

Aus der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Das MDFPMR Syndrom: Detektion und funktionelle
Charakterisierung einer *gain-of-function* Mutation in *HERC1*
mit Einfluss auf mTOR Aktivität und Autophagie**

**The MDFPMR Syndrome: Detection and functional
characterization of a *gain-of-function* mutation in *HERC1*
affecting mTOR activity and autophagy**

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Jana Marie Schwarz

Datum der Promotion:

26.06.2022

Inhaltsverzeichnis

1. Abbildungsverzeichnis	3
2. Abkürzungsverzeichnis	4
3. Zusammenfassung	6
3.1 Abstract (englische Zusammenfassung)	6
3.2 Abstract (deutsche Zusammenfassung).....	8
4. Manteltext	10
4.1 Einleitung	10
4.1.1 Stand der Forschung: Seltene Erkrankungen und ihre Diagnose	10
4.1.2 Fallbericht der Patientinnen	13
4.1.3 Stand der Forschung: MDFPMR Syndrom	15
4.1.4 Stand der Forschung: HERC1, mTOR und neuromuskuläre Erkrankungen	16
4.2 Methodik.....	19
4.2.1 Gesamtexom-Sequenzierung und Evaluation gefundener DNA-Varianten	19
4.2.2 Funktionelle Charakterisierung der HERC1 Variante	19
4.3 Ergebnisse und Diskussion	23
4.3.1 Ergebnisse der Exomsequenzierung und Variantenanalyse	23
4.3.2 Ergebnisse des Western Blots und der Immunfluoreszenzfärbung	24
4.3.3 Ergebnisse des mTOR Aktivitäts-Assays	24
4.3.4 Ergebnisse des Autophagie-Assays	26
4.3.5 Diskussion experimenteller Limitationen, klinischer Implikationen und weiterführender Fragestellungen	28
4.4 Literatur.....	35
5. Eidesstattliche Versicherung	46
6. Anteilserklärung	47
7. Auszug aus der Journal Summary List	49
8. Druckexemplar der ausgewählten Publikation	52
8.1 Schwarz, J.M., Pedrazza, L., Stenzel, W., Rosa, J.L., Schuelke, M., Straussberg, R.: A new homozygous HERC1 gain-of-function variant in MDFPMR syndrome leads to mTORC1 hyperactivation and reduced autophagy during cell catabolism. Mol Genet Metab. 2020;131(1-2):126-34.	52
9. Lebenslauf	68
10. Komplette Publikationsliste	69
11. Danksagung	72

1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1.....14
Abbildung 2.....18
Abbildung 3.....28

2. Abkürzungsverzeichnis

ADHS	A ufmerksamkeits defizit-H yperaktivitäts störung
AKT1	AKT serine/threonine kinase 1
ALS	Amyotrophe L ateral s klerose
AMPK	AMP -activated protein k inase
ASD	autism-spectrum disease
bp	Basenpaare
CMT	C harcot-Marie- T ooth Krankheit
CT	C omputertomographie
EBM	E inheitlicher B ewertungs m aßstab
EEG	E lektroenzephalographie
EMG	E lektromyographie
FCS	fetal c alf s erum
HECT	H omologous to the E6-AP C arboxyl T erminus
HeLa	HeLa Zelllinie (etabliert aus menschlichen Epithelzellen eines Zervixkarzinoms der Patientin Henrietta Lacks)
HERC1	H ECT and R LD Domain C ontaining E3 Ubiquitin Protein Ligase Family Member 1
ID	intellectual disability
IF	Immunfluoreszenz
IgG	Immunglobulin G
IRS1	I nsulin receptor s ubstrate 1
MRT	M agnetresonanztomographie
mTOR	m ammalian T arget o f R apamycin
mTORC1	m ammalian T arget o f R apamycin C omplex 1
NGS	N ext g eneration s equencing
NGS	normal g oat s erum
NLG	N ervenleit g eschwindigkeit
OMIM	O nline M endelian I nheritance in M an
P	phosphate
PBS	P hosphate b uffered s aline
PFA	P araformaldehyd

