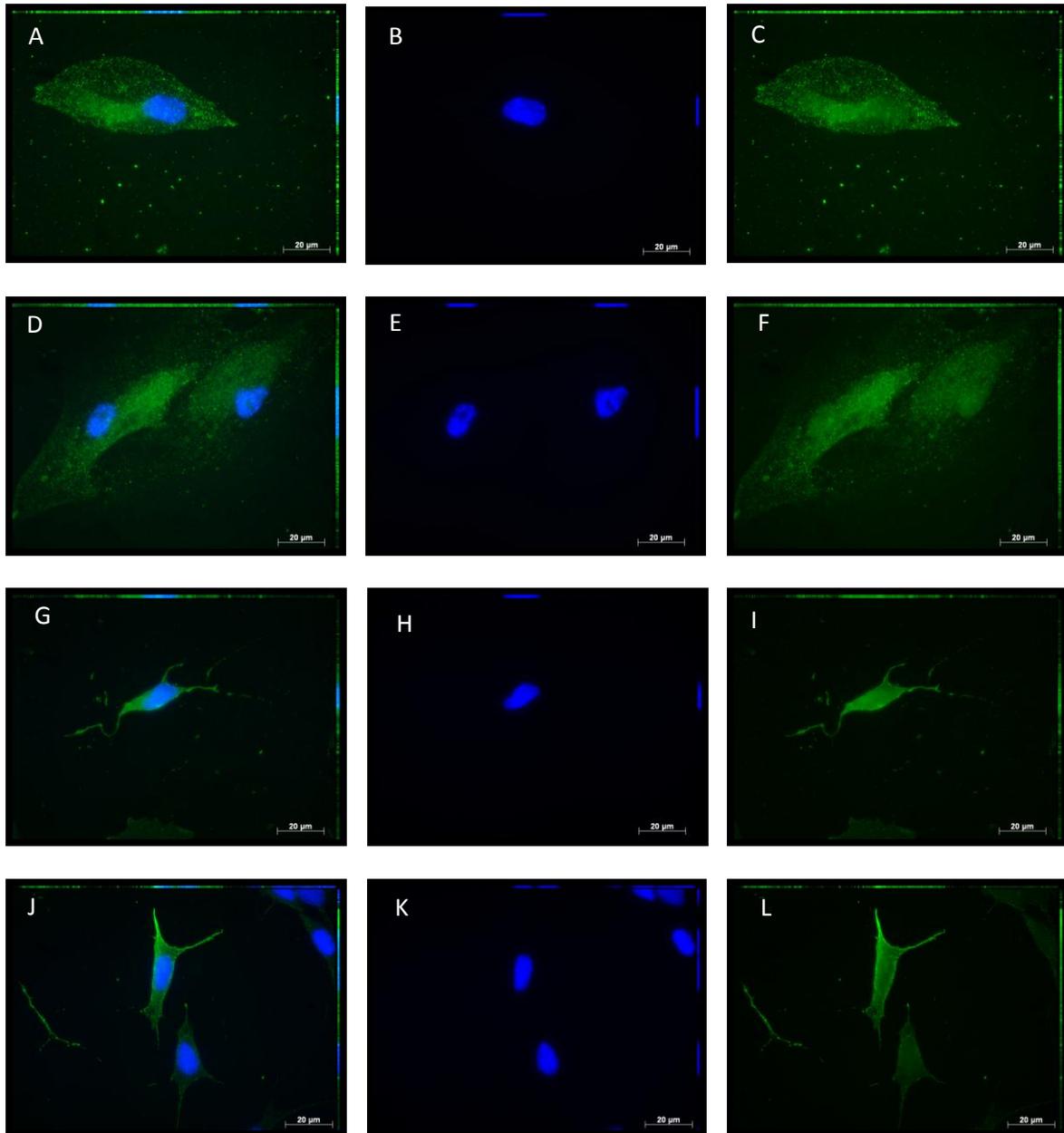


Abbildung 23: *Gβ1*-Expression in transient mit *GNB1*-WT-Plasmid bzw. mit *GNB1*-c.353A>G-Plasmid transfizierten Fibroblasten bzw. SH-SY5Y-Zellen.

Die erste Zeile (A-C) zeigt die *Gβ1*-WT-Expression in Fibroblasten, die zweite Zeile (D-F) die Expression von *Gβ1*-c.353A>G in Fibroblasten. In der dritten Zeile (G-I) ist die *Gβ1*-WT-Expression in SH-SY5Y-Zellen und in Zeile vier (J-L) die Expression von *Gβ1*-c.353A>G in SH-SY5Y-Zellen zu sehen. In der ersten Spalte (A,D,G,J) sind die Zellkernfärbung (DAPI) in blau und die *Gβ1*-Färbung (Alexa Fluor 488) in grün sichtbar. Die zweite Spalte (B, E, H, K) zeigt nur die Zellkernfärbung, während in der dritten Spalte (C, F, I, L) nur die *Gβ1*-Färbung zu sehen ist.

Eine erneute Literaturrecherche zeigte dann, dass zwischenzeitlich ein Paper von Petrovski und Mitarbeitern veröffentlicht wurde, welches 13 weitere Individuen mit *de novo* Missense-Mutationen

im Gen *GNB1* beschreibt. Die betroffenen Individuen präsentierten sich mit einer Entwicklungsverzögerung sowie neurologischen Auffälligkeiten wie Hypotonie, Epilepsie und Dystonie (Petrovski et al. 2016). Angesichts der Ähnlichkeit der beschriebenen klinischen Symptome zu dem in unserer Patientin beobachteten Krankheitsbild lag nun eine externe Validierung von *GNB1* als Krankheitsgen bei Patienten mit Entwicklungsverzögerung und weiteren neurologischen Auffälligkeiten vor, sodass wir die Beschreibung der klinischen Charakteristiken unserer Patientin als *Case Report* in „Neurology. Genetics“ publizieren konnten (Steinrücke et al. 2016).

3.2.1.7 Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation und Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer-Assay mit Gβ1-Mutanten

Für die *GNB1* p.D118G-Variante sowie die im Rahmen einer Kooperation mit der Diagnostikfirma Centogene AG (Rostock) bekanntgewordenen 9 weiteren *GNB1 Missense*-Mutationen wurden funktionelle Untersuchungen durchgeführt. Dabei wurde die mögliche Pathogenität der Mutationen bezüglich der Gβ1-Interaktion mit Bindungspartnern (γ 7-Untereinheit, $G\alpha_{olf}$ -Untereinheit und dem Effektor G-Protein-gekoppelte Rezeptor Kinase (GRK)) untersucht. Daneben wurden die Konsequenzen der Mutationen im Kontext der Signaltransduktion über den Dopamin Typ 1-Rezeptor (D1R) betrachtet. Die dazu notwendigen Assays Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation (BiFC) und Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer (BRET) wurden im *Department of Neuroscience, The Scripps Research Institute in Florida* von Ikuo Masuho und Kollegen ausgeführt. Der Versuchsaufbau ist im Kapitel „2.3.5 *GNB1*-Mutagenese, Bimolekulare Fluoreszenzkomplementation und Biolumineszenz-Resonanzenergietransfer-Assay“ auf S.49 im Methodenteil beschrieben und illustriert. Die Mutagenese der dafür eingesetzten Gβ1-Venus-Plasmide wurde im Rahmen meiner Promotionsarbeit ausgeführt.

Zunächst wurde die Bildung des Gβ1 γ 7-Dimers mittels eines BiFC-Assays untersucht. Die Zusammenlagerung der β - und γ - Untereinheit führt dazu, dass die jeweils an die β - und die γ - Untereinheit fusionierten Fragmente des Venus-Proteins miteinander interagieren können und ein fluoreszierendes Venus-Signal erzeugen. Die gemessene Venus-Intensität war für die beiden Mutationen p.G64V und p.A106T im Vergleich zum Wildtyp deutlich verringert, was für eine Beeinträchtigung der Gβ1 γ 7-Dimer-Bildung spricht.

Neben den beiden Mutanten p.G64V und p.A106T zeigten in geringerem Ausmaß auch die Mutanten p.P94S und p.R96L ein verringertes basales BRET-Signal. Dies weist darauf hin, dass die beiden letztgenannten Aminosäuren-Austausche zu einer gesteigerten Interaktion von Gβ1 γ 7 mit $G\alpha_{olf}$ führen. Die Mutante p.A92T hingegen weist ein hohes basales BRET-Signal auf, was auf Defizite in der Wechselwirkung mit $G\alpha_{olf}$ hindeutet. Die Bindungsfähigkeit an den Effektor GRK bleibt für die p.A92T-

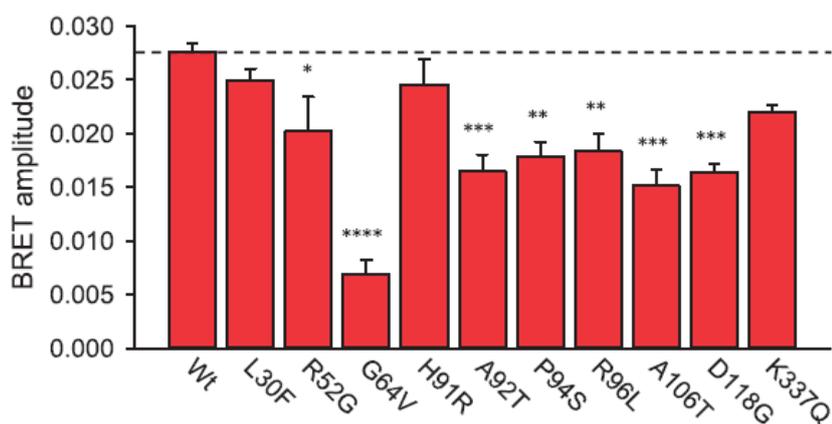
Mutante erhalten. Es ergibt sich ein hohes BRET-Signal da ein Energietransfer zwischen dem an G β -gekoppelten Venus-Protein und der an GRK gekoppelten Luciferase Nluc weiterhin möglich ist.

Weiterhin wurde die Signaltransduktion über den D1-Rezeptor nach Stimulation mit 100 μ M Dopamin betrachtet. Hier zeigten sich zusätzlich zu den bereits zuvor genannten Mutationen auch signifikante Veränderungen bei den Mutanten p.D118G und p.R52G (s. Abb. 24). Dies weist auf Beeinträchtigungen in der Agonist-induzierten G-Protein-Aktivierung hin. Somit konnte auch für die im Rahmen meiner Doktorarbeit entdeckte *GNB1*-Variante p.D118G eine Funktionsbeeinträchtigung auf zellulärer Ebene nachgewiesen werden. Ferner wurde dadurch ein konkreter Pathomechanismus aufgezeigt, der zur phänotypischen Krankheitsmanifestation beitragen könnte.

Für die Varianten p.L30F, p.H91R und p.K337Q konnte in den durchgeführten Untersuchungen kein vom Wildtyp abweichendes Verhalten gezeigt werden.

Abbildung 24: BRET-Amplitude nach Agonist-induzierter G-Protein-Aktivierung über den Dopamin 1-Rezeptor (aus Lohmann et al. 2017, Abb. 2 I). Es ergab sich ein erniedrigtes BRET-Signal für die Mutanten p.R52G, p.G64V, p.A92T, p.P94S, p.P96L, p.A106T und p.D118G.

[Statistische Auswertung: Einfaktorielle Varianzanalyse (ANOVA) gefolgt von Dunnett's post hoc Test, ausgeführt mit GraphPad Prism Ver. 6 (*P < 0.05; **P < 0.01; ***P < 0.001, ****P < 0.0001).]



3.2.2 Ergebnisse der Erforschung der genetischen Krankheitsursache bei einem jungen Patienten mit isolierter generalisierter Dystonie

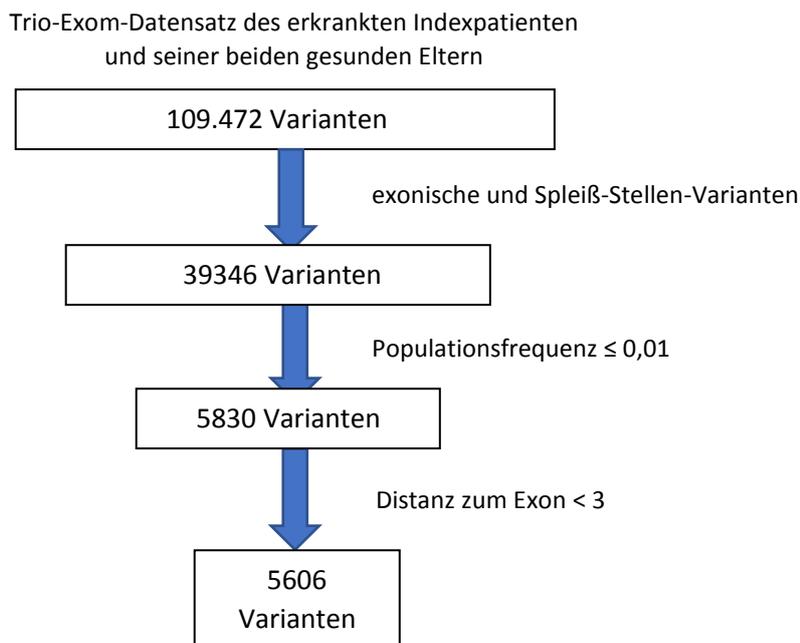
Die Suche nach der krankheitsursächlichen Mutation bei einem jungen Patienten mit isolierter generalisierter Dystonie führte zur Identifikation von *TBC1D9B* als vielversprechendem Kandidatengen. In den folgenden Abschnitten sind die einzelnen Untersuchungen und eine nähere Charakterisierung der Kandidatenvariante anhand von *in silico*-Prädiktionsprogrammen und Populationsdaten dargestellt.

3.2.2.1 Filterung des Trio-Exom-Datensatzes von Familie 2

Der Trio-Exom-Datensatz des in diesem Projekt untersuchten Indexpatienten und seiner Eltern beinhaltet zu Beginn 109.472 Varianten. Zunächst wurde nach exonischen und Spleiß-Stellen betreffenden Varianten mit einer Populationsfrequenz von $\leq 0,01$ gefiltert. Diese Kriterien erfüllten 5606 Varianten (s. Abb. 25).

Abbildung 25: Filterschritte zur Identifizierung von Kandidatengenen innerhalb des Trio-Exom-Datensatzes von Familie 2.

Es wurde nach seltenen Varianten gefiltert (Populationsfrequenz $\leq 0,01$), die sich innerhalb von Exons oder im Bereich von Spleiß-Stellen befinden.



Ausgehend von den 5606 Varianten wurden weitere Filterschritte ausgeführt. Ebenso wie beim Trio-Exom-Ansatz der Familie 1 wurden *de novo* heterozygote, compound heterozygote und homozygote Varianten betrachtet sowie in diesem Fall zusätzlich X-chromosomal rezessive Varianten. Die einzelnen ausgeführten Filterschritte sind mit denen bei Familie 1 vergleichbar, wenn auch in einer anderen Reihenfolge (s. Tab. 27).

De novo heterozygot:

Unter den 5606 vorgefilterten Varianten waren 895 *de novo* heterozygote. Nach Anwendung verschiedener Qualitätsfilter und Ausschluss von Varianten, die in homozygoter Form oder mehr als dreimal in heterozygoter Form in der In-Haus-Statistik gefunden wurden, verringerte sich die Anzahl der interessierenden Varianten auf 26. Durch Aussortieren von Genen, in denen mehrere Varianten gelistet waren, verblieben noch 15 Kandidatengene. Dies waren: *LOR*, *FH*, *SKIDA1*, *SALL1*, *KRTAP4-5*, *FMNL1*, *TMEM37*, *TPTE*, *NEFH*, *FGF12*, *HTT*, *DIAPH1*, *TBC1D9B*, *TCP10L2*, *OR52D1*.

Tabelle 27: Filterkaskade zur weiteren Reduktion der Anzahl der Kandidatengene.

Filterkriterien	Homozygot	De novo heterozygot	Compound heterozygot	X-chromosomal
Passender Erbgang (bei compound heterozygot: alle Varianten, die heterozygot im Index und heterozygot in einem der Elternteile sind)	18	895	886	7
Ablesehäufigkeit ≥ 20	12	382	798	6
Allelfrequenz ($25 \leq x \leq 75$ für heterozygote und ≥ 75 für homozygote Varianten)	12	182	617	6
Qualitätsindex ≥ 100	12	173	600	6
≤ 3 -mal gefunden in 1414 in-Haus-Exomen	1	26	253	6
Nur 1 Variante pro Gen (<i>de novo</i>) oder wirklich compound heterozygot	1	15	6 (3 Gene)	6

Eine Vorfilterung (s.Abb. 25) hatte bereits eine Reduktion auf 5606 Varianten ergeben. Im Fall des X-chromosomalen Erbgangs wurde beim Vererbungsmodus nach X-chromosomalen Varianten mit den Angaben „Hom“ beim Indexpatienten, „Het“ bei der Mutter und nicht vorhanden beim Vater gefiltert. Da der Indexpatient als männliches Individuum nur ein X-Chromosom besitzt, müssten entsprechende Varianten richtigerweise als „hemizygot“ bezeichnet werden, eine derartige Bezeichnung gibt es im verwendeten Datensatz jedoch nicht. Hom: homozygot, Het: heterozygot.

Compound heterozygot:

Es konnten 886 Varianten entdeckt werden, die im Index und einem Elternteil in heterozygoter Form vorkommen. 253 Varianten erfüllten die gesetzten Filterkriterien zur Ablesehäufigkeit, Allelfrequenz, Qualität und In-Haus-Statistik. Nur 6 Varianten waren wirklich compound heterozygot, d.h. der Indexpatient wies in einem Gen genau 2 Varianten auf, wovon eine von der Mutter und die andere vom Vater vererbt wurden. Die übriggebliebenen 6 Varianten betrafen also 3 Gene und zwar: *KRT17*, *FBN2* und *MAST1*. Da es sich bei beiden Varianten in *MAST1* um synonyme Varianten handelte, wurde dieses Gen von weiteren Betrachtungen ausgeschlossen.

homozygot:

Von den anfänglich 18 neu homozygoten Varianten im Indexpatienten verblieben nach der Qualitätsfilterung noch 12 Kandidaten. Von diesen erfüllte nur eine Variante im Gen *XRRA1* das Kriterium, dass sie in der In-Haus-Statistik höchstens dreimal in homozygoter und maximal sechsmal in heterozygoter Form aufgeführt sein sollte.

X-chromosomal:

Nur 7 Varianten erfüllten die Kriterien eines X-chromosomal-rezessiven Erbgangs. Von den 6 am Ende der Filterkaskade verbliebenen Varianten wurde eine weitere ausgeschlossen, da es sich um

einen synonymen Aminosäureaustausch handelte. Die weiteren fünf Gene waren: *DCAF8L2*, *DMD*, *TBC1D25*, *GATA1* und *ACTRT1*.

Analog zum Vorgehen bei Familie 1 wurde für die herausgefilterten Kandidatengene nach verfügbaren Daten zur Genfunktion, Expression und assoziierten Krankheitsbildern recherchiert. Daneben wurden in dem Exom-Datensatz enthaltene Angaben verschiedener *in silico*-Prädiktionsprogramme berücksichtigt. Außerdem wurde mithilfe des *UCSC Genome Browsers* die Veränderlichkeit, der die Varianten umgebenden Sequenzen betrachtet. Und zwar wurde nach weiteren Substitutionen, Deletionen oder Insertionen mit ihrerseits hoher Populationsfrequenz geschaut. Die gewonnenen Informationen führten zur Eingrenzung auf die Gene *FGF12* und *TBC1D9B* (beide *de novo* heterozygot) als vorrangig interessant erscheinende Kandidaten.

Tabelle 28 zeigt Angaben des *Exome Aggregation Consortiums* zur Häufigkeit von erwarteten und tatsächlich beobachteten Varianten in den beiden Genen *TBC1D9B* und *FGF12*, während in Tabelle 29 die *Scores* verschiedener Prädiktionsprogramme zu den konkret im Exom-Datensatz detektierten Varianten dargestellt sind. Die *ExAC*-Daten deuten mit einem *Z-Score* für *Missense*-Varianten von 2,71 bei *FGF12* gegenüber von 0,42 bei *TBC1D9B* eher auf eine erhöhte Suszeptibilität gegenüber genetischen Veränderungen im Fall des Gens *FGF12* hin. Die Prädiktionen der Programme SIFT, PolyPhen-2 und *MutationTaster* sind für die im Exom-Datensatz in den beiden Genen detektierten Varianten gleich. Lediglich der *CADD-Score* ist für die *TBC1D9B*-Variante um einiges höher (15,63 gegenüber 8,614). In der Gesamtschau konnte zunächst basierend auf diesen *in silico*-Daten keine der beiden Kandidaten-Varianten als wahrscheinlicher krankheitsursächlich priorisiert werden.

Tabelle 28: Angaben des *Exome Aggregation Consortiums* zur Häufigkeit von Varianten im Gen *TBC1D9B* und *FGF12* (letzter Zugriff: 22.06.2019).

	<i>TBC1D9B</i>			<i>FGF12</i>		
	erwartete Varianten	beobachtete Varianten	Constraint Metric	erwartete Varianten	beobachtete Varianten	Constraint Metric
Synonyme Varianten	234,6	246	Z = -0,46	42,3	35	Z = 0,70
<i>Missense</i> -Varianten	471,7	453	Z = 0,42	102,0	46	Z = 2,71
<i>Loss of Function</i>	38,6	18	pLI = 0,00	9,1	3	pLI = 0,11

Tabelle 29: Scores diverser *in silico*-Prädiktionsprogramme für die Varianten *FGF12* p.V140F und *TBC1D9B* p.M477K. Die Positionsangaben beruhen auf folgenden Transkripten: *FGF12*: NM_021032.4; *TBC1D9B*: NM_198868.2.

	<i>TBC1D9B</i> (p.M477K)	<i>FGF12</i> (p.V140F)
SIFT	Toleriert	Toleriert
Poly-Phen2	Benigne	Benigne
MutationTaster	krankheitsverursachend	krankheitsverursachend
CADD-Score	15,63	8,614

3.2.2.2 Sanger-Sequenzierung der Kandidatenvarianten

Das Vorhandensein der Varianten *FGF12* c.418G>T, p.V140F und *TBC1D9B* c.1430T>A, p.M477K im erkrankten Indexpatienten und seinen gesunden Eltern wurde mittels Sanger-Sequenzierung nachgeprüft. Nur die *TBC1D9B*-Variante konnte als *de novo*-Variante bestätigt werden. Die *FGF12*-Variante konnte weder im Indexpatienten noch in seinen Eltern detektiert werden.

3.2.2.3 Überprüfung von Kontrollprobanden und Screening weiterer Patienten auf *TBC1D9B*-Varianten

Die Überprüfung von 180 gesunden deutschen Kontroll-Probanden per Sanger-Sequenzierung ergab, dass keine dieser Personen die *TBC1D9B*-Variante c.1430T>A, p.M477K trägt.

Weiterhin wurden die DNA-Proben von 160 Patienten, die an generalisierter Dystonie leiden, auf Mutationen im Exon 9 des Gens *TBC1D9B* gescreent. In diesem Exon befindet sich auch die in dem Indexpatienten gefundene Mutation c.1430T>A. Es konnten keine Varianten in den untersuchten Patienten festgestellt werden.

Zusammenfassend handelt es sich bei *TBC1D9B* um ein potenzielles Kandidatengen in der Verursachung einer generalisierten Dystonie. Aufgrund fehlender externer Bestätigung durch die Beschreibung eines zweiten Krankheitsfalles mit der gleichen genetischen Variante oder zumindest einer Mutation im gleichen Gen, ließ sich *TBC1D9B* bisher jedoch nicht als Krankheitsgen bestätigen.

4 Diskussion

Im Diskussionsteil meiner Dissertation fasse ich die wichtigsten der im vorherigen Abschnitt erläuterten Ergebnisse zusammen, ordne sie in den Kontext verfügbarer Literatur ein und ziehe Schlussfolgerungen zur Relevanz und Aussagekraft der gewonnenen Ergebnisse.

4.1 *MAP2K2*, *MBTPS1*, *PRKCQ* und *SNAP91* als mögliche Kandidatengene in der Pathogenese von Alkohol-responsiven Dystonien

In der Literatur sind zurzeit zwei Gene bekannt, in denen Mutationen zur Erkrankung an einer Alkohol-responsiven Dystonie führen, nämlich *SGCE* und *TUBB4A* (Parker 1985; Zimprich et al. 2001; Doheny et al. 2002; Lohmann et al. 2013). Durch diese beiden Gene lassen sich aber längst nicht alle Erkrankungsfälle erklären. Ziel dieses Forschungsprojektes war es, neue Gene zu identifizieren, die eine Rolle in der Genese der Alkohol-responsiven Dystonie spielen könnten. Ausgehend von den Exom-Daten von neun erkrankten Individuen sollten Gene herausgefiltert werden, in denen möglichst viele der Betroffenen Varianten aufweisen. Zunächst wurde überprüft, ob sich die Erkrankung in einigen der Individuen durch Mutationen in *SGCE* oder *TUBB4A* erklären ließe. In den Exom-Daten des Patienten Dys1233 konnte die *SGCE*-Variante c.551T>C, p.L184P und in dem Patienten Dys572 die Variante c.799T>A, p.Y267N entdeckt werden. Nach den Interpretationskriterien des „American College of Medical Genetics and Genomics“ ist die Variante p.L184P am ehesten als „wahrscheinlich pathogen“ und die Variante p.Y267N als „Variante unklarer Signifikanz“ einzustufen. In die nachfolgenden Filterschritte wurden daher, einem strikten Ansatz folgend, zunächst nur die verbleibenden sieben Individuen eingeschlossen. In einer zweiten Filterung wurde zusätzlich Dys572 berücksichtigt, unter der Annahme, dass die entdeckte Variante p.Y267N auch benigne sein und die Krankheitsursache bei diesem Patienten damit in einer anderen Mutation liegen könnte.

Die Anwendung der gewählten Filterkriterien lieferte im ersten Fall 5 und im zweiten Fall zusätzlich 8 weitere Kandidatengene. Nach einer Literaturrecherche und Betrachtung der Scores von *in silico*-Prädiktionsprogrammen wurden *MAP2K2*, *MBTPS1*, *PRKCQ* und *SNAP91* als vorrangig interessante Kandidatengene definiert. Es waren jeweils nur zwei der Patienten von Varianten im gleichen Gen betroffen. Dabei handelte es sich in allen Fällen um zwei unterschiedliche Varianten in verschiedenen Exons.

Beim Screening der Gene *MBTPS1* (Exon 9 und 13), *PRKCQ* (Exon 13 und 17), *SNAP91* (Exon 11 und 29) und *MAP2K2* (Exon 3 und 7) in 309 weiteren an Alkohol-responsiver Dystonie erkrankten Individuen konnten keine weiteren exonischen Protein-verändernden Varianten identifiziert werden.