PI3K	Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase
PTEN	Phosphatase and tensin homolog
RCC	Regulator of chromosome condensation
RHEB	Ras homolog enriched in brain
RLD-1	RCC-like domain 1
RT	Raumtemperatur
S6K1	ribosomal protein S6 Kinase B1
SBMA	Spinale und bulbäre Muskelatrophie
SDS-PAGE	Sodium-dodecylsulfate Polyacrylamide Gelelectrophoresis
SMA	Spinale Muskelatrophie
TSC1/2	Tuberous sclerosis protein 1 and 2
u.a.	unter anderem
Ub	Ubiquitin
ULK1	Unc-51 like Autophagy Activating Kinase
V	Volt
XL-SMA	X-chromosomale spinale Muskelatrophie
3,4-DAP:	3,4-Diaminopyridin

3. Zusammenfassung

3.1 Abstract (englische Zusammenfassung)

Aims: The aim of this study was to identify the molecular cause of an inherited disease in two patients. The two sisters from a consanguineous marriage presented with macrocephaly, dysmorphic facies, psychomotor retardation, and seizures.

Methods: We assumed a rare, recessively inherited, genetic defect underlying the disease of our patients, and thus used Whole Exome Sequencing to obtain DNA sequence information. To reduce the number of potential disease-causing variants, I applied a series of filter steps, autozygosity mapping, and subsequent in-depth analysis of promising variants. I considered the nature of the variant itself, assumed gene function and a possible association to the patients' clinical phenotype. The finally remaining, probable disease-causing variant, was subject to functional analyses to assess its relevance. A conducted Western Blot analysis and immunofluorescence staining of the protein encoded by the altered gene with material from patient fibroblasts was compared to controls to visualize differences in amount and subcellular location. Cell-based assays focusing on autophagy and growth / proliferation provided further insights into the pathomechanism.

Results: Whole Exome sequencing revealed a novel homozygous missense variant in the C-terminal domain of the *HERC1* gene [chr15:g63,907,989C>G GRCh37.p11 | c.14,072G>C NM_003922 | p.(Arg4,691Pro)]. *HERC1* is a giant protein with ubiquitin ligase function acting as upstream regulator in the mTOR pathway *via* its interaction with TSC2. mTOR is a central signaling hub with impact on autophagy, energy metabolism, lipid- and protein synthesis, dependent on nutrient levels and environmental cues. My functional analyses revealed abnormal high mTOR activity in the patient fibroblasts during catabolic cellular state as compared to controls. Moreover, autophagy in patient fibroblasts was less active than normally expected in a catabolic situation.

Conclusion: Proven or assumed loss-of-function mutations in *HERC1* have previously been reported in patients with macrocephaly, facial dysmorphism, and psychomotor retardation, a symptom complex which has found its way into the literature as the MDFPMR syndrome (OMIM #617011). I conclude that the here described *HERC1* missense mutation is disease-causing and leads to a gain-of-function of the encoded

protein resulting in mTOR hyperactivation with reduced autophagy in catabolic cellular state. This is the first report about functional studies on a *HERC1* mutation in human cells providing insight into the possible pathomechanism at the basis of the MDFPMR syndrome.

3.2 Abstract (deutsche Zusammenfassung)

Zielsetzung: Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der molekularen Ursache einer angeborenen Erkrankung zweier Patientinnen. Die beiden Schwestern entstammen einer konsanguinen Ehe und präsentierten sich mit Makrozephalie, Gesichtsdysmorphie, psychomotorischer Retardierung und epileptischen Anfällen.

Methodik: Wir vermuteten einen rezessiv vererbten Gendefekt als Ursache der Krankheit und nutzten eine Gesamtexomsequenzierung zur Entschlüsselung der DNA-Sequenz der Patientinnen. Um die Anzahl der vielen gefundenen DNA Varianten auf einige wenige, möglicherweise krankheitsverursachende Kandidaten zu reduzieren, kamen mehrere Filterschritte und eine Autozygotiekartierung zum Einsatz. Anschließend analysierte ich die verbliebenen Varianten unter Berücksichtigung der Art der Variante, der Funktion des betroffenen Gens, sowie einer eventuellen Assoziation zum Phänotyp der Patientinnen. Die letztendlich verbliebene Variante wurde experimentell untersucht hinsichtlich der Menge sowie der subzellulären Lokalisierung des kodierten Proteins in Fibroblasten einer Patientin im Vergleich zu gesunden Kontrollen. Funktionelle Assays in Patientenzellen gewährten zusätzliche Einblicke in den möglichen Pathomechanismus, der auf eine gestörte Regulation von Autophagie und Wachstum / Proliferation hindeutet.

Ergebnisse: Die Gesamtexomsequenzierung legte eine bislang nicht beschriebene, homozygote *missense* Mutation im C-terminalen Teil des *HERC1* Gens offen [chr15:g63,907,989C>G GRCh37.p11 | c.14,072G>C NM_003922 | p.(Arg4,691Pro)]. *HERC1* ist ein großes Protein mit Ubiquitin-Ligasefunktion und funktioniert als Regulator des mTOR Signalwegs durch seine Interaktion mit TSC2. mTOR ist ein zentraler Signalknotenpunkt und reguliert abhängig vom Nährstoff- und Energiestatus sowie weiteren intra- und extrazellulären Einflüssen die feine Balance zwischen Zellkatabolismus und -anabolismus. Von mir durchgeführte funktionelle Analysen zeigten in Patientenfibroblasten unter katabolen Umständen eine abnorm hohe mTOR-Aktivität im Vergleich zu Kontrollen. Autophagie hingegen war in Patientenfibroblasten weniger aktiv als erwartet.

Zusammenfassung: Aus der Literatur sind (mutmaßliche) *loss-of-function* Mutationen in *HERC1* bei Patienten mit Makrozephalie, Gesichtsdysmorphie und psychomotorischer Retardierung bekannt. Dieser Symptomkomplex wird als MDFPMR Syndrom bezeichnet (OMIM #617011). Ich schließe aus meinen Versuchsergebnissen, dass die hier

gefundene *HERC1* missense Mutation zu einem Funktionsgewinn des kodierten Proteins führt, mit in der Folge hyperaktiviertem mTOR und reduzierter Autophagie unter katabolen Stoffwechselbedingungen. Dies ist der erste Bericht über eine funktionelle Charakterisierung einer *HERC1* Mutation in humanen Zellen und gewährt einen ersten Einblick in den möglichen Pathomechanismus des MDFPMR Syndroms.

4. Manteltext

Dieser Manteltext dient dazu, die Publikation (Schwarz et al. 2020) zum Zwecke der Publikationspromotion in einen breiteren wissenschaftlichen Kontext zu rücken und einzelne experimentelle und wissenschaftliche Aspekte genauer zu beleuchten. Um eine zu starke Dopplung der Inhalte zwischen Manteltext und Publikation zu vermeiden, habe ich hier experimentelle Details nur explizit beschrieben, sofern sie nicht bereits der Publikation zu entnehmen sind. Der Manteltext ist daher gemeinsam mit der Publikation zu betrachten. Selbstverständlich gibt es dennoch gewisse inhaltliche Überschneidungen, diese sind jedoch im Rahmen der angestrebten Einordnung in den wissenschaftlichen Kontext gewünscht und bei dieser Form der Publikationspromotion nicht zu vermeiden. Ich bitte weiterhin um Verständnis dafür, dass zur besseren Verständlichkeit gelegentlich englische Begriffe Verwendung finden, sofern diese auch im deutschen Sprachraum gebräuchlicher sind (z.B. *missense* Mutation statt „Fehlsinmutation“).