Im Falle der Gene *MBTPS1* und *MAP2K2* ließ sich jeweils eine intronische Variante in direkter Nähe zu einem Exon finden. Für diese wurden von dem Prädiktionsprogramm *fruitfly* die mögliche Veränderung der Stärke einer Spleiß-Stelle bzw. die Entstehung einer neuen Akzeptor Spleiß-Stelle vorhergesagt. Ob es durch diese Varianten tatsächlich zu einem veränderten Spleißen kommt, ließ sich im Rahmen meiner Doktorarbeit allerdings nicht überprüfen, da von den entsprechenden Patienten keine RNA-Proben verfügbar waren.

In der Literatur sind einige Gene bekannt, deren Expression durch Alkoholkonsum beeinflusst wird (Lewohl et al. 2000; Liu et al. 2004; Pignataro et al. 2009). Diese weisen zum Teil innerhalb der codierenden Sequenz bzw. des Promotor-Bereiches ein sogenanntes „Alkohol-responsives Element“ (ARE) auf. Das ARE besteht aus dem Motiv „tCTGcGTcTc“. Großbuchstaben stehen dabei für stark konservierte Basen, während Kleinbuchstaben auf veränderliche Positionen hinweisen. Das beschriebene ARE stellt eine potenzielle Bindungsstelle für den Transkriptionsfaktor HSF-1 (Hitze-Schock-Faktor 1) dar (Pignataro et al. 2009). Die Kandidatengene *MAP2K2*, *MBTPS1*, *PRKCQ* und *SNAP91* wurden auf das Vorhandensein des AREs innerhalb der cDNA bzw. des Sequenzbereichs 5000 bp vor Translationsstart und nach Translationssende überprüft. Überlegungen zur Festlegung des untersuchten Bereiches beinhalteten, dass die minimale Promotor-Region, die für ein basales Transkriptionslevel notwendig ist, etwa 250 bp umfasst, die den Bereich des Transkriptionsstarts umspannen (Pignataro et al. 2009). Kwon und Mitarbeiter untersuchten Alkohol-responsive Gene in dem Nematoden *Caenorhabditis elegans* und fanden das ARE in einigen der untersuchten Gene, jeweils in einem Bereich von maximal 500 Nukleotiden stromaufwärts des Translationsstarts (Kwon et al. 2004). Regulatorische Elemente wie *Enhancer* können sich jedoch in einem viel weiter gefassten DNA-Bereich befinden, bis zu Millionen von Basenpaaren von ihren Zielgenen entfernt. Wobei die Zielgene meist nicht die direkt benachbarten Gene darstellen (Andersson et al. 2014; Barr und Misener 2016). Die höchste Wahrscheinlichkeit für Interaktionen mit dem Promotor besteht in dem Bereich von 600 kb vor oder hinter dem Transkriptionsstartpunkt (Mishra und Hawkins 2017). Der von mir untersuchte Bereich von 5000 bp ist somit ein Kompromiss, der in jedem Fall die minimal notwendige Promotor-Region abdeckt sowie weitere benachbarte DNA-Sequenz umfasst, welche regulatorische Elemente und Transkriptionsfaktor-Bindungsstellen beinhalten könnte. Bei einem noch weiter gefassten Bereich wäre es - ausgehend von diesen *in silico*-Betrachtungen allein als Basis - sehr hypothetisch von einem Auftreten des ARE auf eine Wechselwirkung mit dem interessierenden Gen zu schließen.

In keinem der untersuchten Kandidatengene findet sich die Sequenz des ARE im betrachteten Sequenz-Bereich ohne Fehlpaarung wieder. Dies trifft allerdings auch für die Gene *SGCE* und *TUBB4A* zu. In den vor und hinter der cDNA gelegenen Bereichen der Gene *PRKCQ* und *MBTPS1* sowie *TUBB4A* und *SGCE* konnten zumindest Sequenzen gefunden werden, die nur in als veränderlich

beschriebenen Positionen vom Motiv des ARE abweichen. Im Falle von *MAP2K2* und *SNAP91* weichen die angetroffenen Sequenzen in mindestens 2 Positionen vom ARE ab, davon betrifft jeweils mindestens eine Abweichung eine konservierte Base. Ob die in der Nähe der Gene *PRKCQ* und *MBTPS1*, aber auch *SGCE* und *TUBB4A* entdeckten Basenabfolgen aber nun tatsächlich als Alkohol-responsive Elemente fungieren und die Transkription der entsprechenden Gene beeinflussen können, bleibt fragwürdig. Um dies zu überprüfen, könnte es daher sinnvoll sein, in funktionellen Studien zu untersuchen, ob sich die Transkriptionslevel der Gene nach Alkoholexposition ändern. Es bleibt zu bedenken, dass sich regulatorische Elemente noch viel weiter von ihren Zielgenen entfernt befinden können, als im Rahmen dieser Doktorarbeit untersucht wurde. So bleibt die Möglichkeit bestehen, dass sowohl die Kandidatengene als auch *SGCE* und *TUBB4A* unter dem Einfluss eines regulatorischen Elements stehen könnten, das genau dem ARE entspricht.

Letztendlich ist in vielen Bereichen, gerade auch auf neuronaler Ebene, noch nicht abschließend geklärt, wie genau eine Veränderung der zellulären Prozesse durch die Einwirkung von Alkohol von statten geht (Abraham et al. 2017). Es ist zum Beispiel auch denkbar, dass der Alkoholkonsum sich nicht direkt auf die Expression der Gene auswirkt, sondern dass die Genprodukte und Alkohol an gleichen Reaktionswegen angreifen und dabei schädigende Folgen der Mutation durch gegenteilige Effekte des Alkohols ausgeglichen werden können. Diese indirekten Effekte könnten insbesondere auf Ebene der Neurotransmitter-Freisetzung und der neuronalen Erregbarkeit stattfinden. Schließlich nimmt Alkohol im Gehirn Einfluss auf verschiedene Rezeptoren (u.a. GABA_A-, Glycin- und NMDA-Rezeptoren) und darüber auf die synaptische Transmission und Plastizität (Abraham et al. 2017). Zur näheren Illustrierung sei auf die Krankheitsentität des Essenziellen Tremors hingewiesen – eine relativ häufige Bewegungsstörung, die sich ebenfalls oft durch Alkoholkonsum bessert. Auch hier ist die genaue Pathophysiologie noch nicht verstanden, jedoch wird eine Rolle von GABA-Rezeptoren in der Pathogenese angenommen. Neben Ethanol scheinen weitere GABA_A-Rezeptor-Agonisten positiven Einfluss auf die Symptomschwere zu haben. Darüber hinaus wurden positive Effekte weiterer Medikamente beschrieben, die an anderen Rezeptorsystemen angreifen u.a. Beta-Blocker (Ondo 2016; Schaefer et al. 2018). Diese Erkenntnisse deuten darauf hin, dass im Falle des Essenziellen Tremors der Alkoholkonsum indirekt die motorischen Symptome supprimiert (indem die neuronale Erregbarkeit herabgesetzt wird) und keinen direkten Einfluss auf die Expression spezifischer Gene hat.

Nachstehend erfolgt eine Vorstellung der untersuchten Kandidatengene und Erläuterungen, weshalb eine Assoziation von Varianten in diesen Genen mit der Entstehung einer Alkohol-responsiven Dystonie denkbar erscheint. Dabei sollte im Hinterkopf behalten werden, dass die experimentellen Untersuchungen und Computer-gestützten Analysen jedoch keine vollständig überzeugenden

Ergebnisse in Bezug auf eine ursächliche Rolle dieser Gene in der Pathogenese der Alkohol-responsiven Dystonie liefern konnten.

PRKCQ

PRKCQ codiert für die Protein Kinase C θ (theta). Die Familie der Protein Kinasen C (PKC) gehört zu den Serin-Threonin-Kinasen. Nach extrazellulärer Stimulation durch verschiedene Liganden wie Hormone, Neurotransmitter und Wachstumsfaktoren phosphorylieren sie andere Proteine und tragen somit zur Signaltransduktion bei (Azzi et al. 1992). Dadurch sind die PKCs an verschiedensten Prozessen wie Zellwachstum, -differenzierung und -transformation beteiligt (Meller et al. 1998). Weiterhin wird ein regulierender Einfluss von PKCs auf die Neurotransmitter-Freisetzung angenommen (Zimmermann 1990; Shoji-Kasai et al. 2002). Die Familie der Protein Kinase C lässt sich anhand von enzymatischen Eigenschaften und Sequenz-Vergleichen in drei Unterfamilien unterteilen. Die Protein Kinasen C δ , ϵ , θ und η gehören zur Gruppe der nPKCs (novel PKCs) (Mellor und Parker 1998).

PKC θ wird in T-Lymphozyten, lymphatischen Geweben, bestimmten hämatopoetischen Zellen und Skelettmuskelzellen, v.a. im Bereich der neuromuskulären Synapsen exprimiert (Meller et al. 1998). Ebenso wurde ein Vorkommen in Bereichen des zentralen und peripheren Nervensystems beschrieben sowie während der Entwicklung des Kleinhirns (Wilda et al. 2001; Irani et al. 2010; Park-York et al. 2013). PKC θ ist am *Rearrangement* des Zytoskeletts in T-Lymphozyten, aber auch in Endothelzellen und während der Myogenese beteiligt (Michalczyk et al. 2013).

Für die zur gleichen Unterfamilie gehörenden Isoformen δ und ϵ wurden mögliche Alkohol-Bindungsstellen identifiziert (Howard et al. 2011). Nach Ethanol-Exposition zeigen sich außerdem erhöhte Aktivitätslevel von PKC δ und ϵ (Messing et al. 1991). Insbesondere PKC ϵ kommt eine modulierende Rolle im Rahmen des Neuritenwachstums und der neuronalen Plastizität zu (Hundle et al. 1995). Ferner ist diese Isoform in neuroprotektive Prozesse nach moderatem Alkoholkonsum involviert, welche auch die Wechselwirkung mit Hitze-Schock-Proteinen beinhalten (Collins et al. 2009; Collins et al. 2010). Durch Untersuchungen in der *Area tegmentalis ventralis* konnte für PKC θ selbst ein regulierender Einfluss auf die durch Alkoholkonsum gesteigerte Feuerungsrate dopaminergener Neurone gezeigt werden (Nimitvilai et al. 2013).

Basierend auf oben beschriebenen Forschungsergebnissen sprechen folgende Punkt dafür, dass *PRKCQ* tatsächlich mit der Pathogenese der Alkohol-responsiven Dystonie assoziiert sein könnte:

- 1) *PRKCQ* wird in neuronalen Geweben exprimiert.
- 2) Es wird angenommen, dass Protein Kinasen C regulierend auf die Neurotransmitter-Freisetzung einwirken.

- 3) Studien zeigten durch PKCs modulierte neuronale Veränderungen unter dem Einfluss von Alkohol.
- 4) PKC θ ist in das *Rearrangement* des Zytoskeletts involviert. Damit besteht ein Link zu den Genen *SGCE* und *TUBB4A*, die für zytoskelettale Proteine codieren.

MBTPS1

Das zweite Kandidatengen *MBTPS1* codiert für das Protein „Site 1-Protease“ (S1P), welches zu den Subtilisin-verwandten Serin-Proteasen gehört. S1P ist entscheidend an der Aktivierung einiger Transkriptionsfaktoren beteiligt, darunter fällt u.a. das „Sterol Regulatory Element Binding Protein“ SREBP (Sakai et al. 1998). SREBPs sind zunächst an die Membran des ER gebunden und müssen in einem zweischrittigen Prozess freigesetzt und aktiviert werden (Brown und Goldstein 1999). Bei niedrigem Sterol-Gehalt der Zelle wird SREBP von dem Protein SCAP (SREBP cleavage-activating protein) zum Golgi-Apparat eskortiert, wo nacheinander folgend Spaltungsreaktionen durch die Proteasen S1P und S2P (Site 2-Protease) katalysiert werden (DeBose-Boyd et al. 1999; Hampton 2000). Der auf diese Weise aktivierte Transkriptionsfaktor SREBP transloziert zum Zellkern und bindet dort an die Sterol-regulierenden Elemente (SREs) in den *Enhancern* verschiedener Gene, die v.a. Enzyme der Cholesterin-, Triglycerid- und Fettsäuren-Biosynthese sowie der Lipid-Aufnahme codieren. Damit spielen die SREBPs eine wichtige Rolle in der Lipid-Homöostase von Membranen, Zellen und dem Blut (Brown und Goldstein 1999).

Auch die von Gliazellen (Schwann-Zellen im peripheren Nervensystem und Oligodendrozyten im zentralen Nervensystem) gebildete Myelinscheide besteht zu einem hohen Anteil aus Lipiden und erlaubt durch ihre isolierende Funktion die schnelle, saltatorische Weiterleitung von Aktionspotenzialen. Die S1P-abhängig aktivierten SREBPs und durch sie regulierten Reaktionswege scheinen eine wichtige Rolle in der richtigen Oligodendrozyten-Differenzierung, Myelinisierung von Nervenfasern sowie der Entwicklung von Synapsen und synaptischer Plastizität zu spielen (Camargo et al. 2009; Monnerie et al. 2017). Interessanterweise konnte in Untersuchungen der Leber an einem Zebrafisch-Modell eine verstärkte Expression von SREBP-Zielgenen nach akuter Alkohol-Exposition gezeigt werden (Passeri et al. 2009; Howard et al. 2011).

Neben SREBPs werden ebenfalls die Transkriptionsfaktoren ATF6 und CREBH S1P-abhängig freigesetzt. CREBH führt im Rahmen einer akuten entzündlichen Reaktion zur Expression von Akute Phase Proteinen (Zhang et al. 2006), während aktives ATF6 eine Rolle in der Antwort auf ER-Stress spielt und zur verstärkten Bildung von im ER lokalisierten Chaperonen führt (Ye et al. 2000; Nadanaka et al. 2007). Bemerkenswert dazu ist, dass seltene *Missense*-Varianten in dem Transkriptionsfaktor ATF4 bei Patienten mit sporadischer zervikaler Dystonie entdeckt werden konnten. Außerdem ist

ATF4 am Signalweg der „Integrierten Stress Response“ (ISR) beteiligt, welcher eine Rolle in der Pathogenese der DYT1-Dystonie spielt (Rittiner et al. 2016).

Daneben ist S1P wichtig für die Markierung lysosomaler Enzyme mit Ziel-Signalen und somit für die störungsfreie Biogenese und Funktion von Lysosomen (Velho et al. 2017). Die Wichtigkeit von S1P für die Integrität des Gesamtorganismus zeigt sich unter anderem darin, dass homozygote *MBTPS1 knockout* Mäuse nicht lebensfähig sind und bereits in der Embryonalperiode versterben (Yang et al. 2001). In Menschen wurde kürzlich eine heterozygote *de novo Missense*-Mutation im *MBTPS1*-Gen in Assoziation mit einem komplexen Phänotyp nachgewiesen, welcher neuromuskuläre Symptome wie muskuläre Erschöpfung, Myalgien, episodische CK-Erhöhungen und eine *small fiber*-Neuropathie beinhaltet (Schweitzer et al. 2019).

Für *MBTPS1* als Kandidatengen in der Entstehung der Alkohol-responsiven Dystonie spricht:

- 1) Das codierte Protein S1P ist in Reaktionswege involviert, die für den Aufbau von Myelinscheiden und für die Differenzierung von Oligodendrozyten wichtig sind und hat somit eine Bedeutung für die störungsfreie Weiterleitung von neuronalen Signalen.
- 2) Nach Alkohol-Exposition kommt es zu einer veränderten Expression von SREBP-Zielgenen.
- 3) S1P ist entscheidend für die Freisetzung und Aktivierung verschiedener Transkriptionsfaktoren. Hier findet sich eine Verbindung zu Alkohol-responsiven Genen, die ein regulatorisches Bindeelement für einen Transkriptionsfaktor (HSF-1) aufweisen.
- 4) Kürzlich wurde eine humane *de novo Missense*-Mutation mit einem Krankheitsbild in Verbindung gebracht, das durch Symptome wie neuromuskuläre Schwäche und Neuropathie auf die Beeinträchtigung neuronaler Erregungsleitung hindeutet.

MAP2K2

MAP2K2 codiert für die „Mitogen aktivierte Protein Kinase Kinase 2“, welche auch mit dem Symbol MEK2 bezeichnet wird. Als Bestandteil der Raf-1 → MEK → MAP-Kinase-Kaskade ist es an der Signalweiterleitung verschiedener Rezeptoren der Zelloberfläche beteiligt. Zu den extrazellulären Signalen, die zur Aktivierung der MAP-Kinasen führen, gehören unterschiedliche Wachstumsfaktoren wie EGF (*epidermal growth factor*), NGF (*nerve growth factor*), FGF (*fibroblast growth factor*) und PDGF (*platelet-derived growth factor*), Zytokine und Hormone. Darüber werden Prozesse wie Wachstum, Differenzierung, Transkription und Metabolismus reguliert (Davis 1993; Zheng und Guan 1993; Tartaglia und Gelb 2010).

Es gibt drei verschiedene humane Isoformen von MEK: MEK1, MEK2 und MEK3, wobei in *in vitro*-Experimenten nur MEK1 und MEK2 die Eigenschaft aufwiesen, die MAP-Kinasen 1 und 2 aktivieren zu können. Hierfür ist die Phosphorylierung an je einem spezifischen Threonin- und Tyrosin-Rest notwendig (Zheng und Guan 1993). Direkte Substrate der MAP-Kinasen sind Zelloberflächen-Proteine

wie der EGF-Rezeptor, Phospholipase A2, zytoplasmatische Kinasen, Komponenten des Zytoskeletts sowie Transkriptionsfaktoren (Davis 1993; Guan 1994). Ebenso werden Mikrotubuli-assoziierte Proteine sowie Enzyme, die an fokalen Adhäsionen angreifen, phosphoryliert. Damit kommt den MAP-Kinasen eine Bedeutung im Rahmen der Zell-Migration und der dynamischen Mikrotubuli-Polymerisation zu (Hoshi et al. 1992; Huang et al. 2004).

Im Gehirn sind die MAP-Kinasen an Prozessen der synaptischen Plastizität, des Lernens und Gedächtnisses beteiligt (Thomas und Huganir 2004). Daneben sind Veränderungen im MEK → MAP-Kinase-Reaktionsweg sowohl nach akutem Alkohol-Konsum als auch bei neuroadaptiven Veränderungen im Rahmen einer Alkohol-Abhängigkeit beschrieben (Hansson et al. 2008; Agoglia et al. 2015).

Mutationen in den Genen *MAP2K1* und *MAP2K2* machen etwa 20 % der Fälle eines seltenen angeborenen Krankheitsbildes aus, das als Kardio-Fazio-Kutanes-Syndrom bezeichnet wird. Dieses ist gekennzeichnet durch mentale Retardierung, Entwicklungsverzögerung, faciale Dysmorphien, ektodermale Abnormalitäten und Herzfehler (Dentici et al. 2009; Tartaglia und Gelb 2010).

Kurz gesagt finden sich in der Literatur folgende Hinweise auf eine mögliche Verknüpfung von *MAP2K2* mit Alkohol-responsiven Dystonien:

- 1) Das codierte Protein MEK2 ist an der Signaltransduktion verschiedenster Liganden beteiligt, u.a. des Nerven-Wachstum-Faktors.
- 2) MEK2 ist Bestandteil einer Reaktions-Kaskade zu deren Ziel-Substraten Komponenten des Zytoskeletts sowie Mikrotubuli-assoziierte Proteine gehören. Dies lässt wiederum an die bereits bekannten Krankheits-assoziierten Gene *SGCE* und *TUBB4A* denken, deren Genprodukte am Aufbau des Zytoskeletts beteiligt sind.
- 3) Die MEK-MAP-Kinase-Kaskade ist an neuroadaptiven Veränderungen im Rahmen einer Alkohol-Abhängigkeit beteiligt.
- 4) Mutationen in diesem Gen sind bereits mit einem menschlichen Krankheitssyndrom assoziiert, worin mentale Retardierung und Entwicklungsverzögerung klar auf eine Beteiligung des zentralen Nervensystems hinweisen.

SNAP91

Das vierte Kandidatengen *SNAP91* codiert für das „Synaptosomal-associated protein, 91-KD“. Das codierte Protein wird auch als AP180 (Assembly Protein, 180 KD) bezeichnet. Im Gehirn wird das Protein spezifisch in neuronalen Zellen im Bereich von Synapsen exprimiert (Zhou et al. 1992).

Anhand von Mäusegehirnen konnten besonders hohe Expressionslevel der mRNA bzw. des Proteins am 4. bzw. 7. postnatalen Tag gezeigt werden - einer Zeitperiode, in der auch die aktive Synaptogenese und Synapsenreifung stattfinden (Sousa et al. 1992).

AP180 weist verschiedene Domänen auf, u.a. ein Motiv zur Bindung an Clathrin (Morris et al. 1993) und eine sogenannte ANTH (AP180 N-terminal homology)-Domäne (Kaempf und Maritzen 2017). Hierüber kann eine Bindung an das Lipid Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphonat erfolgen. Außerdem scheint hierüber eine Bindung an Tubulin und damit eine Komponente des zellulären Zytoskeletts möglich zu sein (Hussain et al. 2003). Eine entscheidende Bedeutung kommt der ANTH-Domäne in der Bindung an Synaptobrevin II zu (Koo et al. 2011). Dieses ist ein in der Membran synaptischer Vesikel lokalisiertes Protein, welches durch die Interaktion mit Syntaxin und SNAP-25 in der präsynaptischen Plasmamembran eine entscheidende Rolle in der Freisetzung von Neurotransmittern spielt. Synaptobrevin II vermittelt die auf ein Aktionspotenzial folgende, Ca^{2+} -abhängige Fusion synaptischer Vesikel und damit die Exozytose von Neurotransmittern und Weiterleitung des neuronalen Signals (Kaempf und Maritzen 2017). An dieser Stelle ist es interessant zu erwähnen, dass bei einigen Dystonieformen die krankheitsursächlichen Mutationen Auswirkungen auf die zelluläre Ca^{2+} -Homöostase und Ca^{2+} -abhängige Signalweitergabe haben. Die betroffenen Gene sind *HPCA*, *ANO3* und *KCTD17* (Charlesworth et al. 2012; Mencacci et al. 2015; Helassa et al. 2017; Osypenko et al. 2019).

Für die Reformierung der synaptischen Vesikel, um für einen weiteren Zyklus der Neurotransmitter-Freisetzung bereitzustehen, werden Proteine wie Synaptobrevin II internalisiert und recycelt. Hierfür ist eine Sortierung erforderlich, da die synaptischen Vesikel eine spezifische Verteilung der assoziierten Proteine im richtigen stöchiometrischen Verhältnis aufweisen müssen. AP180 bindet Synaptobrevin II und ist entscheidend für dessen Endozytose. Daneben scheint Synaptophysin als weiteres Protein eine Rolle in der ungestörten Wiederaufnahme von Synaptobrevin II zu spielen (Gordon und Cousin 2016).

AP180 *knockout*-Mäuse wiesen neben einer frühen postnatalen Sterblichkeit eine Wachstumsretardierung, Verhaltensauffälligkeiten und epileptische Anfälle auf. Letztere traten aufgrund eines Ungleichgewichts zwischen exzitatorischer und inhibitorischer Neurotransmission auf (Kaempf und Maritzen 2017). Ferner werden die eng interagierenden Proteine Synaptobrevin II, Synaptophysin, AP180 und CALM mit verschiedenen neurologischen Erkrankungen wie Intelligenzminderung und Alzheimer in Verbindung gebracht (Gordon und Cousin 2016).

Im Falle von *SNAP91* ist eine Beteiligung in der Entstehung einer neurologischen Erkrankung wie einer Dystonie leicht vorstellbar, denn:

- 1) Das Genprodukt AP180 ist direkt an Prozessen der synaptischen Transmission beteiligt.
- 2) An Mäusegehirnen konnten hohe Expressionslevel in einer Zeitperiode der Synapsenreifung gezeigt werden.
- 3) AP180 *knockout*-Mäuse zeigen neurologische Auffälligkeiten wie epileptische Anfälle.

- 4) AP180 interagiert eng mit anderen Proteinen die mit der Pathogenese verschiedener neurologischer Erkrankungen in Verbindung gebracht werden.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass sich eine Assoziation der Gene *PRKCQ*, *MBTPS1*, *MAP2K2* und *SNAP91* mit der Alkohol-responsiven Dystonie anhand der durchgeführten Versuche weder ausschließen noch bestätigen lässt. Die in der Literatur beschriebenen Funktionen der codierten Proteine lassen eine Beteiligung dieser Gene an der Entstehung der Bewegungsstörung Dystonie theoretisch als möglich erscheinen. Auch eine Beeinflussung von Reaktionswegen, an denen die entsprechenden Proteine beteiligt sind, durch Alkoholkonsum erscheint denkbar bzw. wurde bereits beschrieben. Ob die identifizierten genetischen Varianten aber überhaupt zu einer veränderten Funktion auf Proteinebene führen, lässt sich auf Basis der durchgeführten Untersuchungen nicht beurteilen. Ebenso wenig lässt sich sagen, ob sich die Transkriptionslevel (nach Alkoholkonsum) der Varianten-tragenden Gene, insbesondere im Gehirn, gegenüber Wildtyp-Allelen unterscheiden. Gegen *PRKCQ*, *MBTPS1*, *MAP2K2* und *SNAP91* als neue Krankheits-verursachende Gene spricht, dass sich unter den zusätzlich untersuchten 309 Patienten keine weiteren Protein-verändernden Varianten finden ließen. Wobei dazu gesagt werden muss, dass nicht alle codierenden Exons geprüft wurden, sondern nur jeweils die beiden Exons, in denen die ursprünglich betrachteten Individuen Varianten aufweisen. Darüber hinaus sind die genetischen Ursachen von Dystonien sehr heterogen und erklären einzelne Krankheitsgene jeweils nur einen sehr geringen Anteil an Krankheitsfällen. Dies ist leicht daran zu erkennen, dass über 250 Gene mit dem Auftreten von Dystonien/ Dystonie-Syndromen assoziiert sind (Zech et al. 2017) und gleichzeitig die Prävalenz von Dystonien nur etwa 16 pro 100.000 Einwohner beträgt (Steeves et al. 2012). Es ist denkbar, dass durch Untersuchungen in einem deutlich größeren Patientenkollektiv, weitere Mutationen in meinen Kandidatengenomen hätten detektiert werden können.