4.1 Einleitung

4.1.1 Stand der Forschung: Seltene Erkrankungen und ihre Diagnose

Das Ziel meiner Forschungsarbeit war die Identifikation der genetischen Ursache einer seltenen Erkrankung bei zwei Patientinnen einer mit unserer Arbeitsgruppe kooperierenden Ärztin aus Israel. Eine Erkrankung gilt dann als selten, wenn sie bei weniger als einem von 2.000 Menschen auftritt (Europäisches Parlament, Europäischer Rat 2000). Paradoxerweise sind seltene Erkrankungen aber in ihrer Gesamtheit nicht selten: Obwohl von einer bestimmten, seltenen Erkrankung nur wenige Menschen betroffen sind, ist das Kollektiv aller Patienten, die unter einer seltenen Erkrankung leiden, groß. Für Deutschland wird diese Zahl auf ca. 4 Millionen beziffert, weltweit sind es schätzungsweise sogar mehr als 350 Millionen Patienten (Frank et al. 2014; Nguengang Wakap et al. 2020). Die große Anzahl von Patienten ist darin begründet, dass es viele verschiedene seltene Erkrankungen gibt. Die Datenbank OrphaNet ^a enthält Informationen zu mehr als 6.000 verschiedenen Erkrankungen, von denen der Großteil genetisch bedingt ist (Nguengang Wakap et al. 2020). Diese Zahl ist jedoch möglicherweise wegen uneinheitlicher Definitionen und Terminologien nicht korrekt.

^a <https://www.orpha.net>

Alternative Schätzungen gehen aktuell sogar von insgesamt mehr als 10.000 seltenen Erkrankungen aus (Haendel et al. 2020). Von den genetisch bedingten seltenen Erkrankungen manifestieren sich viele bereits in der Neugeborenenzeit oder in der frühen Kindheit. Seltene Erkrankungen sind darüber hinaus in ihrer Natur jedoch sehr heterogen, und treten aufgrund ihrer Seltenheit örtlich und zeitlich stark disseminiert auf (Nguengang Wakap et al. 2020). All diese Umstände erschweren die zielgerichtete und erfolgreiche Diagnose von seltenen Erkrankungen, da es für jede seltene Erkrankung in der Regel weltweit nur wenige Spezialist*innen gibt. Häufig ist es leider eine Frage des Glücks oder zumindest der Zeit, bis Patient*innen eine korrekte Diagnose erhalten. Die durchschnittliche Zeit von der Krankheitsmanifestation bis zu einer Diagnose wird je nach Quelle mit fünf bis acht Jahren beziffert^{bc}. In diesem Zusammenhang spricht man häufig auch von einer „diagnostischen Odyssee“. Manche Patient*innen erhalten erst nach Jahren oder Jahrzehnten und nach Konsultation vieler verschiedener Ärzt*innen Gewissheit über die Ursache ihres Leidens.

Es ist daher nicht verwunderlich, dass es starke Bestrebungen gibt, die Diagnostik seltener Erkrankungen zu vereinfachen und zu beschleunigen. Während man früher wegen der zeitlich relativ aufwendigen und im Vergleich pro sequenzierter Base deutlich teureren Methodik der Gensequenzierung nach Sanger auf die gezielte Analyse weniger Kandidatengene oder sogar einzelner Exons beschränkt war, spielt diese Limitation mittlerweile in der Regel keine Rolle mehr. Mit Hilfe von Gesamtexom- oder sogar Gesamtgenomsequenzierungen ist es heutzutage möglich, schnell und effizient genetische Informationen von Patient*innen und ggf. auch von Angehörigen zu erlangen. Die Methodik dieser Hochdurchsatztechnologien basiert auf einer parallelen Untersuchung sehr vieler kurzer aber überlappender Sequenzabschnitte, die anschließend bioinformatisch wieder zu einer langen Gesamtsequenz zusammengesetzt werden. Bei der Gesamtexomsequenzierung (engl. *Whole Exome Sequencing*, WES) untersucht man alle kodierenden Bereiche des Genoms, bei der Gesamtgenomsequenzierung (engl. *Whole Genome Sequencing*, WGS) gibt es keine solche Beschränkung. WES und WGS werden allgemein auch *Next Generation Sequencing* (NGS) genannt. Die Methodik wurde zunächst im Forschungskontext sowie in den letzten Jahren auch vermehrt in der klinischen Routine genutzt und hat die