In diesem Projekt beruhte die Filterung der Exom-Daten zur Entdeckung neuer, mit Alkohol-responsiver Dystonie assoziierter Kandidatengene auf der Annahme, dass mindestens bei zwei der Betroffenen Varianten im gleichen Gen krankheitsverursachend sind. Aufgrund der oben genannten genetischen Heterogenität wäre es aber ebenso denkbar, dass bei den sieben untersuchten Individuen Varianten in sieben verschiedenen Genen krankheitsursächlich sind. Möglicherweise waren die den Filterschritten unterliegenden Annahmen zu streng gewählt, sodass die wirkliche verursachende Variante herausgefiltert wurde. Daneben stammten die Exom-Datensätze noch aus dem Jahr 2015, als die Technologie der Exom-Sequenzierung weniger ausgereift und fehleranfälliger als heute war. Es ist daher auch möglich, dass die tatsächlich pathogenen Varianten im Rahmen der Sequenzierung gar nicht detektiert wurden.

Außerdem ist anzumerken, dass das Studiendesgin lediglich auf monogenetische, direkt Protein-verändernde exonische Varianten ausgelegt war. Neben dem möglichen Einfluss von intronischen

und intergenischen Varianten müssen außerdem polygenetische Ursachen in Betracht gezogen werden. Auch epigenetische Faktoren, eine reduzierte Penetranz, Mosaik-Ausprägungen oder Mutationen auf Ebene der mitochondrialen DNA sollten als Einflussfaktoren in Betracht gezogen werden. All diese Fragestellungen müssen in zukünftigen Studien weiter beleuchtet werden, sodass die Erforschung Alkohol-responsiver Dystonien noch lange nicht an ihrem Ende angelangt ist.

4.2 Trio-Exom-Sequenzierung als wirkungsvoller Ansatz zur Identifizierung von genetischen Ursachen bei Dystonien

Ziel des zweiten Arbeitsteils meiner Doktorarbeit war es, die zugrundeliegenden genetischen Ursachen für die Dystonieerkrankungen zweier junger Patienten, ausgehend von Trio-Exom-Sequenzierungs-Datensätzen, zu identifizieren. Die ermittelten Kandidatengene werden in den folgenden Kapiteln ausführlich vorgestellt und deren Plausibilität in der Pathogenese der beobachteten Krankheitsbilder diskutiert.

4.2.1 *GNB1*-Mutation als Krankheitsursache bei einer Patientin mit generalisierter Dystonie und Intelligenzminderung

Das komplexe klinische Erscheinungsbild der ersten untersuchten Patientin umfasst eine generalisierte Dystonie, Hypotonie und Intelligenzminderung. Im Rahmen meiner Erforschungen wurde die Variante p.D118G in dem Gen *GNB1* entdeckt und erscheint nun als Krankheitsursache bei der Indexpatientin als gesichert. Nach der Filterung des Trio-Exom-Datensatzes war diese als beste Variante übriggeblieben. Daneben erfüllten zwei compound heterozygote Varianten im Gen *PTPN13* die angesetzten Einschlusskriterien. Die Vorhersagen verschiedener *in silico*-Prädiktionsprogramme, insbesondere der hohe CADD-Score von 31, ließen dabei die *GNB1*-Variante von Anfang an als Krankheitsursache deutlich wahrscheinlicher erscheinen. Für die Pathogenität der *GNB1*-Mutation spricht ebenfalls, dass in den Daten des *Exome Aggregation Consortiums (ExAC)* insgesamt nur sehr wenige Varianten in diesem Gen gelistet sind. Die Diskrepanz zwischen der erwarteten und beobachteten Anzahl an *Missense*-Mutationen und die Tatsache, dass keine *Loss of function*-Mutationen in den über 60.000 bei *ExAC* erfassten Individuen beobachtet werden konnten, deuten darauf hin, dass die Funktionalität des *GNB1*-Genprodukts essentiell für den Gesamtorganismus ist (s. Tab. 26 im Ergebnis-Teil).

Die durchgeführte Expressionsanalyse konnte zeigen, dass *GNB1* in relevanten Mengen in neuronalen Geweben exprimiert wird. Daher erscheint es wahrscheinlich, dass Mutationen in diesem Gen auch an der Entstehung von Krankheiten beteiligt sein könnten, die das zentrale Nervensystem

betreffen - wie z.B. der bei der Indexpatientin beobachteten globalen Entwicklungsverzögerung und generalisierten Dystonie.

Um mögliche Auswirkungen der p.D118G-Variante auf die intrazelluläre Lokalisation des *GNB1*-Genproduktes zu erforschen, wurde eine Immunfärbung durchgeführt. Hierfür wurden Fibroblasten und SH-SY5Y-Zellen transient mit einem *GNB1*-WT-Plasmid bzw. einem *GNB1*-c.353A>G-Plasmid transfiziert. In diesem Experiment konnten keine Unterschiede in der Lokalisation und Stärke der Expression des *GNB1*-Genprodukts zwischen dem G β 1-Wildtyp und der G β 1-Mutante gezeigt werden. Kritisch anzumerken ist allerdings, dass das Aussehen eines Großteils der Zellen (sowohl der WT-Plasmid-haltigen als auch der *GNB1*-c.353A>G-Plasmid-haltigen Zellen) nicht dem erwarteten Aussehen von gesunden Zellen entsprach. Zur Überprüfung der Ergebnisse wäre daher eine Wiederholung des Versuchs notwendig gewesen. Darauf wurde aus finanziellen und zeitlichen Gründen jedoch verzichtet. Außerdem ist anzumerken, dass die unveränderte intrazelluläre Verteilung von G β 1 keine Aussage über dessen Funktionsfähigkeit zulässt.

Um die Implikation eines bestimmten Gens in der Verursachung einer definierten Erkrankung bzw. eines Symptomkomplexes zu validieren, ist es nötig, weitere Fälle mit Mutationen in diesem Gen zu finden. Zu diesem Zweck wurden über 90 institutseigene DNA-Proben von Patienten mit einem überlappenden klinischen Bild per Sanger-Sequenzierung auf exonische, Protein-verändernde Varianten hin untersucht. Durch dieses Screening konnte allerdings kein weiterer Mutationsträger identifiziert werden. Jedoch wurden etwa zur gleichen Zeit der Entdeckung der p.D118G-Variante bei unserer Indexpatientin von Petrovski und Mitarbeitern 13 weitere Patienten mit *de novo*-Mutationen im Gen *GNB1* publiziert (Petrovski et al. 2016). Diese wiesen alle – vergleichbar mit der hier betrachteten Indexpatientin – eine globale Entwicklungsverzögerung sowie verschiedene weitere klinische Zeichen auf. Somit war eine zusätzliche unabhängige Evidenz für die Pathogenität von *Missense*-Varianten im *GNB1*-Gen gegeben.

GNB1 codiert die β 1-Untereinheit eines Guanin-Nukleotid bindenden Proteins: G β 1. Diese interagiert mit den G-Protein-Untereinheiten α - und γ . Im inaktivierten Zustand bilden die drei Untereinheiten einen heterotrimeren Komplex und GDP ist an die α -Untereinheit gebunden. G β 1 kommt in Zusammenhang mit Liganden-aktivierten Rezeptoren, sogenannten G-Protein-gekoppelten Rezeptoren (GPCR) vor und reguliert verschiedene in der Signalkaskade nachgeschaltete Effektor-Enzyme und Ionenkanäle (Lambright et al. 1996; Ford et al. 1998). Bindet ein Ligand an den GPCR, führt dies zur G-Protein-Aktivierung. Das an die α -Untereinheit gebundene GDP wird durch GTP ausgetauscht und die α -Untereinheit dissoziiert vom $\beta\gamma$ -Dimer. Die Bindungsfläche für die α -Untereinheit überlappt mit den Interaktionsflächen für verschiedene Effektor-Moleküle (Ford et al. 1998). Nach Aktivierung werden sowohl die α -Untereinheit als auch das $\beta\gamma$ -Dimer frei, um mit

nachgeschalteten Effektoren zu interagieren. Im Falle vom G β γ -Dimer sind dies unter anderem Phospholipasen, Adenylatcyclasen, G-Protein-gekoppelte Rezeptor-Kinasen, Phosphoinositol-3-Kinasen und Ionenkanäle (Ford et al. 1998). Die Tatsache, dass G β 1 z.B. Calcium-Ionenkanäle in Neuronen inhibiert (García et al. 1998), legt nahe, dass das Protein eine wichtige Rolle in der Signalübertragung an neuronalen Synapsen spielen könnte.

Weiterhin für *GNB1* als verursachendes Krankheitsgen spricht, dass G β 1 mit verschiedenen G α -Untereinheiten interagiert, u.a. mit GNAL und GNAO1, die selbst mit neurologischen Erkrankungen wie Dystonien assoziiert sind (Petrovski et al. 2016). Es ist bekannt, dass Mutationen im Gen *GNAL* zur Dystonie-Form DYT-*GNAL* (DYT25) führen (Fuchs et al. 2013). Eine weitere G α -Untereinheit, GNAO1, ist sowohl mit epileptischer Enzephalopathie (Nakamura et al. 2013) als auch mit einer progressiv verlaufenden Bewegungsstörung mit choreatiformen und ballistischen Bewegungen in Verbindung gebracht worden (Ananth et al. 2016).

All diese Erkenntnisse ergänzen das Bild von mit G-Protein-Signalwegen assoziierten neurologischen Erkrankungen und unterstreichen die Plausibilität von *GNB1* als Krankheitsgen in der in diesem Projekt untersuchten Patientin. Konkret auf eine mögliche Pathogenität der p.D118G-Variante deuten auch die Ergebnisse einer *in vitro*-Untersuchung. Hier zeigte sich auf funktioneller Ebene, dass eine Mutation an Position 117 zu einer verminderten Bindung an die β -adrenerge Rezeptor-Kinase 1 (β ARK1) und eine Mutation an Position 119 zu einer veränderten Interaktion mit Calcium-Ionenkanälen führt (Ford et al. 1998). Diese Erkenntnisse legen nahe, dass auch die p.D118G-Variante zu Beeinträchtigungen in der Wechselwirkung mit Effektor-Molekülen führen könnte.

Anschließende Untersuchungen der p.D118G-Variante mittels eines BRET-Assays konnten dann zeigen, dass diese Mutation die Agonist-induzierte G-Protein-Aktivierung über den D1-Rezeptor-Signalweg beeinflusst (Lohmann et al. 2017). In diese Studie wurden 9 weitere *GNB1*-Missense-Mutationen eingeschlossen, die durch eine Kooperation mit der Centogene AG (Rostock) bekannt geworden waren: p.L30F, p.R52G, p.G64V, p.H91R, p.A92T, p.P94S, p.R96L, p.A106T und p.K337Q. Die dafür eingesetzten *GNB1*-Mutanten-Venus-Plasmide wurden im Rahmen der experimentellen Arbeiten meiner Dissertation erzeugt.

Im Zuge der funktionellen Studien konnte für die beiden Mutationen p.G64V und p.A106T eine im Vergleich zum Wildtyp deutliche Beeinträchtigung in der G β γ -Dimer-Formation festgestellt werden. In der weiterführenden Betrachtung der Wechselwirkung des G β γ -Dimers mit G α_{olf} und dem β γ -Effektor-Molekül GRK konnten zusätzlich zu den beiden oben genannten Mutationen ebenso für die Varianten p.P94S und p.R96L eine Veränderung im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden. Es ist bekannt, dass der Bereich des Proteins, in dem sich P94 und R96 befinden, für die Interaktion mit Effektor-Bindungspartnern wichtig ist (Lodowski et al. 2003). Daher wird angenommen, dass die oben genannten Mutationen zu einer herabgesetzten Fähigkeit der Signalweitergabe von G β 1 γ 7 an

den Effektor führt. Im Gegensatz zu den zuvor genannten Mutationen weist die Mutante p.A92T ein hohes basales BRET-Signal auf, was für eine Beeinträchtigung in der Wechselwirkung mit $G\alpha_{olf}$ spricht.

In einem weiteren Teilversuch wurde schließlich die Signalweitergabe über den Dopamin Typ 1-Rezeptor-Signalweg nach Agonisten-induzierter Aktivierung untersucht. Neben den bereits oben genannten Mutationen zeigten hier außerdem die Varianten p.D118G und p.R52G eine signifikante Beeinträchtigung. Beide Reste umgeben die $G\alpha$ -Bindungsstelle, sodass eine Rolle in der Neuordnung des heterotrimeren G-Proteins nach Liganden-Bindung an den D1R plausibel erscheint.

Für die Varianten p.L30F, p.H91R und p.K337Q unterschied sich das Verhalten in den durchgeführten Untersuchungen nicht vom Wildtyp. Dies bedeutet möglicherweise, dass es sich hierbei um zwar seltene, aber benigne Varianten handelt, da nicht alle raren Varianten in gegebenen Krankheitsgenen auch pathogen sind.

In den Jahren 2017 bis 2019 wurden etliche weitere Krankheitsfälle von Patienten mit *GNB1*-Mutationen beschrieben. Die beobachteten klinischen Auffälligkeiten umfassen Entwicklungsverzögerung/ Intelligenzminderung, neuromotorische und weitere breitgefächerte Symptome (Brett et al. 2017; Hemati et al. 2018; Szczaluba et al. 2018; Endo et al. 2019; Jones et al. 2019). Mittlerweile sind nun 53 Patienten bekannt, bei denen Mutationen im Gen *GNB1* als Krankheitsursache angenommen werden. Beachtet man, dass oben genannte funktionelle Untersuchungen darauf hindeuten, dass die Varianten p.L30F, p.H91R und p.K337Q möglicherweise benigne sein könnten, verbleiben immerhin 50 betroffene Individuen (Petrovski et al. 2016; Steinrücke et al. 2016; Brett et al. 2017; Lohmann et al. 2017; Hemati et al. 2018; Szczaluba et al. 2018; Endo et al. 2019; Jones et al. 2019). Ohne Berücksichtigung der 3 zuletzt genannten Varianten handelt es sich bei dem Mutationsspektrum um 25 verschiedene *Missense*- sowie 2 *Frame-Shift*- und 2 Spleiß-Stellen-Mutationen. Von den 25 *Missense*-Varianten sind 18 verschiedene Protein-Positionen betroffen, davon befinden sich 14 in den Exons 6 und 7 (s. Abb. 26). Die Varianten aggregieren damit in einer Region, von der bekannt ist, dass sie für die Interaktion mit der $G\alpha$ -Untereinheit und verschiedenen Effektor-Molekülen von Bedeutung ist (Lambright et al. 1996). Die *Frame-Shift*- und Spleiß-Stellen-Mutationen führen zu verkürzten Proteinen. Nicht funktionsfähige Proteine bzw. fehlerhafte RNA werden in Zellen abgebaut, was zu einem Verlust an funktionellem Protein führt (Lohmann et al. 2017).

Die häufigste bisher beschriebene *GNB1*-Mutation ist c.239T>C, p.I80T mit 12 betroffenen Patienten. Unter Berücksichtigung von 2 zusätzlichen Patienten mit der Variante c.239T>A, p.I80N sind 28 % der bekannten Patienten von einem Aminosäure-Austausch an der gleichen Position betroffen.

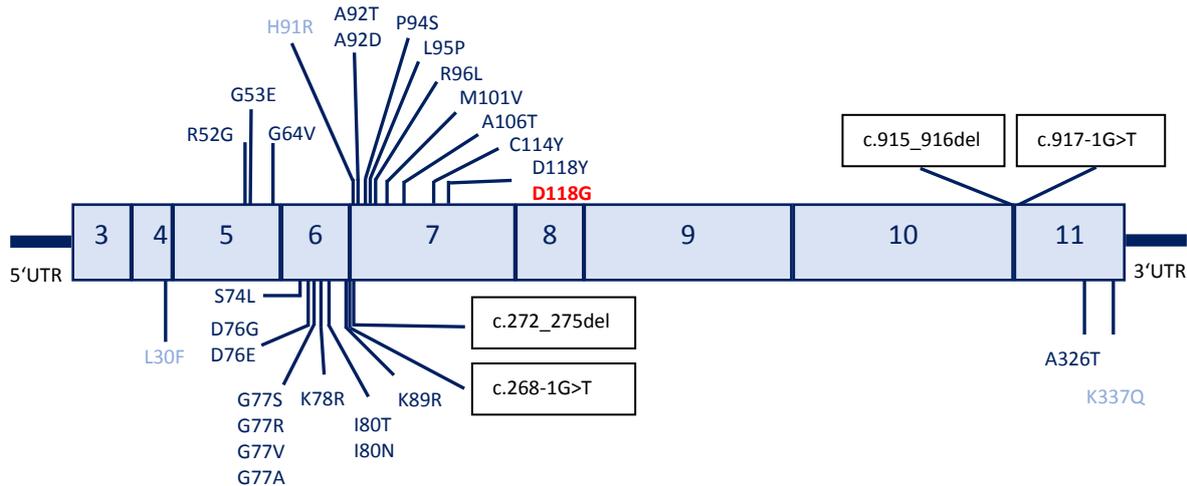


Abbildung 26: Schematische Darstellung von *GNB1*-Varianten.

Die codierenden Exons des Gens *GNB1* sind als blaue Rechtecke dargestellt, flankiert von der jeweiligen untranslatierten Region. *Frame-Shift*- und Spleiß-Stellen-Mutationen sind in schwarz umrandeten Kästchen gezeigt. Bei den restlichen Mutationen handelt es sich um *Missense*-Varianten. Die nach den funktionellen Studien von Lohmann und Mitarbeitern (2017) möglicherweise als benigne beschriebenen Varianten sind in hellblau geschrieben, die im Rahmen meiner Promotionsarbeit entdeckte Variante p.D118G in roter Farbe. Die Mutationen wurden in folgenden Publikationen beschrieben: Petrovski et al. 2016; Steinrücke et al. 2016; Brett et al. 2017; Lohmann et al. 2017; Hemati et al. 2018; Szczałuba et al. 2018; Endo et al. 2019; Jones et al. 2019.

Bemerkenswerterweise wurden auch bei 2 weiteren Patienten die Variante c.353A>G, p.D118G entdeckt, die ich im Rahmen meiner Promotionsarbeit als pathogene Variante bei der untersuchten Indexpatienten identifizieren konnte (Steinrücke et al. 2016; Hemati et al. 2018). Nimmt man einen weiteren Krankheitsfall mit der *GNB1*-Mutation c.352G>T, p.D118Y (Jones et al. 2019) hinzu, ist die Protein-Position 118 bei 8 % (4/50) der bekannten Patienten betroffen. Alle 4 Patienten weisen eine Hypotonie auf, die Patientin mit der p.D118Y-Mutation dazu eine generalisierte Dystonie und myoklonische Bewegungsstörungen. Während die in dieser Dissertation beschriebene Patienten bereits im Jahr 2001 geboren wurde und die Patientin mit der p.D118Y-Mutation ein 16-jähriges Mädchen ist, sind die beiden weiteren Patientinnen erst zwei Jahre alt. Beachtet man den Krankheitsverlauf der beiden Jugendlichen, erscheint es durchaus möglich, dass sich auch bei den beiden kleinen Mädchen noch motorische Auffälligkeiten entwickeln und sich damit dem Phänotyp der beiden Älteren annähern werden.

Bei Betrachtung des phänotypischen Spektrums der 50 Betroffenen, fällt als bei allen vorhandenes Symptom eine Entwicklungsverzögerung oder Intelligenzminderung auf. Außerdem leiden 25 der Individuen an epileptischen Anfällen, 39 an abnormalem Muskeltonus und 29 an ophthalmologischen Einschränkungen (z.B. Ophthalmoplegie, Strabismus, Nystagmus). Darüber hinaus sind verschiedene Bewegungsstörungen (Tics, Ataxie, Dystonie oder Chorea in mindestens 16 Fällen) häufige Symptome. Daneben wurden Anomalien weiterer Organsysteme beschrieben, u.a. gastrointestinale

Symptome, Hörschwierigkeiten, kardiovaskuläre Defekte sowie Auffälligkeiten der Haut und der Urogenitalregion (Hemati et al. 2018).

Die große Breite und Variabilität der durch Mutationen im *GNB1*-Gen verursachten klinischen Auffälligkeiten entspricht der Beobachtung, dass sich Entwicklungsverzögerungen und Intelligenzminderungen häufig begleitet von einem sehr heterogenen Symptomenkomplex präsentieren (Vissers et al. 2016). Interessanterweise führen Mutationen in den Genen *GNB2* und *GNB5*, welche für die G-Protein-Untereinheiten $\beta 2$ und $\beta 5$ codieren, ebenfalls zu komplexen Syndromen, die unter anderem eine Intelligenzminderung beinhalten (Lodder et al. 2016; Malerba et al. 2018; Fukuda et al. 2019). In der weiteren Erforschung solch sowohl phänotypisch als auch genetisch vielfältiger Krankheitsbilder stellt die Exom-Sequenzierung ein wichtiges Instrument dar. Die Methode kann nicht nur helfen nach und nach immer mehr krankheitsverursachende Gene zu identifizieren, sondern auch wie im Fall von *GNB1* das phänotypische Spektrum eines Krankheitsgens aufzudecken. Im konkreten Fall der im Rahmen meiner Doktorarbeit beschriebenen Indexpatientin konnte mit Hilfe der Trio-Exom-Sequenzierung mit großer Sicherheit als genetische Krankheitsursache die *GNB1*-Mutation p.D118G identifiziert werden.

4.2.2 *TBC1D9B* als potenzielles Krankheitsgen bei einem jungen Patienten mit isolierter generalisierter Dystonie

Ebenso wie im vorherigen Projekt ging es in diesem Teil der vorliegenden Promotionsarbeit darum, die genetische Ursache für die (in diesem Fall isolierte) generalisierte Dystonieerkrankung eines Patienten zu identifizieren. Es wurden wiederum die durch eine Trio-Exom-Sequenzierung entdeckten, vom Referenzgenom abweichenden Varianten nach Kandidatengenomen gefiltert. Nach den Filterschritten und der Validierung durch Sanger-Sequenzierung verblieb lediglich eine *de novo* heterozygote Variante als vielversprechender Kandidat: c.1430T>A, p.M477K im Exon 9 des Gens *TBC1D9B*. Diese Variante wies aber nicht in allen betrachteten *in silico*-Prädiktionsprogrammen eine potenziell schädigende Wirkung auf. Zum Beispiel liegt der CADD-Score mit 15,63 deutlich niedriger als bei der *GNB1*-Variante für die erste Patientin und bedeutet, dass die Variante nur zu den 10 % der schädlichsten Varianten im menschlichen Genom gehört. Während die *GNB1*-Mutation mit einem CADD-Score von 31 Teil der 0,1 % am wenigsten tolerierten Veränderungen im menschlichen Genom ist.

Die Sequenzierung des Exons 9 des *TBC1D9B*-Gens in DNA-Proben von 160 weiteren Dystonie-Patienten konnte nicht zur Identifizierung zusätzlicher Mutationsträger führen. Außerdem wurde mithilfe der Website „GeneMatcher“ (<https://genematcher.org>) nach einem zweiten Krankheitsfall mit Mutation im selben Gen gesucht. Auf dieser Website können Forscher potenzielle Krankheitsgene eingeben. Hinterlegt ein zweiter Forscher einen weiteren Krankheitsfall mit einer

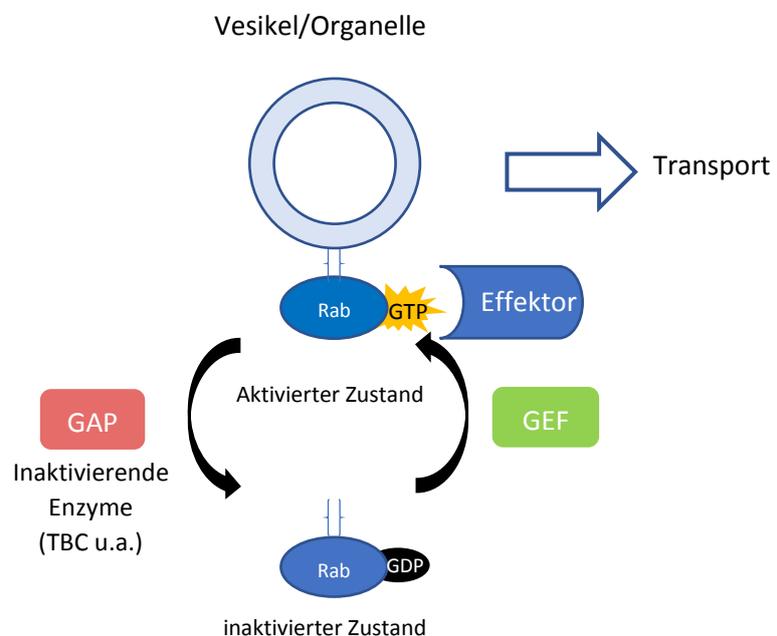
Mutation im selben Gen, werden beide benachrichtigt und können miteinander in Kontakt treten, um z.B. den Phänotyp zu vergleichen. Jedoch konnte auch auf diese Weise kein weiterer Mutationsträger ermittelt werden.

Da keine zusätzlichen Experimente wie z.B. funktionelle Versuche durchgeführt wurden, lässt sich nicht sagen, ob bzw. zu welchen Veränderungen der Aminosäureaustausch p.M477K auf zellulärer Ebene führt und ob dadurch wichtige Reaktionskaskaden beeinträchtigt werden.

Das Gen *TBC1D9B* codiert das Mitglied 9B der TBC 1-Domänen-Protein-Familie. Das Genprodukt wird neben anderen auch in neuronalen Geweben exprimiert, u.a. im zerebralen Kortex, dem Hippocampus und dem Kleinhirn (<https://www.proteinatlas.org>, letzter Zugriff: 08.11.2019).

TBC1D9B hat 5 verschiedene funktionelle Domänen: die Gram 1- und Gram 2-Domäne, die TBC-Domäne, die EF-Hand-Domäne sowie die ATG8-Interaktions-Domäne (Gallo et al. 2014; Liao et al. 2018). Die von mir entdeckte Variante p.M477K befindet sich jedoch außerhalb der genannten Domänen. *TBC1D9B* gehört zu einer großen Familie mit über 40 identifizierten TBC-Domänenhaltigen Proteinen in Menschen und Mäusen. Von einigen ist eine Wechselwirkung mit Rab-Proteinen bekannt: Und zwar fungieren diese als GTPase-aktivierende Proteine (GAP). Das heißt, sie stimulieren die GTP-Hydrolyse von GTP-gebundenen Rab-Proteinen und überführen diese dadurch in einen inaktiven Zustand (Abb. 27) (Stenmark 2009; Fukuda 2011).

Abbildung 27: Rab-Zyklus zwischen inaktivem und aktiviertem Zustand (adaptiert nach Fukuda 2011, Abb.1). GAP: GTPase-aktivierendes Protein, GEF: Guanin-Nukleotid-Austausch Faktor (guanine-nucleotide-exchange factor), GDP: Guanosindiphosphat, GTP: Guanosintriphosphat. Rab-Proteine wechseln zwischen zwei Aktivitätszuständen: dem GDP-gebundenen inaktiven Zustand und dem GTP-gebundenen aktiven Zustand. Der Wechsel zwischen den Zuständen wird durch aktivierende (GEF) und inaktivierende (GAP) Enzyme reguliert. Im aktivierten Zustand kann Rab an spezifische Organellen/ Vesikel binden und deren Transport initiieren.



Für diese Interaktion spielt die TBC-Domäne eine wichtige Rolle (Pan et al. 2006). *TBC1D9B* selbst interagiert mit den Rab-Proteinen Rab11a, Rab11b und Rab4a. Es konnte jedoch nur für das Protein Rab11a nachgewiesen werden, dass dieses ein Substrat für die *TBC1D9B*-vermittelte GTP-Hydrolyse

ist (Gallo et al. 2014). Rab11 ist an der Regulation verschiedener vesikulärer Protein-Transportprozesse beteiligt, z.B. der regulierten Exozytose (Khandelwal et al. 2013), dem Membran-Protein-Recycling (Takahashi et al. 2012), der Transzytose (Wang et al. 2000), und dem Autophagosomen-Reaktionsweg (Fader et al. 2008). Interessanterweise sind in der Literatur zwei *de novo* heterozygote Mutationen in *RAB11B* beschrieben, die zu einem klinischen Syndrom mit Intelligenzminderung und Entwicklungsverzögerung sowie verschiedenen weiteren neurologischen Beeinträchtigungen führen. Zu den zusätzlich beobachteten Symptomen gehören Hypotonie, Epilepsie, Spastizität, Nystagmus, ataktisches Gangbild und Dystonie (Lamers et al. 2017). Für *TBC1D9B* selbst wurde eine konkrete Bedeutung im Rahmen des Autophagosomen-Reaktionswegs beschrieben. Über seine ATG8-Interaktions-Domäne wechselwirkt *TBC1D9B* mit verschiedenen ATG8-Säugetier-Homologen. (ATG8 kommt in Hefen vor und ist dort ebenfalls an der Regulation von Autophagie-Prozessen beteiligt.) Beispielsweise interagiert *TBC1D9B* mit dem ATG8-Homolog LC3B, welches an die Membran von Autophagosomen gebunden ist, und begünstigt den Autophagosomen-Flux. Möglicherweise spielt dabei die Inaktivierung von RAB11 eine Rolle, welche die Fehlleitung des Autophagosoms in Rab-spezifische Recycling-Transportwege verhindern und damit den Weg zum lysosomalen Kompartiment und die Degradierung des Autophagosomen-Inhalts erlauben könnte (Liao et al. 2018). Darüberhinaus scheint eine Signalkaskade bestehend aus LMTK1, *TBC1D9B* und Rab11 eine wichtige Rolle in einem endosomalen Transportprozess zu spielen, welcher die Entstehung, Reifung und Dichte von dendritischen Dornfortsätzen in Neuronen reguliert (Nishino et al. 2019). Damit zeigt es sich denkbar, dass sich funktionsbeeinträchtigende Mutationen in *TBC1D9B* auf die fein abgestimmte synaptische Formation und Funktion auswirken und damit auch neurologische Symptome und Krankheitsbilder wie eine Bewegungsstörung hervorrufen könnten.

Weitgehend ungeklärt ist die Relevanz der EF-Hand und der GRAM-Domänen des Gens. In anderen Proteinen wird die GRAM-Domäne mit der Interaktion mit Phospholipiden in Zusammenhang gebracht (Tsujita et al. 2004), während die EF-Hand als Ca^{2+} -bindendes Motiv beschrieben wird (Grabarek 2011). In diesem Zusammenhang ist interessant (wie schon weiter oben im Diskussionsteil in Bezug auf das Gen *SNAP91* erwähnt wurde), dass es verschiedene Dystonie-Krankheitsgene gibt, die Einfluss auf die Calcium-abhängige Signalweitergabe in Zellen haben. Beispielsweise codiert *HPCA* (assoziiert mit DYT2-ähnlicher autosomal-rezessiver Dystonie) für Hippocalcin, ein neuronales Calcium-Sensor-Protein (Helassa et al. 2017; Osypenko et al. 2019). Anoctamin 3, das Genprodukt von *ANO3*, ist ein transmembranäres Protein, das zur Familie der Calcium-aktivierten Chlorid-Kanäle gehört. Mutationen in diesem Gen bedingen die autosomal-dominant vererbte kranio-zervikale Dystonie DYT24 (Charlesworth et al. 2012). Für eine Mutation im Gen *KCTD17*, die zu autosomal-dominanter Myoklonus-Dystonie führt, konnten ebenfalls Beeinträchtigungen der Calcium-

Homöostase gezeigt werden (Mencacci et al. 2015). Die konkrete Bedeutung der EF-Hand und GRAM-Domänen für die Funktion von TBC1D9B gilt es aber noch zu erforschen.

Mittlerweile sind eine ganze Reihe von Erkrankungen bekannt, die mit Mutationen in Rab-Genen bzw. in Rab-GTPasen assoziiert sind (Mitra et al. 2011). Dazu gehören seltene monogenische Syndrome wie das Griscelli-Syndrom, die X-chromosomale nicht-spezifische mentale Retardierung und das Charcot-Marie-Tooth Syndrom, um nur eine kleine Auswahl zu nennen (Corbeel und Freson 2008). Ein weiteres Beispiel ist das Warburg-Syndrom. Dieses ist zum einen durch schwere Fehlbildungen im Bereich des visuellen Apparats und zum anderen durch neurologische Auffälligkeiten wie Intelligenzminderung, Hypotonie und eine zunehmende Spastik der Extremitäten gekennzeichnet (Morris-Rosendahl et al. 2010). Als genetische Ursache wurden neben autosomal-rezessiven Mutationen in den Genen *RAB3GAP1*, *RAB3GAP2* und *RAB18* (Handley et al. 2013) außerdem *Loss of Function*-Mutationen in *TBC1D20* beschrieben (Liegel et al. 2013).

Ein Hinweis, dass Beeinträchtigungen in Rab-Reaktionswegen konkret an der Pathogenese von Dystonien beteiligt sein könnten, betrifft das Gen *RAB12*. Hier wurde eine Häufung von seltenen genetischen Varianten bei Individuen mit Musiker-Dystonie und weiteren Dystonie-Formen beschrieben (Hebert et al. 2017).

Auch im Bereich der Bewegungsstörung Parkinson mehrt sich die Evidenz, dass RAB-GTPasen eine Rolle in der Pathogenese spielen (Gao et al. 2018). Verschiedene RAB-GTPasen sind physiologische Substrate der Kinase LRRK2 (Leucine-Rich Repeat Kinase), deren codierendes Gen *LRRK2* ein gut charakterisiertes Parkinson-Krankheitsgen ist (Seol et al. 2019). In verschiedenen Familien mit X-chromosomal vererbter Parkinson-Erkrankung konnten außerdem Mutationen im Gen *RAB39B* als krankheitsursächlich nachgewiesen werden (Wilson et al. 2014; Lesage et al. 2015; Mata et al. 2015).

Allen diesen Erkrankungen gemeinsam ist, dass eine Beeinträchtigung des Vesikel-Transports ein wichtiger Aspekt der Pathophysiologie zu sein scheint (Corbeel und Freson 2008; Cheng et al. 2018).

Ein anderes Gen mit einer TBC-Domäne, welches in Zusammenhang mit der Entstehung verschiedener Syndrome beschrieben wurde, ist *TBC1D24*. Mittlerweile sind über 50 Krankheitsfälle durch *TBC1D24*-Mutationen publiziert, die sich durch verschiedene Epilepsie-Formen und ggf. zusätzliche neurologische Symptome wie Intelligenzminderung, Dysarthrie oder Bewegungsstörungen wie Ataxie, Myoklonus oder Dystonie auszeichnen (Corbett et al. 2010; Falace et al. 2010; Balestrini et al. 2016; Lüthy et al. 2019; Zhang et al. 2019). Während andere TBC-Domänen-haltige Proteine die Aktivität von Rab-Proteinen regulieren (s. Abb. 27), fehlt *TBC1D24* das hierfür als notwendig beschriebene Arginin-Finger-Motiv innerhalb der Konsensus-Sequenz der TBC-Domäne (Fukuda 2011). Eine direkte Wechselwirkung mit Rab-Proteinen wurde bisher nicht beschrieben (Rehman et al. 2014). Hingegen interagiert *TBC1D24* mit dem ADP Ribosylierungs-Faktor 6 (ARF6) (Falace et al. 2010). ARF6 ist am Membranaustausch zwischen der Plasmamembran und

endozytischen Kompartimenten beteiligt (Radhakrishna und Donaldson 1997). TBC1D24 spielt außerdem eine regulierende Rolle in der Axon-Verlängerung (Nervenwachstum) und der Axon-Verzweigung (Corbett et al. 2010). Diese Funktionen zeigen eine gewisse Parallelität zu den durch TBC1D9B und Rab11 regulierten vesikulären Transportprozessen und der Reifung und Dichte von dendritischen Dornfortsätzen im Bereich neuronaler Synapsen.

Interessant ist weiterhin, dass auf der Plattform Decipher (<https://decipher.sanger.ac.uk>, letzter Zugriff 08.11.2019), auf welcher phänotypische und genotypische Patientendaten verglichen werden können, Deletions- und Duplikationssyndrome aufgelistet sind, die auch das Gen *TBC1D9B* umfassen. Das phänotypische Spektrum dieser Syndrome ist weit und beinhaltet u.a. Nieren- und Herzfehlbildungen, aber auch neuropsychiatrische Auffälligkeiten wie strukturelle Hirnfehlbildungen, verzögerte Sprachentwicklung bzw. globale Entwicklungsverzögerung, Intelligenzminderung, neonatale Hypotonie, Autismus und ADHS-Symptomatik. Außerdem wird ein Patient mit einer heterozygoten *de novo* Mutation im Exon 11 des Gens *TBC1D9B* beschrieben, der sich durch Abnormalitäten im Nervensystem auszeichnet.

Angelehnt an die Erkenntnisse von Erkrankungen, die mit anderen TBC-Domänen-haltigen Proteinen oder Rab-Proteinen assoziiert sind, erscheint es denkbar, dass auch im Fall von TBC1D9B Beeinträchtigungen vesikulärer Transportprozesse im Bereich neuronaler Synapsen eine Rolle in der Pathogenese neurologischer Symptome spielen könnten, wie sie bei einer Dystonie vorhanden sind. In der Gesamtschau erscheint die p.M477K-Variante im *TBC1D9B*-Gen als Krankheitsursache bei dem an generalisierter Dystonie leidenden Indexpatienten als vielversprechend. Eine genauere Aussage über mögliche Veränderungen auf Protein-Ebene und damit verbundene Pathogenität ist aber aufgrund von fehlenden funktionellen Untersuchungen oder publizierten vergleichbaren Krankheitsfällen mit Mutationen in diesem Gen nicht möglich. Letztendlich muss in Betracht gezogen werden, dass es sich bei der p.M477K-Variante im *TBC1D9B*-Gen nicht um die Krankheitsursache handelt, sondern dass die wahre pathogene Mutation nicht detektiert oder herausgefiltert wurde.

Betrachtet man die beiden Forschungsprojekte, bei denen die genetische Krankheitsursache mittels Trio-Exom-Sequenzierung gesucht wurde, zeigt sich, dass dies ein wirkungsvoller Ansatz ist, um die pathogene Mutation in Fällen seltener Erkrankungen zu identifizieren. Es ist damit ziemlich sicher gelungen, die genetische Ursache der Erkrankung der Indexpatientin in Familie 1 zu identifizieren und auch die im zweiten Patienten entdeckte *Missense*-Variante im Gen *TBC1D9B* erscheint als Krankheitsursache durchaus möglich. Hier wären allerdings die unabhängige Beschreibung weiterer Fälle durch andere Forschergruppen oder funktionelle Studien nötig, um *TBC1D9B* als Krankheitsgen zu validieren. In der Literatur wird beschrieben, dass die Exom-Sequenzierung in etwa 40 % der Patienten (je nach Studiendesign bis über 50 %) zur Ursachenfindung in bisher ungeklärten Fällen seltener Erkrankungen führt (Deciphering Developmental Disorders Study 2015; Zhu et al. 2015;

Clark et al. 2018; Fogel 2018; Mahler et al. 2019). Damit bleibt es nicht verwunderlich, dass im Rahmen meiner Doktorarbeit nur in 1 von 2 Fällen, die genetische Krankheitsursache sicher identifiziert werden konnte.

Weiterhin ist deutlich geworden, dass im Zeitalter des *Next Generation Sequencings* die Schwierigkeit der Forschung darin liegt, unter den vielen detektierten Varianten gute Kandidatengene zu erkennen. Dabei können verschiedene *in silico*-Prädiktionsprogramme eine Hilfe zur Entscheidungsfindung sein. In der aktuellen Erforschung der Pathogenese seltener Erkrankungen liegt der Fokus momentan noch auf monogenetischen exonischen Ursachen und ggf. Spleiß-Stellen-Mutationen, die direkt die Proteinstruktur beeinflussen. Zu bedenken ist dabei, dass das Exom, also der protein-codierende Anteil der DNA, weniger als zwei Prozent des menschlichen Genoms ausmacht (Scacheri und Scacheri 2015). Mit Zunahme der *Whole-Genome*-Sequenzierung (sinkende Kosten, höhere Genauigkeit, verbesserte Interpretationsmöglichkeiten) werden sicherlich auch intronische und intergenische Varianten vermehrt in den Blickpunkt rücken. Etwa 80 % des menschlichen Genoms enthalten nicht-kodierende funktionale Elemente wie Promotoren, *Enhancer*, *Silencer*, *Operons* und Insulatoren, die an Regulationsvorgängen der Gen-Expression beteiligt sind (Scacheri und Scacheri 2015) und sich somit auch phänotypisch auswirken könnten. Ferner können nicht-kodierende RNAs die Genexpression hoch- oder herunterregulieren und wirken sich epigenetische Mechanismen wie Histon-Modifikationen und DNA-Methylierungen auf die Transkription von Genen aus (Barr und Misener 2016). Auf die Bedeutung von Sequenz-Varianten außerhalb des Exoms in der Entstehung von Erkrankungen deuten die Ergebnisse von Genom-weiten Assoziations-Studien (GWAS) hin. Diese Studien untersuchen vor allem Varianten, die das genetische Risiko für verbreitete Krankheiten wie beispielsweise Alzheimer, Diabetes Typ 2 oder psychiatrische Störungen erhöhen. Die hierdurch identifizierten Krankheits-assoziierten Varianten liegen zu über 90 % innerhalb nicht-kodierender Sequenzen, konzentriert im Bereich regulatorischer Elemente (Maurano et al. 2012).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass das *Next Generation Sequencing* in den letzten Jahren die Identifikation zahlreicher Krankheits-verursachender Gene ermöglicht hat. Im Rahmen meiner Promotionsarbeit konnte zumindest bei einer Patientin die ursächliche Mutation erkannt (Steinrücke et al. 2016) und die funktionelle Relevanz auf Proteinebene nachfolgend näher erforscht werden (Lohmann et al. 2017). In Zukunft werden durch weitere technische Verbesserungen und bioinformatische Herangehensweisen sicherlich zunehmend auch Varianten im Bereich nicht-codierender DNA in den Fokus rücken und zur Klärung weiterer Krankheitsfälle beitragen können. Die (neuro-) genetische Forschung ist und bleibt somit ein spannendes Forschungsfeld, in dem es noch viel zu entdecken gibt. Indes steigt die Hoffnung, immer mehr Patienten, die genetische Ursache ihrer Erkrankung mitteilen zu können und damit die ersten Schritte in Richtung der Entwicklung einer passenden, genotypspezifischen Therapie zu gehen.

5 Zusammenfassung

Die Entwicklung der Technologie des sogenannten *Next Generation Sequencings* (NGS) zur Bestimmung von Exom- und Genom-Sequenzen vor mittlerweile mehr als 10 Jahren hat die genetische Forschung revolutioniert. Die hervorzuhebenden Kennzeichen dieses Verfahrens sind die massive Parallelisierung der Sequenzierung und die Detektion der Basenabfolge bereits während der Synthesereaktion der DNA-Stränge. In den folgenden Jahren hat das NGS die Entdeckung von jährlich etwa 200 neuen Krankheitsgenen im Bereich der monogenetischen Erkrankungen erlaubt. Davon hat auch das Feld der Bewegungsstörungen, u.a. die Erforschung von Dystonien profitiert. Dystonien sind charakterisiert durch anhaltende oder intermittierende nicht kontrollierbare Muskelkontraktionen, die zu abnormalen, oftmals sich wiederholenden Bewegungen oder Haltungstereotypien führen.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten weitere genetische Ursachen von Dystonien in zwei verschiedenen Ansätzen mittels Exom-Sequenzierung erforscht werden. Der erste Teil meiner Promotionsarbeit beschäftigte sich mit der Suche nach krankheitsverursachenden Mutationen bei Alkohol-responsiven Dystonien. Ausgangspunkt für meine Untersuchungen waren die Exom-Datensätze von neun Patienten. Zur Identifikation von Kandidatengenen wurden die Datensätze nach seltenen Protein-verändernden Varianten gefiltert, die Einschätzung derer Pathogenität anhand von sogenannten Prädiktionsprogrammen, die Betrachtung der Häufigkeit von Varianten in den betroffenen Genen in Populationsdatenbanken sowie eine Literaturrecherche zu Expressionsdaten und Genfunktionen durchgeführt. Nach diesen Schritten erschienen *MAP2K2*, *MBTPS1*, *PRKCQ* und *SNAP91* als vielversprechendste Kandidatengene. Je zwei der betroffenen Patienten wiesen Varianten in diesen Genen auf. Beim Screening von 309 weiteren Patienten konnten zwar keine seltenen exonischen, Protein-verändernden Varianten detektiert werden, jedoch wiesen ein bzw. zwei Personen interessante intronische Varianten in den Genen *MBTPS1* bzw. *MAP2K2* auf, die möglicherweise zu Spleißveränderungen führen könnten. Da von diesen Patienten keine RNA-Proben verfügbar waren, konnte allerdings nicht überprüft werden, ob es durch die Varianten tatsächlich zu alternativem Spleißen kommt. Daneben wurde untersucht, ob die Kandidatengene in ihrer DNA-Sequenz ein sogenanntes „Alkohol-responsives Element“ (ARE) aufweisen, welches zuvor in Genen beschrieben wurde, deren Expression sich unter Alkoholexposition ändert. In keinem der untersuchten Gene konnte das ARE in unveränderter Form detektiert werden. Allerdings fanden sich im umgebenden Bereich der Kandidatengene *PRKCQ* und *MBTPS1* Basenabfolgen, die sich nur geringfügig vom ARE-Motiv unterschieden. Da keine funktionellen Studien durchgeführt wurden, lässt sich jedoch keine Aussage treffen, ob eine Alkoholexposition Einfluss auf die Expression der Kandidatengene hat. Insgesamt wurden *MAP2K2*, *MBTPS1*, *PRKCQ* und *SNAP91* als Kandidatengene identifiziert, aber es konnten keine gesicherten Schlussfolgerungen zur Pathogenität gezogen

werden, wenngleich die verfügbare Literatur zu Expressionsmustern und Reaktionswegen eine Rolle in der Pathogenese von Alkohol-responsiven Dystonien denkbar erscheinen lässt.

Darüber hinaus wurde nach der genetischen Krankheitsursache bei zwei jungen Patienten mit generalisierter Dystonie gesucht. Hierfür wurde der Ansatz der Trio-Exom-Sequenzierung verfolgt, d.h. es wurden jeweils die Exom-Datensätze der erkrankten Indexpatienten sowie ihrer beiden gesunden Eltern betrachtet und verglichen. Die Vorgehensweise zur Identifikation von Kandidatengenen beinhaltete im Wesentlichen die gleichen Arbeitsschritte, die im Falle der Alkohol-responsiven Dystonien angewendet wurden. Bei einer Patientin mit generalisierter Dystonie, Entwicklungsverzögerung und Intelligenzminderung konnte auf diese Weise die ursächliche Mutation identifiziert werden. Dabei handelt es sich um die Variante c.353A>G, p.D118G in dem Gen *GNB1* (Steinrücke et al. *Neurol Genet* 2016). Das Gen codiert für die β 1-Untereinheit eines Guanin-Nukleotid bindenden Proteins (G β 1). Eine Expressionsanalyse zeigte, dass G β 1 in relevanten Mengen in neuronalen Zelltypen exprimiert wird. Darüber hinaus wurden in funktionellen Untersuchungen mittels eines Biolumineszenz Resonanzenergietransfer (BRET)-Assays, Veränderungen in der Signaltransduktion über den Dopamin Typ 1-Rezeptor nachgewiesen (Lohmann et al. *Hum Mol Genet* 2017). Mittlerweile ist *GNB1* mit rund 50 publizierten Fällen ein etabliertes Krankheitsgen.

Bei der genetischen Ursachensuche im Falle eines Patienten mit isolierter generalisierter Dystonie stellte sich die Variante c.1430T>A, p.M477K im Gen *TBC1D9B* als am überzeugendsten dar. *TBC1D9B* codiert für das Mitglied 9B der TBC 1-Domänen-Protein-Familie. Das Protein ist in vesikuläre Transport-Prozesse in Interaktion mit Rab-Proteinen involviert. Interessanterweise sind bereits eine Reihe von Rab-Proteinen und mit diesen interagierende Proteine mit neurologischen Erkrankungsbildern und Syndromen assoziiert, die zum Teil auch Bewegungsstörungen umfassen. Bisher konnte jedoch kein zweiter Patient mit *TBC1D9B*-Mutation und einem Krankheitsbild, das dem des hier untersuchten Indexpatienten ähnelt, gefunden werden. Somit fehlt eine unabhängige Bestätigung und die Relevanz von Varianten im *TBC1D9B*-Gen in der Pathogenese von Dystonie-Erkrankungen verbleibt zunächst unklar.

In der Gesamtschau hat sich auch im Rahmen meiner Promotionsarbeit gezeigt, dass das Verfahren der Exom-Sequenzierung eine wirkungsvolle Methode zur Detektion von neuen Krankheitsgenen ist und hat zumindest in einem Fall die sichere Identifikation der genetischen Ursache bei einer Patientin mit Dystonie-Erkrankung ermöglicht. Weitere (funktionelle) Untersuchungen sowie ein weltweiter Abgleich von Kandidatengenen (über Plattformen wie GeneMatcher) wird möglicherweise die Rolle der hier identifizierten weiteren Kandidatengene in der Pathogenese von Dystonien im Laufe der nächsten Jahre bestätigen und so die Diagnoserate bei Patienten und deren Behandlung weiter verbessern.