^b <https://www.weforum.org/agenda/2020/02/it-takes-far-too-long-for-a-rare-disease-to-be-diagnosed-heres-how-that-can-change/> (20.05.2021)

^c <https://globalgenes.org/wp-content/uploads/2013/04/ShireReport-1.pdf> (20.05.2021)

Diagnose genetisch bedingter, seltener Erkrankungen revolutioniert. Studien belegen, dass mit Hilfe dieser Methoden ca. 30-35% der Patient*innen eine gesicherte molekulare Diagnose erhalten (Meng et al. 2017; Geldon et al. 2018). Dies betrachten Fachleute als einen sehr guten Wert (Abicht et al. 2019). In Deutschland ist es durch eine Änderung im Einheitlichen Bewertungsmaßstab (EBM) der gesetzlichen Krankenkassen seit Januar 2021 nun auch möglich, ohne vorherige Genehmigung durch die Krankenkassen das NGS zur umfassenden postnatalen Mutationssuche zu nutzen und als gesetzliche Leistung abzurechnen. Genauere Untersuchungen des Pathomechanismus sowie die Bestätigung der Pathogenität für neue, bisher nicht bekannte Krankheitsmutationen durch zellbasierte Assays können jedoch aktuell nur auf Forschungsbasis durchgeführt werden. Dies trifft für den hier vorgestellten Fall zu, welcher der Ausgangspunkt meiner Dissertation war.

Eine große Herausforderung bei der Anwendung von Hochdurchsatzmethoden besteht vor allem darin, die immensen Datenmengen sinnvoll zum Zwecke des Erkenntnisgewinns zu nutzen. Zur Veranschaulichung: Das menschliche Genom besteht aus ca. drei Milliarden Basenpaaren (bp), und durchschnittlich findet sich ca. alle 1.000 bp eine Abweichung von der Referenzsequenz. In einem typischen WES Datensatz finden sich durchschnittlich 30.000-50.000 Varianten, von denen die allermeisten jedoch harmlos sind. Im Falle einer seltenen genetischen Erkrankung kann jedoch eine einzige Veränderung die Ursache der Symptomatik sein. Genau diese Änderung gilt es zu identifizieren. Um diese Aufgabe zu erleichtern und vergleichbare und robuste Ergebnisse zu gewährleisten, haben Wissenschaftler*innen in den letzten Jahren zahlreiche Computerprogramme und Algorithmen für die automatisierte Analyse von DNA-Sequenzvarianten entwickelt (Sim et al. 2012; Adzhubei et al. 2013; Schwarz et al. 2014; Steinhaus et al. 2021). Weiterhin wurden Richtlinien für die Bewertung der Pathogenität gefundener Varianten veröffentlicht, wie zum Beispiel die *Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants*: des *American College of Medical Genetics and Genomics* (ACMG) und der *Association for Molecular Pathology* (Richards et al. 2015), die mittlerweile in vielen wissenschaftlichen Publikationen berücksichtigt werden.

Aber nicht nur die Diagnostik seltener Erkrankungen ist schwierig und langwierig, selbiges gilt auch für deren Therapie. Der Deutsche Ethikrat hat im Jahr 2018 die Versorgungslage von Menschen mit seltenen Erkrankungen insgesamt als

„unzureichend“ kritisiert (Ärzteblatt 2018). Wegen der geringen Zahl an Patient*innen für eine bestimmte seltene Krankheit fanden diese bisher in der Erforschung und Entwicklung von geeigneten Arzneimitteln bisher nur wenig Beachtung (Heemstra et al. 2008), wobei in den letzten Jahren auf europäischer Ebene zahlreiche Anstrengungen unternommen werden, dies zu ändern (Micallef and Blin 2020). In vielen Fällen mangelt es an einer spezifischen Behandlungsoption. Auch für eine symptomatische Therapie fehlt es in der Regel an verlässlichen Leitlinien, so dass sich Behandlungskonzepte häufig allenfalls auf Einzelfallberichte stützen können.