6 Literaturverzeichnis

- Abraham KP, Salinas AG, Lovinger DM (2017) Alcohol and the Brain: Neuronal Molecular Targets, Synapses, and Circuits. *Neuron* 96, 1223–1238
- Acuna-Hidalgo R, Veltman JA, Hoischen A (2016) New insights into the generation and role of de novo mutations in health and disease. *Genome Biol* 17, 241
- Agoglia AE, Sharko AC, Psilos KE, Holstein SE, Reid GT, Hodge CW (2015) Alcohol alters the activation of ERK1/2, a functional regulator of binge alcohol drinking in adult C57BL/6J mice. *Alcohol Clin Exp Res* 39, 463–475
- Albanese A (2003) The clinical expression of primary dystonia. *J Neurol* 250, 1145–1151
- Albanese A, Lalli S (2009) Is this dystonia? *Mov Disord* 24, 1725–1731
- Albanese A, Bhatia K, Bressman SB, DeLong MR, Fahn S, Fung VSC, Hallett M, Jankovic J, Jinnah HA, Klein C, Lang AE, Mink JW, Teller JK (2013) Phenomenology and classification of dystonia: a consensus update. *Mov Disord* 28, 863–873
- Ananth AL, Robichaux-Viehoever A, Kim Y-M, Hanson-Kahn A, Cox R, Enns GM, Strober J, Willing M, Schlaggar BL, Wu YW, Bernstein JA (2016) Clinical Course of Six Children With GNAO1 Mutations Causing a Severe and Distinctive Movement Disorder. *Pediatr Neurol* 59, 81–84
- Andersson R, Gebhard C, Miguel-Escalada I, Hoof I, Bornholdt J, Boyd M, Chen Y, Zhao X, Schmidl C, Suzuki T, Ntini E, Arner E, Valen E, Li K, Schwarzfischer L, Glatz D, Raithel J, Lilje B, Rapin N, Bagger FO, Jørgensen M, Andersen PR, Bertin N, Rackham O, Burroughs AM, Baillie JK, Ishizu Y, Shimizu Y, Furuhashi E, Maeda S, Negishi Y, Mungall CJ, Meehan TF, Lassmann T, Itoh M, Kawaji H, Kondo N, Kawai J, Lennartsson A, Daub CO, Heutink P, Hume DA, Jensen TH, Suzuki H, Hayashizaki Y, Müller F, Forrest ARR, Carninci P, Rehli M, Sandelin A (2014) An atlas of active enhancers across human cell types and tissues. *Nature* 507, 455–461
- Asmus F, Zimprich A, Tezenas Du Montcel S, Kabus C, Deuschl G, Kupsch A, Ziemann U, Castro M, Kühn AA, Strom TM, Vidailhet M, Bhatia KP, Dürr A, Wood NW, Brice A, Gasser T (2002) Myoclonus-dystonia syndrome: epsilon-sarcoglycan mutations and phenotype. *Ann Neurol* 52, 489–492
- Asmus F, Salih F, Hjermand LE, Ostergaard K, Munz M, Kühn AA, Dupont E, Kupsch A, Gasser T (2005) Myoclonus-dystonia due to genomic deletions in the epsilon-sarcoglycan gene. *Ann Neurol* 58, 792–797
- Asmus F, Hjermand LE, Dupont E, Wagenstaller J, Haberlandt E, Munz M, Strom TM, Gasser T (2007) Genomic deletion size at the epsilon-sarcoglycan locus determines the clinical phenotype. *Brain* 130, 2736–2745
- Azzi A, Boscoboinik D, Hensley C (1992) The protein kinase C family. *Eur J Biochem* 208, 547–557
- Balestrini S, Milh M, Castiglioni C, Lüthy K, Finelli MJ, Verstreken P, Cardon A, Stražišar BG, Holder JL, Lesca G, Mancardi MM, Poulat AL, Repetto GM, Banka S, Bilo L, Birkeland LE, Bosch F, Brockmann K, Cross JH, Doummar D, Félix TM, Giuliano F, Hori M, Hüning I, Kayserili H, Kini U, Lees MM, Meenakshi G, Mewasingh L, Pagnamenta AT, Peluso S, Mey A, Rice GM, Rosenfeld JA, Taylor JC, Troester MM, Stanley CM, Ville D, Walkiewicz M, Falace A, Fassio A, Lemke JR, Biskup S, Tardif J, Ajeawung NF, Tolun A, Corbett M, Gecz J, Afawi Z, Howell KB, Oliver KL, Berkovic SF, Scheffer IE, de Falco FA, Oliver PL, Striano P, Zara F, Campeau PM, Sisodiya SM (2016) TBC1D24 genotype-phenotype correlation: Epilepsies and other neurologic features. *Neurology* 87, 77–85
- Barr CL, Misener VL (2016) Decoding the non-coding genome: elucidating genetic risk outside the coding genome. *Genes Brain Behav* 15, 187–204
- Beukers RJ, Booij J, Weisscher N, Zijlstra F, van Amelsvoort T a. MJ, Tijssen M a. J (2009) Reduced striatal D2 receptor binding in myoclonus-dystonia. *Eur J Nucl Med Mol Imaging* 36, 269–274
- Bick D, Jones M, Taylor SL, Taft RJ, Belmont J (2019) Case for genome sequencing in infants and children with rare, undiagnosed or genetic diseases. *J Med Genet* 0, 1-9
- Bolz HJ, Hoischen A (2019) NGS: Gestern, heute und morgen. *medgen* 31, 185–190

- Boycott KM, Rath A, Chong JX, Hartley T, Alkuraya FS, Baynam G, Brookes AJ, Brudno M, Carracedo A, den Dunnen JT, Dyke SOM, Estivill X, Goldblatt J, Gonthier C, Groft SC, Gut I, Hamosh A, Hieter P, Höhn S, Hurles ME, Kaufmann P, Knoppers BM, Krischer JP, Macek M, Matthijs G, Olry A, Parker S, Paschall J, Philippakis AA, Rehm HL, Robinson PN, Sham P-C, Stefanov R, Taruscio D, Unni D, Vanstone MR, Zhang F, Brunner H, Bamshad MJ, Lochmüller H (2017) International Cooperation to Enable the Diagnosis of All Rare Genetic Diseases. *Am J Hum Genet* 100, 695–705
- Brett M, Lai AHM, Ting T-W, Tan A-M, Foo R, Jamuar S, Tan E-C (2017) Acute lymphoblastic leukemia in a child with a de novo germline *gnb1* mutation. *Am J Med Genet A* 173, 550–552
- Brown MS, Goldstein JL (1999) A proteolytic pathway that controls the cholesterol content of membranes, cells, and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 11041–11048
- Bundesministerium für Justiz und Verbraucherschutz (2009). Gendiagnostikgesetz vom 31. Juli 2009 (BGBl. I S.2529, 3672), das zuletzt durch Artikel 2 Absatz 1 des Gesetzes vom 4. November 2016 (BGBl. I S. 2460) geändert worden ist. Abrufbar unter <http://www.gesetze-im-internet.de/gendg/> (letzter Zugriff: 18.11.2019).
- Camargo CHF, Camargos ST, Cardoso FEC, Teive HAG (2015) The genetics of the dystonias – a review based on the new classification of the dystonias. *Arq Neuropsiquiatr* 73, 350–358
- Camargo N, Smit AB, Verheijen MHG (2009) SREBPs: SREBP function in glia-neuron interactions. *FEBS J* 276, 628–636
- Chan P, Gonzalez-Maeso J, Ruf F, Bishop DF, Hof PR, Sealfon SC (2005) Epsilon-sarcoglycan immunoreactivity and mRNA expression in mouse brain. *J Comp Neurol* 482, 50–73
- Charlesworth G, Plagnol V, Holmström KM, Bras J, Sheerin U-M, Preza E, Rubio-Agusti I, Ryten M, Schneider SA, Stamelou M, Trabzuni D, Abramov AY, Bhatia KP, Wood NW (2012) Mutations in *ANO3* cause dominant craniocervical dystonia: ion channel implicated in pathogenesis. *Am J Hum Genet* 91, 1041–1050
- Cheng J, Lu Q, Song L, Ho MS (2018) α -Synuclein Trafficking in Parkinson's Disease: Insights From Fly and Mouse Models. *ASN Neuro* 10, 1-19
- Clark MM, Stark Z, Farnaes L, Tan TY, White S, Dimmock D, Kingsmore S (2018) Meta-analysis of the diagnostic and clinical utility of genome and exome sequencing and chromosomal microarray in children with suspected genetic diseases. *NPJ Genomic Med* 3, 16
- Clark MM, Hildreth A, Batalov S, Ding Y, Chowdhury S, Watkins K, Ellsworth K, Camp B, Kint CI, Yacoubian C, Farnaes L, Bainbridge MN, Beebe C, Braun JJA, Bray M, Carroll J, Cakici JA, Caylor SA, Clarke C, Creed MP, Friedman J, Frith A, Gain R, Gaughran M, George S, Gilmer S, Gleeson J, Gore J, Grunenwald H, Hovey RL, Janes ML, Lin K, McDonagh PD, McBride K, Mulrooney P, Nahas S, Oh D, Oriol A, Puckett L, Rady Z, Reese MG, Ryu J, Salz L, Sanford E, Stewart L, Sweeney N, Tokita M, Van Der Kraan L, White S, Wigby K, Williams B, Wong T, Wright MS, Yamada C, Schols P, Reynders J, Hall K, Dimmock D, Veeraraghavan N, Defay T, Kingsmore SF (2019) Diagnosis of genetic diseases in seriously ill children by rapid whole-genome sequencing and automated phenotyping and interpretation. *Sci Transl Med* 11, eaat6177
- Collins MA, Neafsey EJ, Mukamal KJ, Gray MO, Parks DA, Das DK, Korthuis RJ (2009) Alcohol in moderation, cardioprotection, and neuroprotection: epidemiological considerations and mechanistic studies. *Alcohol Clin Exp Res* 33, 206–219
- Collins MA, Neafsey EJ, Wang K, Achille NJ, Mitchell RM, Sivaswamy S (2010) Moderate ethanol preconditioning of rat brain cultures engenders neuroprotection against dementia-inducing neuroinflammatory proteins: possible signaling mechanisms. *Mol Neurobiol* 41, 420–425
- Corbeel L, Freson K (2008) Rab proteins and Rab-associated proteins: major actors in the mechanism of protein-trafficking disorders. *Eur J Pediatr* 167, 723–729
- Corbett MA, Bahlo M, Jolly L, Afawi Z, Gardner AE, Oliver KL, Tan S, Coffey A, Mulley JC, Dibbens LM, Simri W, Shalata A, Kivity S, Jackson GD, Berkovic SF, Gecz J (2010) A focal epilepsy and intellectual disability syndrome is due to a mutation in *TBC1D24*. *Am J Hum Genet* 87, 371–375
- Curiel J, Rodríguez Bey G, Takanohashi A, Bugiani M, Fu X, Wolf NI, Nmezi B, Schiffmann R, Bugaighis M, Pierson T, Helman G, Simons C, van der Knaap MS, Liu J, Padiath Q, Vanderver A (2017) *TUBB4A* mutations result in specific neuronal and oligodendrocytic defects that closely match clinically distinct phenotypes. *Hum Mol Genet* 26, 4506-4518

- Davis RJ (1993) The mitogen-activated protein kinase signal transduction pathway. *J Biol Chem* 268, 14553–14556
- De Pablo-Fernandez E, Warner TT (2017) Dystonia. *Br Med Bull* 123, 91–102
- DeBose-Boyd RA, Brown MS, Li WP, Nohturfft A, Goldstein JL, Espenshade PJ (1999) Transport-dependent proteolysis of SREBP: relocation of site-1 protease from Golgi to ER obviates the need for SREBP transport to Golgi. *Cell* 99, 703–712
- Deciphering Developmental Disorders Study (2015) Large-scale discovery of novel genetic causes of developmental disorders. *Nature* 519, 223–228
- Dentici ML, Sarkozy A, Pantaleoni F, Carta C, Lepri F, Ferese R, Cordeddu V, Martinelli S, Briuglia S, Digilio MC, et al. (2009) Spectrum of MEK1 and MEK2 gene mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome and genotype-phenotype correlations. *Eur J Hum Genet* 17, 733–740
- Doheny DO, Brin MF, Morrison CE, Smith CJ, Walker RH, Abbasi S, Müller B, Garrels J, Liu L, De Carvalho Aguiar P, Schilling K, Kramer P, De Leon D, Raymond D, Saunders-Pullman R, Klein C, Bressman SB, Schmand B, Tijssen M a. J, Ozelius L, Silverman JM (2002) Phenotypic features of myoclonus-dystonia in three kindreds. *Neurology* 59, 1187–1196
- Domingo A, Erro R, Lohmann K (2016) Novel Dystonia Genes: Clues on Disease Mechanisms and the Complexities of High-Throughput Sequencing. *Mov Disord* 31, 471–477
- du Montcel ST, Clot F, Vidailhet M, Roze E, Damier P, Jedynak CP, Camuzat A, Lagueny A, Vercueil L, Doummar D, Guyant-Maréchal L, Houeto J, Ponsot G, Thobois S, Cournelle M, Durr A, Durif F, Echenne B, Hannequin D, Tranchant C, Brice A (2006) Epsilon sarcoglycan mutations and phenotype in French patients with myoclonic syndromes. *J Med Genet* 43, 394–400
- Dulovic M, Schäffer E, Leypoldt F, Balck A, Schaake S, Hinrichs F, Kirchner H, Brüggemann N, Berg D, Lohmann K (2018) A Klinefelter patient with an additional mitochondrial mutation: Implications for genotype-driven treatment and mitochondrial mutational load in different tissues and family members. *Parkinsonism Relat Disord* 54, 116–118
- Endo W, Ikemoto S, Togashi N, Miyabayashi T, Nakajima E, Hamano S-I, Shibuya M, Sato R, Takezawa Y, Okubo Y, Inui T, Kato M, Sengoku T, Ogata K, Hamanaka K, Mizuguchi T, Miyatake S, Nakashima M, Matsumoto N, Haginoya K (2019) Phenotype-genotype correlations in patients with GNB1 gene variants, including the first three reported Japanese patients to exhibit spastic diplegia, dyskinetic quadriplegia, and infantile spasms. *Brain Dev*, doi.org/10.1016/j.braindev.2019.10.006 (Online-Veröffentlichung am 14.11.2019 vor Zeitschriften-Druck)
- Erro R, Hersheson J, Ganos C, Mencacci NE, Stamelou M, Batla A, Thust SC, Bras JM, Guerreiro RJ, Hardy J, Quinn NP, Houlden H, Bhatia KP (2015) H-ABC syndrome and DYT4: Variable expressivity or pleiotropy of TUBB4 mutations? *Mov Disord* 30, 828–833
- Esapa CT, Waite A, Locke M, Benson MA, Kraus M, McIlhinney RAJ, Sillitoe RV, Beesley PW, Blake DJ (2007) SGCE missense mutations that cause myoclonus-dystonia syndrome impair epsilon-sarcoglycan trafficking to the plasma membrane: modulation by ubiquitination and torsinA. *Hum Mol Genet* 16, 327–342
- Ettinger AJ, Feng G, Sanes JR (1997) ϵ -Sarcoglycan, a Broadly Expressed Homologue of the Gene Mutated in Limb-Girdle Muscular Dystrophy 2D. *J Biol Chem* 272, 32534–32538
- Fader CM, Sánchez D, Furlán M, Colombo MI (2008) Induction of autophagy promotes fusion of multivesicular bodies with autophagic vacuoles in k562 cells. *Traffic* 9, 230–250
- Falace A, Filipello F, La Padula V, Vanni N, Madia F, De Pietri Tonelli D, de Falco FA, Striano P, Dagna Bricarelli F, Minetti C, Benfenati F, Fassio A, Zara F (2010) TBC1D24, an ARF6-Interacting Protein, Is Mutated in Familial Infantile Myoclonic Epilepsy. *Am J Hum Genet* 87, 365–370
- Fogel BL (2018) Genetic and genomic testing for neurologic disease in clinical practice. *Handb Clin Neurol* 147, 11–22
- Ford CE, Skiba NP, Bae H, Daaka Y, Reuveny E, Shekter LR, Rosal R, Weng G, Yang C-S, Iyengar R, Miller RJ, Jan LY, Lefkowitz RJ, Hamm HE (1998) Molecular Basis for Interactions of G Protein $\beta\gamma$ Subunits with Effectors. *Science* 280, 1271–1274

- Fuchs T, Saunders-Pullman R, Masuho I, Luciano MS, Raymond D, Factor S, Lang AE, Liang T-W, Trosch RM, White S, Ainehsazan E, Hervé D, Sharma N, Ehrlich ME, Martemyanov KA, Bressman SB, Ozelius LJ (2013) Mutations in GNAL cause primary torsion dystonia. *Nat Genet* 45, 88–92
- Fukuda M (2011) TBC proteins: GAPs for mammalian small GTPase Rab? *Biosci Rep* 31, 159–168
- Fukuda T, Hiraide T, Yamoto K, Nakashima M, Kawai T, Yanagi K, Ogata T, Saito H (2019) Exome reports A de novo GNB2 variant associated with global developmental delay, intellectual disability, and dysmorphic features. *Eur J Med Genet*, 103804
- Gallo LI, Liao Y, Ruiz WG, Clayton DR, Li M, Liu Y-J, Jiang Y, Fukuda M, Apodaca G, Yin X-M (2014) TBC1D9B functions as a GTPase-activating protein for Rab11a in polarized MDCK cells. *Mol Biol Cell* 25, 3779–3797
- Gao Y, Wilson GR, Stephenson SEM, Bozaoglu K, Farrer MJ, Lockhart PJ (2018) The emerging role of Rab GTPases in the pathogenesis of Parkinson's disease. *Mov Disord* 33, 196–207
- García DE, Li B, García-Ferreiro RE, Hernández-Ochoa EO, Yan K, Gautam N, Catterall WA, Mackie K, Hille B (1998) G-protein beta-subunit specificity in the fast membrane-delimited inhibition of Ca²⁺ channels. *J Neurosci* 18, 9163–9170
- Geyer HL, Bressman SB (2006) The diagnosis of dystonia. *Lancet Neurol* 5, 780–790
- Gilissen C, Hoischen A, Brunner HG, Veltman JA (2012) Disease gene identification strategies for exome sequencing. *Eur J Hum Genet* 20, 490–497
- Gordon SL, Cousin MA (2016) The iTRAPs: Guardians of Synaptic Vesicle Cargo Retrieval During Endocytosis. *Front Synaptic Neurosci* 8, 1
- Grabarek Z (2011) Insights into modulation of calcium signaling by magnesium in calmodulin, troponin C and related EF-hand proteins. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1813, 913–921
- Grabowski M, Zimprich A, Lorenz-Depiereux B, Kalscheuer V, Asmus F, Gasser T, Meitinger T, Strom TM (2003) The epsilon-sarcoglycan gene (SGCE), mutated in myoclonus-dystonia syndrome, is maternally imprinted. *Eur J Hum Genet* 11, 138–144
- Grünewald A, Djarmati A, Lohmann-Hedrich K, Farrell K, Zeller JA, Allert N, Papengut F, Petersen B, Fung V, Sue CM, O'Sullivan D, Mahant N, Kupsch A, Chuang RS, Wiegers K, Pawlack H, Hagenah J, Ozelius LJ, Stephani U, Schuit R, Lang AE, Volkman J, Münchau A, Klein C (2008) Myoclonus-dystonia: significance of large SGCE deletions. *Hum Mutat* 29, 331–332
- Grütz K, Seibler P, Weissbach A, Lohmann K, Carlisle FA, Blake DJ, Westenberger A, Klein C, Grünewald A (2017) Faithful SGCE imprinting in iPSC-derived cortical neurons: an endogenous cellular model of myoclonus-dystonia. *Sci Rep* 7, 41156
- Guan KL (1994) The mitogen activated protein kinase signal transduction pathway: from the cell surface to the nucleus. *Cell Signal* 6, 581–589
- Hampton RY (2000) Cholesterol homeostasis: ESCAPE from the ER. *Curr Biol* 10, R298-301
- Handley MT, Morris-Rosendahl DJ, Brown S, Macdonald F, Hardy C, Bem D, Carpanini SM, Borck G, Martorell L, Izzi C, Faravelli F, Accorsi P, Pinelli L, Basel-Vanagaite L, Peretz G, Abdel-Salam GMH, Zaki MS, Jansen A, Mowat D, Glass I, Stewart H, Mancini G, Lederer D, Roscioli T, Giuliano F, Plomp AS, Rolfs A, Graham JM, Seemanova E, Poo P, García-Cazorla A, Edery P, Jackson IJ, Maher ER, Aligianis IA (2013) Mutation spectrum in RAB3GAP1, RAB3GAP2, and RAB18 and genotype-phenotype correlations in warburg micro syndrome and Martsolf syndrome. *Hum Mutat* 34, 686–696
- Hansson AC, Rimondini R, Neznanova O, Sommer WH, Heilig M (2008) Neuroplasticity in brain reward circuitry following a history of ethanol dependence. *Eur J Neurosci* 27, 1912–1922
- Hebert E, Borngreber F, Schmidt A, Rakovic A, Brænne I, Weissbach A, Hampf J, Vollstedt E-J, Größler L, Schaake S, Müller M, Manzoor H, Jabusch H-C, Alvarez-Fischer D, Kasten M, Kostic VS, Gasser T, Zeuner KE, Kim H-J, Jeon B, Bauer P, Altenmüller E, Klein C, Lohmann K (2017) Functional Characterization of Rare RAB12 Variants and Their Role in Musician's and Other Dystonias. *Genes* 8, 276

- Hedrich K, Meyer E-M, Schüle B, Kock N, de Carvalho Aguiar P, Wiegers K, Koelman JH, Garrels J, Dürr R, Liu L, Schwinger E, Ozelius LJ, Landwehrmeyer B, Stoessl AJ, Tijssen M a. J, Klein C (2004) Myoclonus-dystonia: detection of novel, recurrent, and de novo SGCE mutations. *Neurology* 62, 1229–1231
- Helassa N, Antonyuk SV, Lian L-Y, Haynes LP, Burgoyne RD (2017) Biophysical and functional characterization of hippocalcin mutants responsible for human dystonia. *Hum Mol Genet* 26, 2426–2435
- Hemati P, Revah-Politi A, Bassan H, Petrovski S, Bilancia CG, Ramsey K, Griffin NG, Bier L, Cho MT, Rosello M, Lynch SA, Colombo S, Weber A, Haug M, Heinzen EL, Sands TT, Narayanan V, Primiano M, Aggarwal VS, Millan F, Sattler-Holtrop SG, Caro-Llopis A, Pillar N, Baker J, Freedman R, Kroes HY, Sacharow S, Stong N, Lapunzina P, Schneider MC, Mendelsohn NJ, Singleton A, Loik Ramey V, Wou K, Kuzminsky A, Monfort S, Weiss M, Doyle S, Iglesias A, Martinez F, Mckenzie F, Orellana C, van Gassen KLI, Palomares M, Bazak L, Lee A, Bircher A, Basel-Vanagaite L, Hafström M, Houge G, C4RCD Research Group, DDD study, Goldstein DB, Anyane-Yeboah K (2018) Refining the phenotype associated with GNB1 mutations: Clinical data on 18 newly identified patients and review of the literature. *Am J Med Genet A* 176, 2259–2275
- Hermey G (2011) Molekularbiologische Techniken. In: Hermey G, Mahlke C, Schwake M, Sommer T (Hrsg.): *Der Experimentator: Neurowissenschaften*. 1. Aufl., 7–33, Springer Spektrum, Wiesbaden
- Hersheson J, Mencacci NE, Davis M, MacDonald N, Trabzuni D, Ryten M, Pittman A, Paudel R, Kara E, Fawcett K, Plagnol V, Bhatia KP, Medlar AJ, Stanescu HC, Hardy J, Kleta R, Wood NW, Houlden H (2013) Mutations in the Autoregulatory Domain of β -Tubulin 4a Cause Hereditary Dystonia. *Ann Neurol* 73, 546–553
- Hintzsche JD, Robinson WA, Tan AC (2016) A Survey of Computational Tools to Analyze and Interpret Whole Exome Sequencing Data. *Int J Genomics* 2016, 7983236
- Hjermind LE, Vissing J, Asmus F, Krag T, Lochmüller H, Walter MC, Erdal J, Blake DJ, Nielsen JE (2008) No muscle involvement in myoclonus-dystonia caused by epsilon-sarcoglycan gene mutations. *Eur J Neurol* 15, 525–529
- Hoshi M, Ohta K, Gotoh Y, Mori A, Murofushi H, Sakai H, Nishida E (1992) Mitogen-activated-protein-kinase-catalyzed phosphorylation of microtubule-associated proteins, microtubule-associated protein 2 and microtubule-associated protein 4, induces an alteration in their function. *Eur J Biochem* 203, 43–52
- Howard RJ, Slesinger PA, Davies DL, Das J, Trudell JR, Harris RA (2011) Alcohol-binding sites in distinct brain proteins: the quest for atomic level resolution. *Alcohol Clin Exp Res* 35, 1561–1573
- Huang C, Jacobson K, Schaller MD (2004) MAP kinases and cell migration. *J Cell Sci* 117, 4619–4628
- Hundle B, McMahon T, Dadgar J, Messing RO (1995) Overexpression of epsilon-protein kinase C enhances nerve growth factor-induced phosphorylation of mitogen-activated protein kinases and neurite outgrowth. *J Biol Chem* 270, 30134–30140
- Hussain NK, Yamabhai M, Bhakar AL, Metzler M, Ferguson SSG, Hayden MR, McPherson PS, Kay BK (2003) A Role for Epsin N-terminal Homology/AP180 N-terminal Homology (ENTH/ANTH) Domains in Tubulin Binding. *J Biol Chem* 278, 28823–28830
- Hynes TR, Tang L, Mervine SM, Sabo JL, Yost EA, Devreotes PN, Berlot CH (2004) Visualization of G protein betagamma dimers using bimolecular fluorescence complementation demonstrates roles for both beta and gamma in subcellular targeting. *J Biol Chem* 279, 30279–30286
- Irani BG, Donato J, Olson DP, Lowell BB, Sacktor TC, Reyland ME, Tolson KP, Zinn AR, Ueta Y, Sakata I, Zigman JM, Elias CF, Clegg DJ (2010) Distribution and neurochemical characterization of protein kinase C-theta and -delta in the rodent hypothalamus. *Neuroscience* 170, 1065–1079
- Jones HF, Morales-Briceño H, Barwick K, Lewis J, Sanchis-Juan A, Raymond FL, Stewart K, Waugh M-C, Mahant N, Kurian MA, Dale RC, Mohammad SS (2019) Myoclonus-dystonia caused by GNB1 mutation responsive to deep brain stimulation. *Mov Disord* 34, 1079–1080
- Kaempfer N, Maritzen T (2017) Safeguards of Neurotransmission: Endocytic Adaptors as Regulators of Synaptic Vesicle Composition and Function. *Front Cell Neurosci* 11, 320

- Khandelwal P, Prakasam HS, Clayton DR, Ruiz WG, Gallo LI, Roekel D van, Lukianov S, Peränen J, Goldenring JR, Apodaca G (2013) A Rab11a-Rab8a-Myo5B network promotes stretch-regulated exocytosis in bladder umbrella cells. *Mol Biol Cell* 24, 1007–1019
- Kinugawa K, Vidailhet M, Clot F, Apartis E, Grabli D, Roze E (2009) Myoclonus-dystonia: An update. *Mov Disord* 24, 479–489
- Klein C, Fahn S (2013) Translation of Oppenheim’s 1911 paper on dystonia. *Mov Disord* 28, 851–862
- Klein C, Schilling K, Saunders-Pullman RJ, Garrels J, Breakefield XO, Brin MF, deLeon D, Doheny D, Fahn S, Fink JS, Forsgren L, Friedman J, Frucht S, Harris J, Holmgren G, Kis B, Kurlan R, Kyllerman M, Lang AE, Leung J, Raymond D, Robshaw JD, Sanner G, Schwinger E, Tabamo RE, Tagliati M, Vieregge P, Wahlström J, Wendt KJ, Kramer PL, Bressman SB, Ozelius LJ (2000) A Major Locus for Myoclonus-Dystonia Maps to Chromosome 7q in Eight Families. *Am J Hum Genet* 67, 1314–1319
- Koboldt DC, Ding L, Mardis ER, Wilson RK (2010) Challenges of sequencing human genomes. *Brief Bioinform* 11, 484–498
- Koo SJ, Puchkov D, Haucke V (2011) AP180 and CALM. *Cell Logist* 1, 168–172
- Kwon JY, Hong M, Choi MS, Kang S, Duke K, Kim S, Lee S, Lee J (2004) Ethanol-response genes and their regulation analyzed by a microarray and comparative genomic approach in the nematode *Caenorhabditis elegans*. *Genomics* 83, 600–614
- Lambright DG, Sondek J, Bohm A, Skiba NP, Hamm HE, Sigler PB (1996) The 2.0 Å crystal structure of a heterotrimeric G protein. *Nature* 379, 311–319
- Lamers IJC, Reijnders MRF, Venselaar H, Kraus A, DDD Study, Jansen S, de Vries BBA, Houge G, Gradek GA, Seo J, Choi M, Chae JH, van der Burgt I, Pfundt R, Letteboer SJF, van Beersum SEC, Dusseljee S, Brunner HG, Doherty D, Kleefstra T, Roepman R (2017) Recurrent De Novo Mutations Disturbing the GTP/GDP Binding Pocket of RAB11B Cause Intellectual Disability and a Distinctive Brain Phenotype. *Am J Hum Genet* 101, 824–832
- Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O’Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, Tukiainen T, Birnbaum DP, Kosmicki JA, Duncan LE, Estrada K, Zhao F, Zou J, Pierce-Hoffman E, Berghout J, Cooper DN, Deflaux N, DePristo M, Do R, Flannick J, Fromer M, Gauthier L, Goldstein J, Gupta N, Howrigan D, Kiezun A, Kurki MI, Moonshine AL, Natarajan P, Orozco L, Peloso GM, Poplin R, Rivas MA, Ruano-Rubio V, Rose SA, Ruderfer DM, Shakir K, Stenson PD, Stevens C, Thomas BP, Tiao G, Tusie-Luna MT, Weisburd B, Won H-H, Yu D, Altshuler DM, Ardissino D, Boehnke M, Danesh J, Donnelly S, Elosua R, Florez JC, Gabriel SB, Getz G, Glatt SJ, Hultman CM, Kathiresan S, Laakso M, McCarroll S, McCarthy MI, McGovern D, McPherson R, Neale BM, Palotie A, Purcell SM, Saleheen D, Scharf JM, Sklar P, Sullivan PF, Tuomilehto J, Tsuang MT, Watkins HC, Wilson JG, Daly MJ, MacArthur DG (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536, 285–291
- Lesage S, Bras J, Cormier-Dequaire F, Condroyer C, Nicolas A, Darwent L, Guerreiro R, Majounie E, Federoff M, Heutink P, Wood NW, Gasser T, Hardy J, Tison F, Singleton A, Brice A, French Parkinson’s Disease Genetics Study Group (PDG) and the International Parkinson’s Disease Genomics Consortium (IPDGC) (2015) Loss-of-function mutations in RAB39B are associated with typical early-onset Parkinson disease. *Neurol Genet* 1, e9
- Lewohl JM, Wang L, Miles MF, Zhang L, Dodd PR, Harris RA (2000) Gene Expression in Human Alcoholism: Microarray Analysis of Frontal Cortex. *Alcohol Clin Exp Res* 24, 1873–1882
- Liao Y, Li M, Chen X, Jiang Y, Yin X-M (2018) Interaction of TBC1D9B with Mammalian ATG8 Homologues Regulates Autophagic Flux. *Sci Rep* 8, 13496
- Liegel RP, Handley MT, Ronchetti A, Brown S, Langemeyer L, Linford A, Chang B, Morris-Rosendahl DJ, Carpanini S, Posmyk R, Harthill V, Sheridan E, Abdel-Salam GMH, Terhal PA, Faravelli F, Accorsi P, Giordano L, Pinelli L, Hartmann B, Ebert AD, Barr FA, Aligianis IA, Sidjanin DJ (2013) Loss-of-function mutations in TBC1D20 cause cataracts and male infertility in blind sterile mice and Warburg micro syndrome in humans. *Am J Hum Genet* 93, 1001–1014
- Liu J, Lewohl JM, Dodd PR, Randall PK, Harris RA, Mayfield RD (2004) Gene expression profiling of individual cases reveals consistent transcriptional changes in alcoholic human brain. *J Neurochem* 90, 1050–1058
- Lodder EM, De Nittis P, Koopman CD, Wiszniewski W, Moura de Souza CF, Lahrouchi N, Guex N, Napolioni V, Tessadori F, Beekman L, Nannenberga EA, Boualla L, Blom NA, de Graaff W, Kamermans M, Cocciadiferro D, Malerba N, Mandriani B, Akdemir ZHC, Fish RJ, Eldomery MK, Ratbi I, Wilde AAM, de Boer T, Simonds WF, Neerman-Arbez M, Sutton VR, Kok F, Lupski JR, Reymond A, Bezzina CR, Bakkens J, Merla G (2016) GNB5 Mutations Cause an

6 Literaturverzeichnis

- Autosomal-Recessive Multisystem Syndrome with Sinus Bradycardia and Cognitive Disability. *Am J Hum Genet* 99, 704–710
- Lodowski DT, Pitcher JA, Capel WD, Lefkowitz RJ, Tesmer JGG (2003) Keeping G proteins at bay: a complex between G protein-coupled receptor kinase 2 and Gbetagamma. *Science* 300, 1256–1262
- Lohmann K, Klein C (2014) Next Generation Sequencing and the Future of Genetic Diagnosis. *Neurotherapeutics* 11, 699–707
- Lohmann K, Wilcox RA, Winkler S, Ramirez A, Rakovic A, Park J-S, Arns B, Lohnau T, Groen J, Kasten M, Brüggemann N, Hagenah J, Schmidt A, Kaiser FJ, Kumar KR, Zschiedrich K, Alvarez-Fischer D, Altenmüller E, Ferbert A, Lang AE, Münchau A, Kostic V, Simonyan K, Agzarian M, Ozelius LJ, Langeveld APM, Sue CM, Tijssen MAJ, Klein C (2013) Whispering dysphonia (DYT4 dystonia) is caused by a mutation in the TUBB4 gene. *Ann Neurol* 73, 537–545
- Lohmann K, Masuho I, Patil DN, Baumann H, Hebert E, Steinrücke S, Trujillano D, Skamangas NK, Dobricic V, Hüning I, Gillessen-Kaesbach G, Westenberger A, Savic-Pavicevic D, Münchau A, Oprea G, Klein C, Rolfs A, Martemyanov KA (2017) Novel GNB1 mutations disrupt assembly and function of G protein heterotrimers and cause global developmental delay in humans. *Hum Mol Genet* 26, 1078–1086
- Lüthy K, Mei D, Fischer B, De Fusco M, Swerts J, Paesmans J, Parrini E, Lubarr N, Meijer IA, Mackenzie KM, Lee W-T, Cittaro D, Aridon P, Schoovaerts N, Versées W, Verstreken P, Casari G, Guerrini R (2019) TBC1D24-TLDC-related epilepsy exercise-induced dystonia: rescue by antioxidants in a disease model. *Brain* 142, 2319–2335
- Mahler E, Johannsen J, Tsiakas K, Kloth K, Lütgen S, Mühlhausen C, Alhaddad B, Haack TB, Strom TM, Kortüm F, Meitinger T, Muntau AC, Santer R, Kubisch C, Lessel D, Denecke J, Hempel M (2019) Exom-Sequenzierung bei Kindern. *Dtsch Arztebl Int* 116, 197–204
- Majewski J, Schwartzentruber J, Lalonde E, Montpetit A, Jabado N (2011) What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 48, 580–589
- Malerba N, Towner S, Keating K, Squeo GM, Wilson W, Merla G (2018) A NGS-Targeted Autism/ID Panel Reveals Compound Heterozygous GNB5 Variants in a Novel Patient. *Front Genet* 9, 626
- Mantere T, Kersten S, Hoischen A (2019) Long-Read Sequencing Emerging in Medical Genetics. *Front Genet* 10, 426
- Marras C, Lang A, van de Warrenburg BP, Sue CM, Tabrizi SJ, Bertram L, Mercimek-Mahmutoglu S, Ebrahimi-Fakhari D, Warner TT, Durr A, Assmann B, Lohmann K, Kostic V, Klein C (2016) Nomenclature of genetic movement disorders: Recommendations of the international Parkinson and movement disorder society task force. *Mov Disord* 31, 436–457
- Masuho I, Martemyanov KA, Lambert NA (2015) Monitoring G protein activation in cells with BRET. *Methods Mol Biol* 1335, 107–113
- Mata IF, Jang Y, Kim C-H, Hanna DS, Dorschner MO, Samii A, Agarwal P, Roberts JW, Klepitskaya O, Shprecher DR, Chung KA, Factor SA, Espay AJ, Revilla FJ, Higgins DS, Litvan I, Leverenz JB, Yearout D, Inca-Martinez M, Martinez E, Thompson TR, Cholerton BA, Hu S-C, Edwards KL, Kim K-S, Zabetian CP (2015) The RAB39B p.G192R mutation causes X-linked dominant Parkinson's disease. *Mol Neurodegener* 10, 50
- Maurano MT, Humbert R, Rynes E, Thurman RE, Haugen E, Wang H, Reynolds AP, Sandstrom R, Qu H, Brody J, Shafer A, Neri F, Lee K, Kutayin T, Stehling-Sun S, Johnson AK, Canfield TK, Giste E, Diegel M, Bates D, Hansen RS, Neph S, Sabo PJ, Heimfeld S, Raubitschek A, Ziegler S, Cotsapas C, Sotoodehnia N, Glass I, Sunyaev SR, Kaul R, Stamatoyannopoulos JA (2012) Systematic Localization of Common Disease-Associated Variation in Regulatory DNA. *Science* 337, 1190–1195
- Meller N, Altman A, Isakov N (1998) New Perspectives on PKC ζ , a Member of the Novel Subfamily of Protein Kinase C. *Stem Cells* 16, 178–192
- Mellor H, Parker PJ (1998) The extended protein kinase C superfamily. *Biochem J* 332, 281–292
- Mencacci NE, Rubio-Agusti I, Zdebik A, Asmus F, Ludtmann MHR, Ryten M, Plagnol V, Hauser A-K, Bandres-Ciga S, Bettencourt C, Forabosco P, Hughes D, Soutar MMP, Peall K, Morris HR, Trabzuni D, Tekman M, Stanescu HC, Kleta R, Carecchio M, Zorzi G, Nardocci N, Garavaglia B, Lohmann E, Weissbach A, Klein C, Hardy J, Pittman AM,

- Foltynie T, Abramov AY, Gasser T, Bhatia KP, Wood NW (2015) A Missense Mutation in KCTD17 Causes Autosomal Dominant Myoclonus-Dystonia. *Am J Hum Genet* 96, 938–947
- Messing RO, Petersen PJ, Henrich CJ (1991) Chronic ethanol exposure increases levels of protein kinase C delta and epsilon and protein kinase C-mediated phosphorylation in cultured neural cells. *J Biol Chem* 266, 23428–23432
- Metzker ML (2010) Sequencing technologies - the next generation. *Nat Rev Genet* 11, 31–46
- Michalczyk I, Sikorski AF, Kotula L, Junghans RP, Dubielecka PM (2013) The emerging role of protein kinase C θ in cytoskeletal signaling. *J Leukoc Biol* 93, 319–327
- Mishra A, Hawkins RD (2017) Three-dimensional genome architecture and emerging technologies: looping in disease. *Genome Med* 9, 87
- Mitra S, Cheng KW, Mills GB (2011) Rab GTPases implicated in inherited and acquired disorders. *Semin Cell Dev Biol* 22, 57–68
- Monnerie H, Romer M, Jensen BK, Millar JS, Jordan-Sciutto KL, Kim SF, Grinspan JB (2017) Reduced sterol regulatory element-binding protein (SREBP) processing through site-1 protease (S1P) inhibition alters oligodendrocyte differentiation in vitro. *J Neurochem* 140, 53–67
- Morris SA, Schröder S, Plessmann U, Weber K, Ungewickell E (1993) Clathrin assembly protein AP180: primary structure, domain organization and identification of a clathrin binding site. *EMBO J* 12, 667–675
- Morris-Rosendahl DJ, Segel R, Born AP, Conrad C, Loeys B, Brooks SS, Müller L, Zeschnigk C, Botti C, Rabinowitz R, Uyanik G, Crocq M-A, Kraus U, Degen I, Faes F (2010) New RAB3GAP1 mutations in patients with Warburg Micro Syndrome from different ethnic backgrounds and a possible founder effect in the Danish. *Eur J Hum Genet* 18, 1100–1106
- Müller B, Hedrich K, Kock N, Dragasevic N, Svetel M, Garrels J, Landt O, Nitschke M, Pramstaller PP, Reik W, Schwinger E, Sperner J, Ozelius L, Kostic V, Klein C (2002) Evidence That Paternal Expression of the ϵ -Sarcoglycan Gene Accounts for Reduced Penetrance in Myoclonus-Dystonia. *Am J Hum Genet* 71, 1303–1311
- Nadanaka S, Okada T, Yoshida H, Mori K (2007) Role of disulfide bridges formed in the luminal domain of ATF6 in sensing endoplasmic reticulum stress. *Mol Cell Biol* 27, 1027–1043
- Nakamura K, Kodera H, Akita T, Shiina M, Kato M, Hoshino H, Terashima H, Osaka H, Nakamura S, Tohyama J, Kumada T, Furukawa T, Iwata S, Shiihara T, Kubota M, Miyatake S, Koshimizu E, Nishiyama K, Nakashima M, Tsurusaki Y, Miyake N, Hayasaka K, Ogata K, Fukuda A, Matsumoto N, Saitsu H (2013) De Novo Mutations in GNAO1, Encoding a G α Subunit of Heterotrimeric G Proteins, Cause Epileptic Encephalopathy. *Am J Hum Genet* 93, 496–505
- Nardocci N (2011) Myoclonus-dystonia syndrome. *Handb Clin Neurol* 100, 563–575
- Nardocci N, Zorzi G, Barzaghi C, Zibordi F, Ciano C, Ghezzi D, Garavaglia B (2008) Myoclonus-dystonia syndrome: Clinical presentation, disease course, and genetic features in 11 families. *Mov Disord* 23, 28–34
- Nimitvilai S, Arora DS, You C, McElvain M, Brodie MS (2013) Phorbol ester reduces ethanol excitation of dopaminergic neurons of the ventral tegmental area: involvement of protein kinase C theta. *Front Integr Neurosci* 7, 96
- Nishino H, Saito T, Wei R, Takano T, Tsutsumi K, Taniguchi M, Ando K, Tomomura M, Fukuda M, Hisanaga S-I (2019) The LMTK1-TBC1D9B-Rab11A cascade regulates dendritic spine formation via endosome trafficking. *J Neurosci* 39, 9491–9502
- Oligati S, Quadri M, Bonifati V (2016) Genetics of movement disorders in the next-generation sequencing era. *Mov Disord* 31, 458–470
- Ondo W (2016) Essential Tremor: What We Can Learn from Current Pharmacotherapy. *Tremor Other Hyperkinet Mov (N Y)* 6, 356
- Osyenko DS, Dovgan AV, Kononenko NI, Dromaretsky AV, Matvieienko M, Rybachuk OA, Zhang J, Korogod SM, Venkataraman V, Belan P (2019) Perturbed Ca²⁺-dependent signaling of DYT2 hippocalcin mutant as mechanism of autosomal recessive dystonia. *Neurobiol Dis* 132, 104529

- Pan X, Eathiraj S, Munson M, Lambright DG (2006) TBC-domain GTPases accelerate GTP hydrolysis by a dual-finger mechanism. *Nature* 442, 303–306
- Parker N (1985) Hereditary whispering dysphonia. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 48, 218–224
- Park-York M, Boghossian S, Oh H, York DA (2013) PKC θ expression in the amygdala regulates insulin signaling, food intake and body weight. *Obesity* 21, 755–764
- Passeri MJ, Cinaroglu A, Gao C, Sadler KC (2009) Hepatic steatosis in response to acute alcohol exposure in zebrafish requires sterol regulatory element binding protein activation. *Hepatology* 49, 443–452
- Peall KJ, Smith DJ, Kurian MA, Wardle M, Waite AJ, Hedderly T, Lin J-P, Smith M, Whone A, Pall H, White C, Lux A, Jardine P, Bajaj N, Lynch B, Kirov G, O’Riordan S, Samuel M, Lynch T, King MD, Chinnery PF, Warner TT, Blake DJ, Owen MJ, Morris HR (2013) SGCE mutations cause psychiatric disorders: clinical and genetic characterization. *Brain* 136, 294–303
- Peall KJ, Kurian MA, Wardle M, Waite AJ, Hedderly T, Lin J-P, Smith M, Whone A, Pall H, White C, Lux A, Jardine PE, Lynch B, Kirov G, O’Riordan S, Samuel M, Lynch T, King MD, Chinnery PF, Warner TT, Blake DJ, Owen MJ, Morris HR (2014) SGCE and myoclonus dystonia: motor characteristics, diagnostic criteria and clinical predictors of genotype. *J Neurol* 261, 2296–2304
- Peall KJ, Dijk JM, Saunders-Pullman R, Dreissen YEM, van Loon I, Cath D, Kurian MA, Owen MJ, Foncke EMJ, Morris HR, Gasser T, Bressman S, Asmus F, Tijssen MAJ (2015) Psychiatric disorders, myoclonus dystonia and SGCE: an international study. *Ann Clin Transl Neurol* 3, 4–11
- Petersen B-S, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A (2017) Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet* 18, 14
- Petrovski S, Küry S, Myers CT, Anyane-Yeboah K, Bialer M, Xia F, Hemati P, Riviello J, Mehaffey M, Besnard T, Becraft E, Wadley A, Politi AR, Colombo S, Zhu X, Ren Z, Andrews I, Dudding-Byth T, Schneider AL, Wallace G, University of Washington Center for Mendelian Genomics, Rosen ABI, Schelley S, Enns GM, Corre P, Dalton J, Mercier S, Latypova X, Schmitt S, Guzman E, Moore C, Bier L, Heinzen EL, Karachunski P, Shur N, Grebe T, Basinger A, Nguyen JM, Bézieau S, Wierenga K, Bernstein JA, Scheffer IE, Rosenfeld JA, Mefford HC, Isidor B, Goldstein DB (2016) Germline De Novo Mutations in GNB1 Cause Severe Neurodevelopmental Disability, Hypotonia, and Seizures. *Am J Hum Genet* 98, 1001–1010
- Phukan J, Albanese A, Gasser T, Warner T (2011) Primary dystonia and dystonia-plus syndromes: clinical characteristics, diagnosis, and pathogenesis. *Lancet Neurol* 10, 1074–1085
- Pignataro L, Miller AN, Ma L, Midha S, Protiva P, Herrera DG, Harrison NL (2007) Alcohol Regulates Gene Expression in Neurons via Activation of Heat Shock Factor 1. *J Neurosci* 27, 12957–12966
- Pignataro L, Varodayan FP, Tannenholz LE, Harrison NL (2009) The regulation of neuronal gene expression by alcohol. *Pharmacol Ther* 124, 324–335
- Pignataro L, Varodayan FP, Tannenholz LE, Protiva P, Harrison NL (2013) Brief alcohol exposure alters transcription in astrocytes via the heat shock pathway. *Brain Behav* 3, 114–133
- Radhakrishna H, Donaldson JG (1997) ADP-Ribosylation Factor 6 Regulates a Novel Plasma Membrane Recycling Pathway. *J Cell Biol* 139, 49–61
- Raymond D, Saunders-Pullman R, de Carvalho Aguiar P, Schule B, Kock N, Friedman J, Harris J, Ford B, Frucht S, Heiman GA, Jennings D, Doheny D, Brin MF, de Leon Brin D, Multhaupt-Buell T, Lang AE, Kurlan R, Klein C, Ozelius L, Bressman S (2008) Phenotypic spectrum and sex effects in eleven myoclonus-dystonia families with ϵ -sarcoglycan mutations. *Mov Disord* 23, 588–592
- Rehman AU, Santos-Cortez RLP, Morell RJ, Drummond MC, Ito T, Lee K, Khan AA, Basra MAR, Wasif N, Ayub M, Ali RA, Raza SI, Nickerson DA, Shendure J, Bamshad M, Riazuddin S, Billington N, Khan SN, Friedman PL, Griffith AJ, Ahmad W, Riazuddin S, Leal SM, Friedman TB (2014) Mutations in TBC1D24, a Gene Associated With Epilepsy, Also Cause Nonsyndromic Deafness DFNB86. *Am J Hum Genet* 94, 144–152
- Rentsch P, Witten D, Cooper GM, Shendure J, Kircher M (2019) CADD: predicting the deleteriousness of variants throughout the human genome. *Nucleic Acids Res* 47, D886–D894

- Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, Grody WW, Hegde M, Lyon E, Spector E, Voelkerding K, Rehm HL (2015) Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants: A Joint Consensus Recommendation of the American College of Medical Genetics and Genomics and the Association for Molecular Pathology. *Genet Med* 17, 405–424
- Rittiner JE, Caffall ZF, Hernández-Martinez R, Sanderson SM, Pearson JL, Tsukayama KK, Liu AY, Xiao C, Tracy S, Shipman MK, Hickey P, Johnson J, Scott B, Stacy M, Saunders-Pullman R, Bressman S, Simonyan K, Sharma N, Ozelius LJ, Cirulli ET, Calakos N (2016) Functional Genomic Analyses of Mendelian and Sporadic Disease Identify Impaired eIF2 α Signaling as a Generalizable Mechanism for Dystonia. *Neuron* 92, 1238–1251
- Sadnicka A, Kassavetis P, Pareés I, Meppelink AM, Butler K, Edwards M (2016) Task-specific dystonia: pathophysiology and management. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 87, 968–974
- Sakai J, Rawson RB, Espenshade PJ, Cheng D, Seegmiller AC, Goldstein JL, Brown MS (1998) Molecular identification of the sterol-regulated luminal protease that cleaves SREBPs and controls lipid composition of animal cells. *Mol Cell* 2, 505–514
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467
- Saunders-Pullman R, Shriberg J, Heiman G, Raymond D, Wendt K, Kramer P, Schilling K, Kurlan R, Klein C, Ozelius LJ, Risch NJ, Bressman SB (2002) Myoclonus dystonia: possible association with obsessive-compulsive disorder and alcohol dependence. *Neurology* 58, 242–245
- Scacheri CA, Scacheri PC (2015) Mutations in the non-coding genome. *Curr Opin Pediatr* 27, 659–664
- Schaefer SM, Vives Rodriguez A, Louis ED (2018) Brain circuits and neurochemical systems in essential tremor: insights into current and future pharmacotherapeutic approaches. *Expert Rev Neurother* 18, 101–110
- Schweitzer GG, Gan C, Bucelli RC, Wegner D, Schmidt RE, Shinawi M, Finck BN, Brookheart RT (2019) A mutation in Site-1 Protease is associated with a complex phenotype that includes episodic hyperCKemia and focal myoedema. *Mol Genet Genomic Med* 7, e733
- Seol W, Nam D, Son I (2019) Rab GTPases as Physiological Substrates of LRRK2 Kinase. *Exp Neurobiol* 28, 134–145
- Shendure J, Ji H (2008) Next-generation DNA sequencing. *Nat Biotechnol* 26, 1135–1145
- Shoji-Kasai Y, Itakura M, Kataoka M, Yamamori S, Takahashi M (2002) Protein kinase C-mediated translocation of secretory vesicles to plasma membrane and enhancement of neurotransmitter release from PC12 cells. *Eur J Neurosci* 15, 1390–1394
- Simons C, Wolf NI, McNeil N, Caldovic L, Devaney JM, Takanohashi A, Crawford J, Ru K, Grimmond SM, Miller D, Tonduti D, Schmidt JL, Chudnow RS, van Coster R, Lagae L, Kisler J, Sperner J, van der Knaap MS, Schiffmann R, Taft RJ, Vanderver A (2013) A De Novo Mutation in the β -Tubulin Gene TUBB4A Results in the Leukoencephalopathy Hypomyelination with Atrophy of the Basal Ganglia and Cerebellum. *Am J Hum Genet* 92, 767–773
- Slatko BE, Gardner AF, Ausubel FM (2018) Overview of Next Generation Sequencing Technologies. *Curr Protoc Mol Biol* 122, e59
- Sousa R, Tannery NH, Zhou S, Lafer EM (1992) Characterization of a novel synapse-specific protein. I. Developmental expression and cellular localization of the F1-20 protein and mRNA. *J Neurosci* 12, 2130–2143
- Steeves TD, Day L, Dykeman J, Jette N, Pringsheim T (2012) The prevalence of primary dystonia: a systematic review and meta-analysis. *Mov Disord* 27, 1789–1796
- Steinrücke S, Lohmann K, Domingo A, Rolfs A, Bäumer T, Spiegler J, Hartmann C, Münchau A (2016) Novel GNB1 missense mutation in a patient with generalized dystonia, hypotonia, and intellectual disability. *Neurol Genet* 2, e106
- Stenmark H (2009) Rab GTPases as coordinators of vesicle traffic. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10, 513–525

- Szczałuba K, Biernacka A, Szymańska K, Gasperowicz P, Kosińska J, Rydzanicz M, Płoski R (2018) Novel GNB1 de novo mutation in a patient with neurodevelopmental disorder and cutaneous mastocytosis: Clinical report and literature review. *Eur J Med Genet* 61, 157–160
- Takahashi S, Kubo K, Waguri S, Yabashi A, Shin H-W, Katoh Y, Nakayama K (2012) Rab11 regulates exocytosis of recycling vesicles at the plasma membrane. *J Cell Sci* 125, 4049–4057
- Tartaglia M, Gelb BD (2010) Disorders of dysregulated signal traffic through the RAS-MAPK pathway: phenotypic spectrum and molecular mechanisms. *Ann N Y Acad Sci* 1214, 99–121
- Thomas GM, Huganir RL (2004) MAPK cascade signalling and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci* 5, 173–183
- Tischfield MA, Engle EC (2010) Distinct α and β -tubulin isotypes are required for the positioning, differentiation, and survival of neurons: new support for the “multi-tubulin” hypothesis. *Biosci Rep* 30, 319–330
- Torres-Russotto D, Perlmutter JS (2008) Task-specific Dystonias. *Ann N Y Acad Sci* 1142, 179–199
- Tsujita K, Itoh T, Ijuin T, Yamamoto A, Shisheva A, Laporte J, Takenawa T (2004) Myotubularin Regulates the Function of the Late Endosome through the GRAM Domain-Phosphatidylinositol 3,5-Bisphosphate Interaction. *J Biol Chem* 279, 13817–13824
- Velho RV, De Pace R, Klünder S, Di Lorenzo G, Schweizer M, Bräulke T, Pohl S (2017) Site-1 protease and lysosomal homeostasis. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* 1864, 2162–2168
- Vissers LELM, Gilissen C, Veltman JA (2016) Genetic studies in intellectual disability and related disorders. *Nat Rev Genet* 17, 9–18
- Voelkerding KV, Dames SA, Durtschi JD (2009) Next-generation sequencing: from basic research to diagnostics. *Clin Chem* 55, 641–658
- Vulinovic F, Krajka V, Hausrat TJ, Seibler P, Alvarez-Fischer D, Madoev H, Park J-S, Kumar KR, Sue CM, Lohmann K, Kneussel M, Klein C, Rakovic A (2018) Motor protein binding and mitochondrial transport are altered by pathogenic TUBB4A variants. *Hum Mutat* 39, 1901–1915
- Wang X, Kumar R, Navarre J, Casanova JE, Goldenring JR (2000) Regulation of vesicle trafficking in madin-darby canine kidney cells by Rab11a and Rab25. *J Biol Chem* 275, 29138–29146
- Watanabe N, Itakaoka M, Seki Y, Morimoto T, Homma K, Miyamoto Y, Yamauchi J (2018) Dystonia-4 (DYT4)-associated TUBB4A mutants exhibit disorganized microtubule networks and inhibit neuronal process growth. *Biochem Biophys Res Commun* 495, 346–352
- Weissbach A, Kasten M, Grünewald A, Brüggemann N, Trillenber P, Klein C, Hagenah J (2013) Prominent psychiatric comorbidity in the dominantly inherited movement disorder myoclonus-dystonia. *Parkinsonism Relat Disord* 19, 422–425
- Weissbach A, Werner E, Bally JF, Tunc S, Löns S, Timmann D, Zeuner KE, Tadic V, Brüggemann N, Lang A, Klein C, Münchau A, Bäumer T (2017) Alcohol improves cerebellar learning deficit in myoclonus-dystonia: A clinical and electrophysiological investigation. *Ann Neurol* 82, 543–553
- Wetterstrand K (2019) DNA Sequencing Costs: Data from the NHGRI Genome Sequencing Program (GSP) Abrufbar unter: www.genome.gov/sequencingcostsdata. (Letzter Zugriff: 18.11.2019).
- Wilcox RA, Winkler S, Lohmann K, Klein C (2011) Whispering dysphonia in an Australian family (DYT4): A clinical and genetic reappraisal. *Mov Disord* 26, 2404–2408
- Wilda M, Ghaffari-Tabrizi N, Reiser I, Utermann G, Baier G, Hameister H (2001) Protein kinase C isoenzyme: selective expression pattern of protein kinase C- θ ; during mouse development. *Mech Dev* 103, 197–200
- Wilson GR, Sim JCH, McLean C, Giannandrea M, Galea CA, Riseley JR, Stephenson SEM, Fitzpatrick E, Haas SA, Pope K, Hogan KJ, Gregg RG, Bromhead CJ, Wargowski DS, Lawrence CH, James PA, Churchyard A, Gao Y, Phelan DG, Gillies G, Salce N, Stanford L, Marsh APL, Mignogna ML, Hayflick SJ, Leventer RJ, Delatycki MB, Mellick GD,