Nichtsdestotrotz bedeutet das Wissen um die Ursache ihrer Erkrankung für die meisten Patient*innen und Familien eine große emotionale Erleichterung. Darüber hinaus ist es mit einer Diagnose einfacher, den Verlauf der Erkrankung abzusehen und den Patient*innen und ihren Familien eine entsprechende Beratung zu geben. Auch der Verzicht auf weitere belastende diagnostische Maßnahmen, sowie die Beendigung nicht wirksamer Therapien ist als eine wichtige therapeutische Konsequenz zu betrachten (Abicht et al. 2019). In ganz seltenen Fällen ergibt sich sogar eine direkte therapeutische Konsequenz (Schuelke et al. 2000). Schlussendlich kann die genaue Kenntnis des Genortes der Krankheitsvariante wichtig sein, falls die Familienplanung nicht abgeschlossen ist, und betroffene Eltern eine Pränataldiagnostik wünschen.

Die Arbeitsgruppe der Experimentellen Neuropädiatrie um Prof. Dr. Schülke ist angesiedelt an der Klinik für Pädiatrie mit Schwerpunkt Neurologie der Charité – Universitätsmedizin Berlin und widmet sich der Aufklärung der genetischen Ursachen seltener neuromuskulärer Erkrankungen.

4.1.2 Fallbericht der Patientinnen

Das Ziel meiner Forschungsarbeit war die Identifikation der genetischen Ursache einer mutmaßlich seltenen Erkrankung zweier Patientinnen, die im Folgenden genauer vorgestellt werden. Für die detaillierten Fallbeschreibungen verweise ich auf die Publikation zu diesem Manteltext (Schwarz et al. 2020).

Klinische Symptomatik der Patientinnen

Beide Patientinnen wurden jeweils in der 42. Woche einer bis dahin unauffälligen Schwangerschaft geboren. Die Eltern sind konsanguin (siehe **Abbildung 1C**). Körperlänge und Kopfumfang wurden nach der Geburt nicht erfasst, das Geburtsgewicht beider Mädchen bewegte sich im oberen Normbereich (97. Perzentile). Postnatal und

frühkindlich fielen jeweils eine muskuläre Hypotonie auf, im Verlauf zeigten sich bei beiden Patientinnen leicht überdehnbare Gelenke. Beide Mädchen erreichten wichtige Meilensteine der motorischen Entwicklung (Drehen, freies Sitzen und freies Laufen) nur verzögert. Die Sprachentwicklung war ebenfalls verzögert. Diagnostische Maßnahmen wie Elektroenzephalographie (EEG), kraniale Magnetresonanztomographie (MRT) und Echokardiografie zeigten bei Patientin II:3 im Alter von 3 Jahren jedoch sämtlich normale Befunde. Bei beiden Mädchen entwickelte sich im Verlauf eine Makrozephalie. Für Patientin II:1 ist dokumentiert, dass bei ihr ab dem Alter von ca. 3 Monaten eine übermäßige Zunahme des Kopfumfanges zu verzeichnen war. Eine Sonographie des Schädels sowie ein kraniale Computer-Tomographie (CT) schlossen einen Hydrozephalus und andere in der Bildgebung sichtbare, intrakranielle Pathologien aus. Der Kopfumfang nahm im Verlauf fortwährend zu und wich weiter in den Bereich oberhalb der 95. Perzentile ab (**Abbildung 1A**). Als Jugendliche im Alter von 14 und 16 Jahren wiesen beide Patientinnen eine moderate Makrozephalie auf. Die Körpergrößen der Mädchen bewegten sich stets entlang der oberen Grenze des Normbereichs.