- Kalscheuer VM, D'Adamo P, Bahlo M, Amor DJ, Lockhart PJ (2014) Mutations in RAB39B cause X-linked intellectual disability and early-onset Parkinson disease with α -synuclein pathology. *Am J Hum Genet* 95, 729–735
- Yang J, Goldstein JL, Hammer RE, Moon Y-A, Brown MS, Horton JD (2001) Decreased lipid synthesis in livers of mice with disrupted Site-1 protease gene. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13607–13612
- Ye J, Rawson RB, Komuro R, Chen X, Davé UP, Prywes R, Brown MS, Goldstein JL (2000) ER stress induces cleavage of membrane-bound ATF6 by the same proteases that process SREBPs. *Mol Cell* 6, 1355–1364
- Yokoi F, Dang MT, Li J, Li Y (2006) Myoclonus, motor deficits, alterations in emotional responses and monoamine metabolism in epsilon-sarcoglycan deficient mice. *J Biochem* 140, 141–146
- Zech M, Jech R, Wagner M, Mantel T, Boesch S, Nocker M, Jochim A, Berutti R, Havránková P, Fečíková A, Kemlink D, Roth J, Strom TM, Poewe W, Růžička E, Haslinger B, Winkelmann J (2017) Molecular diversity of combined and complex dystonia: insights from diagnostic exome sequencing. *Neurogenetics* 18, 195–205
- Zhang J, Chen J, Zeng Q, Zhang L, Tian X, Yang X, Yang Z, Wu Y, Wu X, Zhang Y (2019) Infantile epilepsy with multifocal myoclonus caused by TBC1D24 mutations. *Seizure* 69, 228–234
- Zhang K, Shen X, Wu J, Sakaki K, Saunders T, Rutkowski DT, Back SH, Kaufman RJ (2006) Endoplasmic reticulum stress activates cleavage of CREBH to induce a systemic inflammatory response. *Cell* 124, 587–599
- Zhang L, Yokoi F, Parsons DS, Standaert DG, Li Y (2012) Alteration of striatal dopaminergic neurotransmission in a mouse model of DYT11 myoclonus-dystonia. *PLoS One* 7, e33669
- Zheng CF, Guan KL (1993) Properties of MEKs, the kinases that phosphorylate and activate the extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem* 268, 23933–23939
- Zhou S, Sousa R, Tannery NH, Lafer EM (1992) Characterization of a novel synapse-specific protein. II. cDNA cloning and sequence analysis of the F1-20 protein. *J Neurosci* 12, 2144–2155
- Zhu X, Petrovski S, Xie P, Ruzzo EK, Lu Y-F, McSweeney KM, Ben-Zeev B, Nissenkorn A, Anikster Y, Oz-Levi D, Dhindsa RS, Hitomi Y, Schoch K, Spillmann RC, Heimer G, Marek-Yagel D, Tzadok M, Han Y, Worley G, Goldstein J, Jiang Y-H, Lancet D, Pras E, Shashi V, McHale D, Need AC, Goldstein DB (2015) Whole-exome sequencing in undiagnosed genetic diseases: interpreting 119 trios. *Genet Med* 17, 774–781
- Zimmermann H (1990) Neurotransmitter release. *FEBS Lett* 268, 394–399
- Zimprich A, Grabowski M, Asmus F, Naumann M, Berg D, Bertram M, Scheidtmann K, Kern P, Winkelmann J, Müller-Myhsok B, Riedel L, Bauer M, Müller T, Castro M, Meitinger T, Strom TM, Gasser T (2001) Mutations in the gene encoding epsilon-sarcoglycan cause myoclonus-dystonia syndrome. *Nat Genet* 29, 66–69

7 Anhang

In den nachfolgenden Tabellen 30 bis 39 sind die Sequenzen der im Rahmen dieser Promotionsarbeit verwendeten *Primer* aufgelistet. Die Tabellen 40 bis 51 zeigen die Ergebnisse des Vergleichs der Nukleotidfolge des Alkohol-responsiven Elements mit den Genen *MAP2K2*, *MAP4K3*, *MBTPS1*, *PRKCQ*, *SCFD2*, *SGCE*, *SNAP91* und *TUBB4A*.

7.1 Primerliste

Falls in der Spalte „PCR-Bedingungen/ Anmerkungen“ nicht anders angegeben, wurde jeweils ein Standard-PCR-Ansatz mit einem Volumen von 15 µl und den im Methodenteil in Tabelle 2 beschriebenen Komponenten eingesetzt. Ebenso wurden, wenn nicht abweichend aufgeführt, die in Tabelle 3 beschriebenen PCR-Konditionen angewandt. Die jeweiligen *Annealing*-Temperaturen der einzelnen verwendeten *Primer* sind in den folgenden Primertabellen aufgelistet.

7.1.1 Projekt: Alkohol-responsive Dystonie

Tabelle 30: Primer zur Sequenzierung des Gens SGCE.

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen	Länge des PCR-Produkts
SGCE_Ex1_F	5'-CTGATGCTGAACTGGCCAAG-3'	PCR-Ansatz (10 µl): H ₂ O: 2,15 µl Betaine: 0,75 µl DMSO: 0,75 µl dNTPs: 2,0 µl Taq-Puffer: 1,0 µl <i>Primer F</i> : 0,4 µl <i>Primer R</i> : 0,4 µl Taq: 0,05 µl DNA: 2,5 µl Annealing-Temperatur: 64°C	305 bp
SGCE_Ex1_R	5'-AGAGAGGCTGGTGCCCAAAG-3'		
SGCE_Ex2_F	5'-CACGAGGTTGTAAAACGACCTGAATTATCAAGGGCG-3'	PCR-Ansatz (10 µl): H ₂ O: 4,65 µl dNTPs: 2,0 µl Taq-Puffer: 1,0 µl <i>Primer F</i> : 0,4 µl <i>Primer R</i> : 0,4 µl Taq: 0,05 µl DNA: 1,5 µl Annealing-Temperatur: 58°C	335 bp
SGCE_Ex2_R	5'GGATAACAATTTACACAGGCCATTTGAAATAATGT-3'		
SGCE_Ex3_F	5'-AGACAGAATGTTTTGATTGAA-3'		285 bp
SGCE_Ex3_R	5'-CACACATATATGTATAGTTTTGCTC-3'		

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen	Länge des PCR-Produkts	
SGCE_Ex4_F	5'-TTCTCATTGCCAGAGAAGG-3'	PCR-Ansatz (10 µl): H ₂ O: 4,25 µl Betaine: 0,4 µl dNTPs: 2,0 µl Taq-Puffer: 1,0 µl Primer F: 0,4 µl Primer R: 0,4 µl Taq: 0,05 µl DNA: 1,5 µl Annealing-Temperatur: 56°C	339 bp	
SGCE_Ex4_R	5'-TCAGTTATATTAGGTATGTGGC-3'		306 bp	
SGCE_Ex5_F	5'-CTTCATTAAGATATGCATGC-3'		336 bp	
SGCE_Ex5_R	5'-ATAAGTTTGATAAGATCACCG-3'		349 bp	
SGCE_Ex6_F	5'-TAAATCCTGCTTTAAGGTGG-3'		PCR-Ansatz (10 µl): H ₂ O: 4,65 µl dNTPs: 2,0 µl Taq-Puffer: 1,0 µl Primer F: 0,4 µl Primer R: 0,4 µl Taq: 0,05 µl DNA: 1,5 µl Annealing-Temperatur: 59°C	309 bp
SGCE_Ex6_R	5'-TTATTCCTAAAAGCAGTTCAG-3'			296 bp
SGCE_Ex7_F	5'-AAGAATGCTTTAGTGTATCCAG-3'			250 bp
SGCE_Ex7_R	5'-TTGTTATCTTAGCAGGATCTC-3'			231 bp
SGCE_Ex8_F	5'-GACAATGTCAGCATTTCCAC-3'			
SGCE_Ex8_R	5'-GTTTTAGTTTCTACCCCTCT-3'			
SGCE_Ex9_F	5'-CAAATTGATGACCCATCAGGC-3'			
SGCE_Ex9_R	5'-CATGCATATTAATAATTATGGCTC-3'			
SGCE_Ex11_F	5'-CTGGGGTCATAGTTTACCCG-3'			
SGCE_Ex11_R	5'-ATTTGGTGAAGATAAAGCTTC-3'			
SGCE_Ex12_F	5'-GATGGAACTTTCTCCTTGCC-3'			
SGCE_Ex12_R	5'-CAACATGCATAACATATGCCAG-3'			

Anmerkung zur Benennung der *Primer*: Basierend auf Transkript ENST0000265735 decken die *Primer* (abweichend zu deren Benennung) SGCE_Ex11_F und _R das Exon 10 ab, SGCE_Ex12_F und _R das Exon 11 ab.

Tabelle 31: Primer zur Sequenzierung des Gens *TUBB4A*.

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen	Länge des PCR-Produkts
Tubb4a_x1_F	5'-GCC TCC TGG GGA CCT CAT T-3'	PCR-Ansatz für Tubb4a_x1 und Tubb4a_x2,3: H ₂ O: 4,9 µl DMSO: 0,6 µl Betaine 1 µl 10 x dNTPS: 0,3 µl 10 x Puffer: 1,5 µl Primer F 20µM: 0,8 µl Primer R 20µM: 0,8 µl Taq: 0,1 µl DNA: 5 µl Annealing-Temperatur für Tubb4a_x1: 60°C PCR-Konditionen für Tubb4a_x1: Schritt 1: 95°C: 5 Min. Schritt 2: 95°C: 30 Sek. Schritt 3: 60°C: 45 Sek. Schritt 4: 72°C: 1 Min.	262 bp
Tubb4a_x1_R	5'-GTC TCC GCC GCA TCT TCC-3'		612 bp
Tubb4a_x2,3_F	5'-CCT TCT TGC TGC CTC ATC CT-3'		

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen	Länge des PCR-Produkts
Tubb4a_x2,3_R	5'-CCT GTC CAC CCC ATC TCT G-3'	(Schritte 2-4: 35 x) Schritt 5: 72°C: 10 Min. In F-Richtung sequenzieren Annealing-Temperatur für Tubb4a_x2,3: 59°C Elongation (72°C) für 45 Sek. In F-Richtung sequenzieren	
Tubb4a_x4a_F	5'-TCC AGG TGG TGG AGA GAC AG-3'	PCR-Ansatz für Tubb4a_x4a und Tubb4a_x4b: H ₂ O: 4,53 µl DMSO: 1,4 µl Betaine 1 µl 10 x dNTPS: 0,3 µl 10 x Puffer: 1,5 µl <i>Primer F</i> 20 µM: 0,6 µl <i>Primer R</i> 20 µM: 0,6 µl Taq: 0,07 µl DNA: 5 µl	693 bp
Tubb4a_x4a_R	5'-TCT TGG CAT CGA ACA TCT GC-3'		
Tubb4a_x4b_F	5'-ACG GGG ACC TCA ACC ACC T -3'	Annealing-Temperatur für Tubb4a_x4a: 62°C Elongation (72°C) für 45 Sek. In R-Richtung sequenzieren	762 bp
Tubb4a_x4b_R	5'-GAA AGC GGG GCT CTA GGG T-3'	Annealing-Temperatur für Tubb4a_x4b: 62°C Elongation (72°C) für 45 Sek. In F-Richtung sequenzieren	

Sequenzansatz für alle TUBB4A-Exone (10 µl):

a.d.: 4,5 µl
DMSO: 0,5 µl
Betaine: 0,5 µl
5x Seq-Puffer: 1,5 µl
20 µM *Primer*: 0,5 µl
Term-Mix: 0,5 µl
Exo-Fast-Produkt: 2 µl

Sequenz-Programm für TUBB4A: ABI XL:

Step 1: 94°C: 5 min
Step 2: 94°C: 20 sec
Step 3: 60°C: 5 sec
Step 4: 60°C: 2 min
(Step 2-4: 25 x)
Step 5: 4°C: for ever

Tabelle 32: Primer zur Überprüfung von Kandidatengenegen bei der Erforschung von Alkohol-responsiven Dystonien.

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen/ Anmerkungen	Länge des PCR-Produkts
MBTPS1_Exon9_F	5'-GTGGACTTGCCAGAGTGAAG-3'	PCR-Ansatz mit 10 %-Betaine <i>Annealing</i> -Temperatur: 59°C Sequenzierung funktioniert nur in F-Richtung	443 bp
MBTPS1_Exon9_R	5'-CAGAAGCAGCTCATACAGTGTAG-3'		

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen/ Anmerkungen	Länge des PCR- Produkts
MBTPS1_Exon9_Rn	5'-CTGAATAACCTGCTGAT-3'	Nur zum Sequenzieren in R-Richtung benutzt	
MBTPS1_Exon13_F	5'-GCCATCGAGGATAAGCCT-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 56°C	304 bp
MBTPS1_Exon13_R	5'-GCCCTATTGCCACAGAA-3'	Deckt nicht das gesamte Exon ab	
MBTPS1_Exon13_F_kompl	5'-CCATCGAGGATAAGCCTATCTGTC-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 64°C	503 bp
MBTPS1_Exon13_R_kompl	5'-TACGTCCGAGGCAGTCCATAG-3'		
MAP4K3_Exon15_F	5'-ACAGGGAAATGCCATTTC-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 58°C	489 bp
MAP4K3_Exon15_R	5'-GTTTGACTCTCCATTTGCCCT-3'		
MAP4K3_Exon29_F	5'-ACCTCTACTGACACCAACACAAAC-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 60°C	379 bp
MAP4K3_Exon29_R	5'-CCCAGGTTCCAACCTCTGAA-3'		
ATR_Exon4_F	5'-CTTACCTCTGCATCTACCTCA-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 59°C	505 bp
ATR_Exon4_R	5'-GGCAAGAACTCTACTTTGG-3'		
ATR_Exon28_F	5'-AAGTGCATTACAGCTCGTGTGTA-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 59°C	294 bp
ATR_Exon28_R	5'-TGGAGCAAGACTCTCTGAACA-3'		
PRKCQ_Exon13_F	5'-CTGATGAATCGGGATGGTTC-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 63°C	494 bp
PRKCQ_Exon13_R	5'-GACGGGAGAATCTCTTGAAGC-3'		
PRKCQ_Exon17_F	5'-GGACACACAGCAATCCATTC-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 59°C	404 bp
PRKCQ_Exon17_R	5'-CTGCTCTGCTCCCTTTCAG-3'	Deckt nicht das gesamte Exon ab	
PRKCQ_Exon17_Fn	5'-GACACACAGCAATCCATTC-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 56°C	601 bp
PRKCQ_Exon17_Rn	5'-TGCACCTCAGAAGATAACG-3'		
SCFD2_Exon1_F	5'-GACTGCGGCAGATGATGTC-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 59°C	397 bp
SCFD2_Exon1_R	5'-CGTGTACTGTGGAGACTGTCAAAG-3'		
SCFD2_Exon8_F	5'-AGTCCTCCACCACTGAGAAC-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 59°C	549 bp
SCFD2_Exon8_R	5'-TTACCCGGGACTTGTAGC-3'		
SNAP91_Exon29_F	5'-GGTACTTCCCTCCTAGTT-3'	In F-Richtung sequenzieren	488 bp
SNAP91_Exon29_R	5'-CTTTGATATGTGTTCTGCC-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 57°C	
SNAP91_Exon11_F	5'-GATTAGGATGCAGGAGTACAG-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 58°C	479 bp
SNAP91_Exon11_R	5'-GGTTCCTTTGTTTAGGTG-3'		
MAP2K2_Exon7_F	5'-TTGGGGTGCTCACTGCTT-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 65°C	557 bp
MAP2K2_Exon7_R	5'-GGGAGGTAGAATTGCGTAACAG-3'		
MAP2K2_Exon3_F	5'-CATCGACTGCCTTGAGAAG-3'	<i>Annealing</i> -Temperatur: 62°C	592 bp
MAP2K2_Exon3_R	5'-TACGGCTGAGTCTGTTTC-3'		

7.1.2 Projekt: Trio-Exom-Ansatz Familie 1

Tabelle 33: Primer zur Sequenzierung von Kandidatengenomen bei Familie 1.

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen/ Anmerkungen	Länge des PCR- Produkt
AGMO_L8748F	5'-GTGAACAAAACCCTAAGGAG-3'	Annealing-Temperatur: 57°C	425 bp
AGMO_L8748R	5'-CCCCTGAACTCTGTACTTG-3'		
PRUNE_L8747F	5'-TGCTGCTGTGCAAAAGTGTG-3'	Annealing-Temperatur: 57°C	372 bp
PRUNE_L9748R	5'-TTGCTGGAGACGAAAAGGAAAC-3'		
GNB1_Exon7F	5'-AGGTACCTGTGTGCTCTG-3'	Annealing-Temperatur: 60°C	274 bp
GNB1_Exon7R	5'-GTTCTGTTACCTCCTTTC-3'		
PTPN13_Exon9_F	5'-CTCTCATGTTTCTATCACCTG-3'	Annealing-Temperatur: 60°C	193 bp
PTPN13_Exon9_R	5'-AAACTGGTCACTGGAA-3'		
PTPN13_Exon28_F	5'-ACTTTCAACCCTTGCTT-3'	Annealing-Temperatur: 60°C	485 bp
PTPN13_Exon28_R	5'-TCAGTATGGTGTGATGTCAGA-3'		

Tabelle 34: cDNA-Primer

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen	Länge des PCR- Produkts
GNB1_cDNA_Ex4F	5'-ACCCAGTGGGAAGAATCC-3'	Annealing-Temperatur: 56°C PCR-Ansatz: a.d. 7,23 µl dNTPs 3 µl Taq-Puffer 1,5 µl Primer F 0,6 µl Primer R 0,6 µl Taq 0,07 µl cDNA 2 µl	513 bp
GNB1_cDNA_Ex8R	5'-TGGCTGAAGCATCACAAG-3'		
Beta-Actin_F	5'-ATCTGGCACCACCTTCTACAAT GAGCTGCG-3'		838 bp
Beta-Actin_R	5'-CGTCATACTCCTGCTTGCTGATCCAC ATCTGC-3'		

Tabelle 35: Primer zur Sequenzierung aller GNB1-Exons.

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen/ Anmerkungen	Länge des PCR- Produkts
GNB1_Exon2_F	5'-GTACATCCTGGCCAACTA-3'	Annealing-Temperatur: 64°C Elongation bei 72°C für 45s	434 bp
GNB1_Exon2_R	5'-AGGGGTTTGACCGTGTTA-3'		
GNB1_Exon3_F	5'-AAGCCCCTCTATTTCTATG-3'	Annealing-Temperatur: 58°C	431 bp
GNB1_Exon3_R	5'-TTGGGTACTACTGGTTCTCTG-3'		
GNB1_Exon4_F	5'-ATGGCAGTGTCTTTTCAGC-3'	Annealing-Temperatur: 56°C	486 bp
GNB1_Exon4_R	5'-TACGGAAGGGGTTTCAGTG-3'		
GNB1_Exon5_F	5'-CCTGGTCCAGAGGAAGAGAC-3'	Annealing-Temperatur: 61°C	369 bp

GNB1_Exon5_R	5'-ACATGGGAGCACATAAGCC-3'		
GNB1_Exon6_F	5'-AGGGGAATGGCGTGAACAC-3'	Annealing-Temperatur: 64°C Elongation bei 72°C für 45s	575 bp
GNB1_Exon6_R	5'-CCATGTGCAGCACTGGACTT-3'		
GNB1_Exon7_F	5'-AGATGTCGAGAGCCAAGAT-3'	Annealing-Temperatur: 58°C In R-Richtung sequenzieren	629 bp
GNB1_Exon7_R	5'-CAGCCTTTGATGGGTCAAAC-3'		
GNB1_Exon8_F	5'-CGGGAGTTTTCTGTATCC-3'	Annealing-Temperatur: 56°C	592 bp
GNB1_Exon8_R	5'-GATCCCGTCATTCTGAAG-3'		
GNB1_Exon8_Fn	5'-TGTTACAGAGGAATGTGC-3'	Annealing-Temperatur: 56°C	451 bp
GNB1_Exon8_Rn	5'-CAGCCTTTGATGGGTCAAAC-3'		
GNB1_Exon9_F	5'-GAGCTGGGCCATCAGTTTG-3'	Annealing-Temperatur: 61°C	515 bp
GNB1_Exon9_R	5'-CCCAGCCCTCTGTTCTTACC-3'		
GNB1_Exon10_F	5'-GTGAAAAGAGGCAGAGAATC-3'	Annealing-Temperatur: 56°C	463 bp
GNB1_Exon10_R	5'-TCTTGTCCCATGAGAGATG-3'		

Tabelle 36: GNB1-Mutagenese-Primer.

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen
GNB1 c.A353G F	5'-ATGGAGCAAATGTTACCCAGGCCACCGCAGG-3'	Mutagenese-PCR: Pfu-Puffer: 2,5 µl dNTP-Mix: 0,6 µl Primer F: 1,3 µl Primer R: 1,3 µl Pfu-Polymerase: 0,6 µl a.d. 13,7 µl WT-Plasmid DNA: 5 µl (50 ng) (Ansatz: 25 µl)
GNB1 c.A353G R	5'-CCTGCGGTGGCCTGGGTAACATTTGCTCCAT-3'	
GNB1 c.C88T F	5'-TGATCTGAGAGAAAAGTTGCATCTGCACATGCTTTCC-3'	
GNB1 c.C88T R	5'-GGAAAGCATGTGCAGATGCAACTTTCTCTCAGATCA-3'	
GNB1 c.C154G F	5'-CAGGTGCCCCCAGTGTCTCC-3'	
GNB1 c.C154G R	5'-GGAGGACACTGGGGGGGCACCTG-3'	
GNB1 c.G191T F	5'-CCTGGAGTCTGTGACCCAGTGCATGGC-3'	
GNB1 c.G191T R	5'-GCCATGCACTGGGTACAGACTCCAGG-3'	
GNB1 c.A272G F	5'-GCAGAGGGATGGCGCGGACCTT GTTGGTG-3'	
GNB1 c.A272G R	5'-CACCAACAAGGTCCGCGCCATCCCTCTGC-3'	
GNB1 c.G274A F	5'-GCGCAGAGGGATGGTGTGGACCTT GTTGG-3'	
GNB1 c.G274A R	5'-CCAACAAGGTCCACACCATCCCTCTGCGC-3'	
GNB1 c.C280T F	5'-GAGGAGCGCAGAGAGATGGCGTGGACC-3'	
GNB1 c.C280T R	5'-GGTCCACGCCATCTCTCTGCGCTCTC-3'	
GNB1 c.G287T F	5'-GACCCAGGAGGAGAGCAGAGGGATGGC-3'	
GNB1 c.G287T R	5'-GCCATCCCTCTGCTCTCTCTGGGTC-3'	
GNB1 c.G316A F	5'-CCCAGAAGGGGTATATGCACAGGTCAT GACCCA-3'	
GNB1 c.G316A R	5'-TGGGTCATGACCTGTGCATATACCCT TCTGGG-3'	
GNB1 c.A1009C F	5'-GAGTTAGTTCAGATCTGGAGGAAGCTAT CCCAGG-3'	
GNB1 c.A1009C R	5'-CCTGGGATAGCTTCTCCAGATCTGGAAC TAACTC-3'	

Tabelle 37: Primer zur Einführung der Schnittstellen für die Restriktionsenzyme *KpnI* und *XhoI*.

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen/ Anmerkungen
GNB1 <i>KpnI</i> F	5'-GAAGAGCACTAAGGTACCAAGATGAGT GAG-3'	Ansatz Sequenz-PCR: H ₂ O: 5 µl Primer F: 1,25 µl Primer R: 1,25 µl 2 x Q5-Polymerase: 12,5 µl cDNA 5 µl Konditionen Sequenz-PCR: hotstart (Proben wurden erst reingestellt, als der Cycler auf 98°C hochgeheizt ist) Schritt 1: 98°C: 30 sec Schritt 2: 98°C: 10 sec Schritt 3: 55°C: 30 sec Schritt 4: 72°C: 45 sec (Schritte 2-4: 35 x) Schritt 5: 72°C: 5 min Kühlung: 4°C
GNB1 <i>XhoI</i> R	5'-CATGGCATCCTCGAGCTACTGGCG-3'	

Tabelle 38: Primer zur Sequenzierung des pcDNA-Vektors.

Name	Sequenz	PCR-Bedingungen
T7	5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3'	Ansatz Sequenz-PCR: 100 ng Plasmid-DNA (1µl) Primer: 1 µl Seq-Puffer: 1,5 µl Term.-Mix: 1 µl H ₂ O: 5,5 µl
BGHR	5'-TAG AAG GCA CAG TCG AGG-3'	

7.1.3 Projekt: Trio-Exom-Ansatz Familie 2

Tabelle 39: Primer zur Sequenzierung von Kandidatengenen bei Familie 2.

Name	Sequenz	PCR - Bedingungen	Länge des PCR- Produkts
TBC1D9B_ Exon9_ F	5'- GCTCCCGGCTGTGTGAAAG -3'	Annealing-Temperatur: 64°C	511 bp
TBC1D9B_ Exon9_ R	5'- GGACTCCAGGCCTCTGAAGG -3'		
FGF12_ Exon4_ F	5'-GCATTCCAGGCAAACCTCTC-3'	Annealing-Temperatur: 62°C	509 bp
FGF12_ Exon4_ R	5'-TCTCTGGGCTGAAGGTT-3'		

7.2 Sequenz des Venus-Plasmids

TACGCCCCCTATTGACGTCAATGACGGTAAATGGCCCCGCTGGCATTATGCCAGTACATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTG
GCAGTACATCTACGTATTAGTCATCGCTATTACCATGGTGATGCGGTTTTGGCAGTACATCAATGGGCGTGGATAGCGGTTTGA
CTCACGGGGATTTCCAAGTCTCCACCCATTGACGTCAATGGGAGTTTGTGGTGGCACAAAATCAACGGGACTTTCAAAAT
GTCGTAACAACCTCCGCCATTGACGCAAATGGGCGGTAGGCGGTACGGTGGGAGGTCTATAAGCAGAGCTCTCTGGCT
AACTAGAGAACCCACTGCTTACTGGCTTATCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGAGACCCAAGCTGGCTAGCGTTAAACT
TAAGCTTGGTACCGAGCTCGGATCCACC**ATG****GACAAGCAGAAGAACGGCATCAAGGCCAACTTCAAGATCCGCCACAACATC**
GAGGACGGCGGCGTGCAGCTCGCCGACCACTACCAGCAGAACACCCCATCGGCGACGGCCCGTGCTGCTGCCGACAA
CCACTACCTGAGCTACCAGTCCAACTGAGCAAAGACCCCAACGAGAAGCGCGATCACATGGTCTGCTGGAGTTCGTGACC
GCCGCCGGGATCACTCTCGGCATGGACGAGCTGTACAAG**GGCGGATCCGGTGGAGG****CAGTGAGCTTGACCAGTTACGGCA**
GGAGGCCGAGCAACTTAAGAACCAGATTCGAGACGCCAGGAAAGCATGTGCAGATGCAACTCTCTCAGATCACAAACAA
CATCGACCCAGTGGGAAGAATCCAATGCGCACGAGGAGGACACTGCGGGGGCACCTGGCCAAGATCTACGCCATGCACTG
GGGCACAGACTCCAGGCTTCTCGTCACTGCCTCGCAGGATGGTAAACTTATCATCTGGGACAGCTACACCACCAACAAGGTC
CACGCCATCCCTCTGCGCTCCTCTGGGTGATGACCTGTGCATATGCCCTTCTGGAACTATGTGGCCTGCGGTGGCCTGGA
TAACTTTGCTCCATTTACAATCTGAAAATCGTAGGGGAACGTGCGCGTGAGTCGTGAGCTGGCAGGACACACAGTTAC
CTGTCTGCTGCCGATTCTGGATGACAATCAGATCGTACCAGCTCTGGAGACACCACGTGTGCCTGTGGGACATCGAGA
CCGGCCAGCAGACGACCACGTTTACCGGACACACTGGAGATGTCATGAGCCTTCTCTTGTCTCTGACACCAGACTGTTTCTG
CTCTGGTGCTTGTGATGCTTCAGCCAACTCTGGGATGTGCGAGAAGGCATGTGCCGGCAGACCTTCACTGGCCACGAGTCT
GACATCAATGCCATTTGCTTCTTTCAAATGGCAATGCATTTGCCACTGGCTCAGACGACGCCACCTGCAGGCTGTTTACCT
TCGTGCTGACCAGGAGCTCATGACTTACTCCCATGACAACATCATCTGCGGGATCACCTCTGTCTCTTCTCAAGAGCGGGC
GCCTCCTCCTTGCTGGGTACGACGACTTCAACTGCAACGTCTGGGATGCACTCAAAGCCGACCGGGCAGGTGTCTTGGCTG
GGCATGACAACCCGCTCAGCTGCCTGGGCGTGACTGACGATGGCATGGCTGTGGCGACAGGGTCTGGGATAGCTTCTCA
AGATCTGGAACTA**ACTCGAGTCTAGAGGGCCGTTTAAACCCGCTGATCAGCCTCGACTGTGCCTTCTAGTTGCCAGCCATCT**
GTTGTTTGCCCCCTCCCGTGCCTTCTTGACCCTGGAAGGTGCCACTCCACTGTCTTTCTAATAAAAATGAGGAAATTGCA
TCGCATTGTCTGAGTAGGTGTCATTCTATTCTGGGGGTGGGGTGGGGCAGGACAGCAAGGGGGAGGATTGGGAAGACAA
TAGCAGGCATGCTGGGGATGCGGTGGGCTCTATGGCTTCTGA

Rot: Start- und Stop-Codon

Blau: mVenus 156-293

Gelb GSGGG linker

Grün: Gβ1 (NM_002074)

7.3 Übereinstimmungen mit der Sequenz des Alkohol-responsiven Elements

In den folgenden Tabellen sind die Treffer aufgeführt, die sich bei der Suche nach der Sequenz des Alkohol-responsiven Elements in den Genen *SGCE* und *TUBB4A* sowie den verschiedenen Kandidatengenen im Rahmen von Projekt 1 finden ließen. Innerhalb der codierenden Sequenz der einzelnen Gene sind Treffer mit bis zu drei Fehlpaarungen aufgeführt. Im Bereich von 5000 bp vor Translationsstart und bis zu 5000 bp nach Translationsende sind nur Treffer mit maximal zwei Fehlpaarungen angegeben. Positionen, an denen die gefundene Sequenz nicht mit der des ARE übereinstimmt, sind in roten Buchstaben geschrieben. Innerhalb der Sequenz des ARE „**tCTGcGTcTt**“ indizieren Großbuchstaben absolute Konservierung, während Kleinbuchstaben ein Maß an Degeneration an dieser Position angeben. Gelb unterlegte Sequenzen markieren solche Basenabfolgen, die nur an nicht konservierten d.h. degenerierten Positionen von dem Motiv des ARE abweichen.

Tabelle 40: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in der codierenden Sequenz der Gene *SGCE* und *TUBB4A*.

Gen	„Transkript“	Anzahl Nukleotide	Anzahl mismatches	Position	Sequenz
<i>SGCE</i>	CCDS5637	1314	3	62-72 913-923 923-933 1266-1276	CCTGCGT GTCC TCTG ATTCTTT TCTG CTTTTCA TCTG AGTCTGA
<i>SGCE</i>	CCDS47643	1389	3	62-72 913-923 923-933 1341-1351	CCTGCGT GTCC TCTG ATTCTTT TCTG CTTTTCA TCTG AGTCTGA
<i>SGCE</i>	CCDS75634	1191	3	62-72 90-800 800-810 1143-1153	CCTGCGT GTCC TCTG ATTCTTT TCTG CTTTTCA TCTG AGTCTGA
<i>SGCE</i>	CCDS47642	1356	3	62-72 913-923 923-933 1239-1249	CCTGCGT GTCC TCTG ATTCTTT TCTG CTTTTCA TCTG AGTCTGA
<i>TUBB4A</i>	CCDS12168	1335	3	73-83	TGTCGTC ACT

Tabelle 41: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in gegenläufiger Richtung (TCTCTGCGTCT) in der codierenden Sequenz der Gene *SGCE* und *TUBB4A*.

Gen	„Transkript“	Anzahl Nukleotide	Anzahl mismatches	Position	Sequenz
<i>SGCE</i>	CCDS5637	1314	2 3	925-935 552-562 1203-1213 1268-1278	TCTCTG CTTTT T CACTGCGCCA T GTCTGTGTGT AATCTGAGTCT
<i>SGCE</i>	CCDS47643	1389	2 3	925-935 552-562 1203-1213 1244-1254 1343-1353	TCTCTG CTTTT T CACTGCGCCA T GTCTGTGTGT T TGCTGCGTTT AATCTGAGTCT
<i>SGCE</i>	CCDS75634	1191	2 3	802-812 429-439 1080-1090 1145-1155	TCTCTG CTTTT T CACTGCGCCA T GTCTGTGTGT AATCTGAGTCT
<i>SGCE</i>	CCDS47642	1356	2 3	925-935 552-562 1176-1186 1241-1251	TCTCTG CTTTT T CACTGCGCCA T GTCTGTGTGT AATCTGAGTCT
<i>TUBB4A</i>	CCDS12168	1335	3	324-334 366-376 986-996 1227-1237	GCTCTGCGCCC TCT CGGCTCC GCTCAGCATCT TCT CGGCTCG

Tabelle 42: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements im Bereich von 5000 bp vor Translationsstart der Gene SGCE und TUBB4A.

Gen	Untersuchter Bereich (hg19)	Gesuchte Sequenz	Anzahl mismatches	Position (innerhalb des untersuchten Bereichs)	Gefundene Sequenz
SGCE	Chr7: 94,209,536- 94,214,536	TCTGCGTCTCT	2	1573-1583 4047-4057	TCTACCTCTCT TCTGTGTCTGT
SGCE	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	827-837 4045-4055	TCTATGTGTCT ACTCTGTGTCT
TUBB4A	Chr19: 6,489,330 – 6,494,330	TCTGCGTCTCT	2	Kein Treffer	
TUBB4A	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	1 2	747-757 159-169	TCTCAGCGTCT TCTCCGCGTGT

Tabelle 43: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements im Bereich von 5000 bp nach Translationsende der Gene SGCE und TUBB4A.

Gen	Untersuchter Bereich (hg19)	Gesuchte Sequenz	Anzahl mismatches	Position (innerhalb des untersuchten Bereichs)	Gefundene Sequenz
SGCE	Chr7: 94,285,521- 94,290,521	TCTGCGTCTCT	2	1077-1087	TCTGCAGCTCT
SGCE	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	Kein Treffer	
TUBB4A	Chr19: 6,502,330 – 6,507,330	TCTGCGTCTCT	2	Kein Treffer	
TUBB4A	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	1 2	1461-1471 Kein weiterer Treffer	TCTCTGTGTCT

Tabelle 44: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in der codierenden Sequenz der Kandidatengene MAP4K3, MBTPS1, SCFD2, PRKCQ.

Gen	„Transkript“	Anzahl Nukleotide	Anzahl mismatches	Position	Sequenz
MAP4K3	CCDS1803	2685	3	913-923 967-977 1544-1554 1546-1556 1696-1706 2299-2309	CCTGAGCCTCT TTTCTTCTCT TGTGCCTCTAT TTTGTGCCTCT TCTGGGTTTAT TCTGATTCTGT
MAP4K3	CCDS58707	2622	3	913-923 967-977 1481-1491 1483-1493 1633-1643 2236-2246	CCTGAGCCTCT TTTCTTCTCT TGTGCCTCTAT TTTGTGCCTCT TCTGGGTTTAT TCTGATTCTGT

Gen	„Transkript“	Anzahl Nukleotide	Anzahl mismatches	Position	Sequenz
<i>MBTPS1</i>	CCDS10941	3159	3	238-248 321-331 802-812 824-834 1691-1701 1773-1783 2134-2144 2749-2759	TCTACTTCACT TCTGTTTTTCT TCTGCATCTGG TCAGGGTCTTT TCTCCATTCT ACTCTGTCTCT TCCACGTCCT TTTGGGTCTCC
<i>SCFD2</i>	CCDS33984	2055	3	517-527 739-749 1057-1067 1474-1484 1562-1572 1650-1660 1901-1911	TTTGATCCCT GCTGCGGATCT ACTGCTTCTTT TCTGCTTCACA ACTGGGACTCT TCGGAGTCTCC TCACAGTCTCT
<i>PRKCQ</i>	CCDS7079	2121	3	204-214 281-291 376-386 671-681 913-923 1017-1027	TCTGCATGACT CCTGCACCTCT TTTGTGTCACT TTTGAATCTCT TCAGTATCTCT CCTGAGGCTCT
<i>PRKCQ</i>	CCDS60482	1746	3	296-306 538-548 642-652	TTTGAATCTCT TCAGTATCTCT CCTGAGGCTCT
<i>PRKCQ</i>	CCDS55071	1932	3	Siehe CCDS7079	Siehe CCDS7079

Tabelle 45: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in gegenläufiger Richtung (TCTCTGCGTCT) in der codierenden Sequenz der Gene *MAP4K3*, *MBTPS1*, *SCFD2*, *PRKCQ*.

Gen	„Transkript“	Anzahl Nukleotide	Anzahl mismatches	Position	Sequenz
<i>MAP4K3</i>	CCDS1803	2685	2 3	2230-2240 395-405 397-407 979-989 981-991 1546-1556 1698-1708 2301-2311	TCTCTACCTCT TCTGTGCATTT TCTCTGTGCAT TCTGAGCGTGT TCTCTGAGCGT TTTGTGCCTCT TATCTGGGTTT TATCTGATTCT
<i>MAP4K3</i>	CCDS58707	2622	3	2167-2177 395-405 397-407 979-989 981-991 1483-1593 1635-1645 2238-2248	TCTCTACCTCT TCTGTGCATTT TCTCTGTGCAT TCTGAGCGTGT TCTCTGAGCGT TTTGTGCCTCT TATCTGGGTTT TATCTGATTCT
<i>MBTPS1</i>	CCDS10941	3159	3	19-29 692-702 804-814 822-832 1754-1764 1773-1783 2761-2771	TGGCTGCTTCT TCTCTCCTTCA GTTCTGCATCT TTTCAAGGTCT TCACTGTGGCT ACTCTGTCTCT CCTCGGCTCT

Gen	„Transkript“	Anzahl Nukleotide	Anzahl mismatches	Position	Sequenz
SCFD2	CCDS33984	2055	2 3	1059-1069 366-376 673-683 737-747 1099-1109 1254-1264 1373-1383 1648-1658	TCA CTGC TCT TCTC GGCC GCT TCTCTG TGTGA TC GCTGCG GAT TCTCTG CTTG C TCTG TGGT GT TCTCTG GGTTA G CTCGG AGTCT
PRKCQ	CCDS7079	2121	3	111-121 665-675 1108-1118 1596-1606 1638-1648 1848-1858	TCTCTG ATTCG TCTCT CCTT GT TCTCTG CAGAT TCT TGGC ATCT TCTCTG GGCG TCT CAGTT TCT
PRKCQ	CCDS60482	1746	3	290-300 753-743 1221-1231 1263-1273 1473-1483	TCTCT CCTT GT TCTCTG CAGAT TCT TGGC ATCT TCTCTG GGCG TCT CAGTT TCT
PRKCQ	CCDS55071	1932	3	111-121 665-675 1108-1118 1596-1606 1659-1669	TCTCTG ATTCG TCTCT CCTT GT TCTCTG CAGAT TCT TGGC ATCT TCT CAGTT TCT

Tabelle 46: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements im Bereich von 5000 bp vor Translationsstart der Gene MAP4K3, MBTPS1, SCFD2 und PRKCQ.

Gen	Untersuchter Bereich (hg19)	Gesuchte Sequenz	Anzahl mismatches	Position (innerhalb des untersuchten Bereichs)	Gefundene Sequenz
PRKCQ	Chr10: 6,464,105 – 6,469,105	TCTGCGTCTCT	2	1534- 1544 2547-2557 2573-2583	CCTG TG TCTCT TCT TCT TCTCT TCT TCT TCTCT
PRKCQ	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	1219-1229 1540-1550 3799-3809	TCC TG CGTCC TCTCTG CTACT TCTCTG GGTGT
MAP4K3	Chr2: 39,471,407 – 39,476,407	TCTGCGTCTCT	2	2213-2223 2663-2673	G CTGCT TCTCT TCT CCT TCTCT
MAP4K3	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	2412-2422	TCTCT CAT CTCT
MBTPS1	Chr16: 84,082,369 – 84,087,369	TCTGCGTCTCT	2	583-593 1459-1469 3448-3458	CCTG AG TCTCT TCTG TCT TCTCT G CTGCG GCTCT
MBTPS1	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	340-350	TCTCTG TGCC T
SCFD2	Chr4: 53,734,151 – 53,739,151	TCTGCGTCTCT	2	448-458 450-460 460-470 486-496 3305-3315	TCTG TCT TCTCT TCT TGT TCTCT T GTGT TCTCT G CTGCA CTCT TCTG CATCTGT

7 Anhang

Gen	Untersuchter Bereich (hg19)	Gesuchte Sequenz	Anzahl mismatches	Position (innerhalb des untersuchten Bereichs)	Gefundene Sequenz
SCFD2	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	452-462 931-941 3307-3317 3367-3377	TCTCTCTGTCT TCTCTGTGCCT TGTCTGCATCT TCTCTGGCCT

Tabelle 47: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements im Bereich von 5000 bp nach Translationsendet der Gene MAP4K3, MBTPS1, SCFD2 und PRKCQ.

Gen	Untersuchter Bereich (hg19)	Gesuchte Sequenz	Anzahl mismatches	Position (innerhalb des untersuchten Bereichs)	Gefundene Sequenz
PRKCQ	Chr10: 6,622,254- 6,627,254	TCTGCGTCTCT	2	413-423 1932-1942	GCTGGGTCTCT TCTGGGTTCT
PRKCQ	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	Kein Treffer	
MAP4K3	Chr2: 39,664,453- 39,669453	TCTGCGTCTCT	2	1667-1677	TCTGCTTATCT
MAP4K3	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	2443-2453 3048-3058 4525-4535	TCTCTGATTCT TCTGTGCTTCT TCTCTGCAGCT
MBTPS1	Chr16: 84,150,517- 84,155,517	TCTGCGTCTCT	2	Kein Treffer	
MBTPS1	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	1223-1233 1817-1827	TCTCTGCCTCA TCTCTGCATTT
SCFD2	Chr4: 54,232,242- 54,237,242	TCTGCGTCTCT	1 2	2417-2427 1323-1333	TCTGCTTCTCT GCTCCGTCTCT
SCFD2	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	3378-3388	TCTCTCTTCT

Tabelle 48: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in der codierenden Sequenz der Kandidatengene MAP2K2 und SNAP91.

Gen	„Transkript“	Anzahl Nukleotide	Anzahl mismatches	Position	Sequenz
MAP2K2	CCDS12120	1203	3	141-151 202-212 415-425 480-490 555-565 867-877	TCTGCTGCTCG TCATCGTCTTT TCCCGTCACT TCTTGGCCTCT GGTGCTTCTCT TGTGAGGCTCT
SNAP91	CCDS47455	2724	2 3	1003-1013 591-601 742-752 1963-1973	TCTGCGGCTGT TATGCTTCTTT TCTGAATTTCT CCTGCATCTCA
SNAP91	CCDS56438	2634	2 3	997-1007 591-601 742-752 1873-1883	TCTGCGGCTGT TATGCTTCTTT TCTGAATTTCT CCTGCATCTCA

SNAP91	CCDS56437	1803	2	955-965	TCTGCGGCTGT
			3	591-601	TATGCTTCTTT
				742-752	TCTGAATTCT

Tabelle 49: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements in gegenläufiger Richtung (TCTCTGCGTCT) in der codierenden Sequenz der Gene MAP2K2 und SNAP91.

Gen	„Transkript“	Anzahl Nukleotide	Anzahl mismatches	Position	Sequenz
MAP2K2	CCDS12120	1203	3	417-427 531-541 861-871 873-883 1156-1166	TCTCCCGTCA TCTCCGGGCT GCTCTCCTTCT TCACAGCATCT ACCCTGCGGCT
SNAP91	CCDS47455	2724	3	589-599 855-865 1001-1011 1188-1198 1259-1269	TTTATGCTTCT TCTTTCCTTCT CATCTGCGGCT TCTGTGCTTCA CCTCAGCTTCT
SNAP91	CCDS56438	2634	3	589-599 855-865 995-1005 1182-1192 1253-1263	TTTATGCTTCT TCTTTCCTTCT CATCTGCGGCT TCTGTGCTTCA CCTCAGCTTCT
SNAP91	CCDS56437	1803	3	589-599 813-823 953-963	TTTATGCTTCT TCTTTCCTTCT CATCTGCGGCT

Tabelle 50: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements im Bereich von 5000 bp vor Translationsstart der Gene MAP2K2 und SNAP91.

Gen	Untersuchter Bereich (GRCh37)	Gesuchte Sequenz	Anzahl mismatches	Position (innerhalb des untersuchten Bereichs)	Gefundene Sequenz
MAP2K2	chr19: 4,085,319 – 4,090,319	TCTGCGTCTCT	2	Kein Treffer	
MAP2K2	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	4567-4577	TCTCTGCCCT
SNAP91	chr6: 84,257,605 – 84,262,605	TCTGCGTCTCT	2	991-1001 1108-1118 1120-1130 2515-2525	TCTTGTCTCT GTACGTCTCT TCTAAGTCTCT TCTGCATCTAT
SNAP91	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	2517-2527	TTTCTGCATCT

Tabelle 51: Vorkommen des Alkohol-responsiven Elements im Bereich von 5000 bp nach Translationsende der Gene MAP2K2 und SNAP91.

Gen	Untersuchter Bereich (GRCh37)	Gesuchte Sequenz	Anzahl mismatches	Position (innerhalb des untersuchten Bereichs)	Gefundene Sequenz
MAP2K2	chr19: 4,124,126- 4,129,126	TCTGCGTCTCT	2	Kein Treffer	
MAP2K2	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	235-245 3295-3305	TCCCTCCGTCT TCTCTCCTCT
SNAP91	Chr6: 84,418,847 – 84,423,847	TCTGCGTCTCT	2	Kein Treffer	
SNAP91	s.o.	TCTCTGCGTCT (rückwärts)	2	525-535 1385-1395 4472-4482 4990-5000	CCTGTGCGTCT TCCCTTCGTCT TCTCTGTTCT TCTCTGTGTG

7.4 Votum der Ethikkommission

Die im Rahmen dieser Promotionsarbeit durchgeführten Untersuchungen am Menschen wurden durch folgende positiv beschiedene Anträge an die Ethikkommission der Universität zu Lübeck genehmigt:

„Einfluss genetischer Faktoren auf den Erkrankungsverlauf bei Patienten mit primärem Dystonie-Syndrom“, Aktenzeichen: 04-180, Genehmigungsschreiben: 01.07.2005;

„Identifizierung neuer Gene bei Bewegungsstörungen mittels „next generation sequencing“, Aktenzeichen: 11-021, Genehmigungsschreiben: 20.05.2011;

„Dystonia Coalition Project; Biorepository for Primary Dystonia“, Aktenzeichen 11-145, Genehmigungsschreiben: 31.10.2011, Bestätigungsschreiben: 19.02.2019.

8 Danksagungen

An dieser Stelle möchte ich von Herzen all denjenigen Personen danken, ohne die diese Promotionsarbeit nie zustande gekommen wäre und die mich in der Zeit der experimentellen Arbeiten, des Schreibens und Korrigierens auf vielfältige Weise begleitet und unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt meiner Doktormutter Prof. Dr. Katja Lohmann für die Vergabe eines Promotionsthemas und dass ich eine Zeit lang Mitglied ihrer überaus spannenden Arbeitsgruppe „Genetics of Rare Diseases“ sein durfte. Ich möchte ihr dafür danken, dass ich seit dem Beginn meiner Doktorarbeit im Jahr 2016 ein breites Spektrum wissenschaftlicher Methoden und Arbeitsweisen kennenlernen und anwenden durfte, für die ständige Ansprechbarkeit bei Fragen und Problemen, insbesondere für die unglaublich schnellen Antworten auf Mails und die stets offene Tür zu ihrem Büro. Ich möchte außerdem meine große Dankbarkeit ausdrücken für vielfältige Ratschläge, konstruktive Kritiken und dafür, dass sie immer eine Lösung oder einen Plan B parat hatte, wenn etwas nicht so gelaufen war wie erhofft. Danke für das entgegengebrachte Vertrauen und die Geduld, die Möglichkeiten an Konferenzen teilzunehmen und selbst einen wissenschaftlichen Artikel publizieren zu können.

Außerdem möchte ich dem gesamten Institut für Neurogenetik mit der Direktorin Prof. Dr. Christine Klein und allen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern für die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes, das Überlassen von Materialien, die vertrauensvolle Zusammenarbeit und das freundliche Miteinander danken. Insbesondere danke ich den weiteren Mitgliedern der Arbeitsgruppe „Genetics of Rare Diseases“ für die enge Zusammenarbeit. Besonders hervorzuheben sind dabei Frauke Hinrichs (MTA), Hauke Baumann (M. Sc.) und Eva Hebert (M. Sc.), die mir die verschiedenen experimentellen Methoden im Labor beigebracht haben und immer wieder bei Problemen und Fragen geduldig mit Ratschlägen und Hilfestellungen zur Seite standen. Vielen Dank für die angenehme Arbeitsatmosphäre und dass mir die Zeit im Labor immer in wertvoller Erinnerung bleiben wird.

Am Schluss steht mein tiefer Dank an meine Familie und meine guten und engen Freunde. Meinen Freunden danke ich, dass sie mich durch mein Studium und die Zeit der Promotion begleitet haben, dass sie mir zugehört haben, wenn ich mich über den zögerlichen Fortgang des Schreibens und Korrigierens beklagt habe, für zahlreiche Aufmunterungen und die vielen kleinen und großen Zeichen der Freundschaft. Meinen Eltern und meinem Bruder danke ich, dass sie mir das Studium und die zusätzliche Zeit zur Anfertigung dieser Dissertation ermöglicht haben, für das beständige Interesse an meiner wissenschaftlichen Arbeit, den sicheren Rückhalt und den immer spürbaren Glauben an mich und meine Fähigkeiten.

9 Lebenslauf

Sofia Steinrücke

Geboren am 25.01.1992

in Warstein



07/2011	Abitur am Gymnasium der Stadt Warstein
09/2011 – 08/2012	Freiwilliges Soziales Jahr in den von Bodelschwingschen Stiftungen Bethel, Bielefeld
10/2012 – 05/2019	Medizinstudium an der Universität zu Lübeck
25.08.2014	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
03/2016 – 01/2017	experimentelle Arbeiten zur Erstellung einer Promotion am Institut für Neurogenetik der Universität zu Lübeck
12.04.2018	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
05/2018 – 04/2019	Praktisches Jahr
16.05.2019	Dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
27.06.2019	Approbation als Ärztin
Seit 10/2019	Promotionssemester zur Fertigstellung der Dissertationsschrift

Publikationen

Steinrücke S, Lohmann K, Domingo A, Rolfs A, Bäumer T, Spiegler J, Hartmann C, Münchau A (2016) Novel GNB1 missense mutation in a patient with generalized dystonia, hypotonia, and intellectual disability. *Neurol Genet* 2, e106

Lohmann K, Masuho I, Patil DN, Baumann H, Hebert E, Steinrücke S, Trujillano D, Skamangas NK, Dobricic V, Hüning I, Gillissen-Kaesbach G, Westenberger A, Savic-Pavicevic D, Münchau A, Oprea G, Klein C, Rolfs A, Martemyanov KA (2017) Novel GNB1 mutations disrupt assembly and function of G protein heterotrimers and cause global developmental delay in humans. *Hum Mol Genet* 26, 1078–1086

Poster

Steinrücke S, Domingo A, Rolfs A, Bäumer T, Spiegler J, Hartmann C, Münchau A, Lohmann K (2016) Novel GNB1 missense mutation in a patient with generalized dystonia, hypotonia and intellectual disability. Poster anlässlich der Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Gen-Diagnostik e.V. (7./8. Oktober 2016), Potsdam