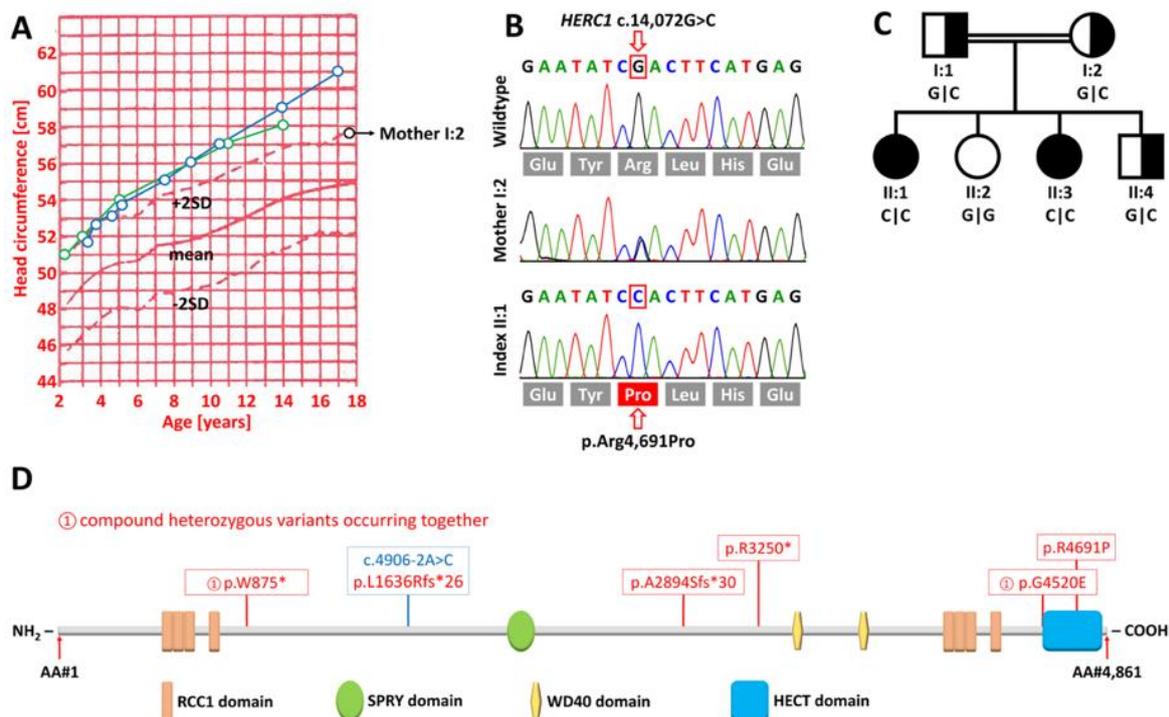


Abbildung 1 Überblick über klinische und molekulargenetische Untersuchungen, Abbildung entnommen aus der Publikation (Schwarz et al. 2020). **(A)** Wachstumskurve des Kopfumfanges von Patientin II:1 und II:3, welcher sich stets oberhalb der 97. Perzentile befindet. Im Vergleich dazu der Kopfumfang der Mutter I:2. **(B)** Ergebnisse der Sanger-Sequenzierung von Patientin II:1, der Mutter I:2 und einer gesunden Kontrolle (*wildtype*). **(C)** Stammbaum der Familie, welcher zeigt, dass die Homozygotie für die c.14.072G>C Variante mit dem Phänotyp segregiert. **(D)** Schematische Darstellung des HERC1 Proteins und seiner Domänen sowie der bislang veröffentlichten Krankheitsmutationen inklusive der hier besprochenen p.R4691P Mutation.

Im Alter von 7 Jahren manifestierte sich bei der Patientin II:3 eine Epilepsie mit bis zu 10 Minuten andauernden Anfällen mit nächtlichem Erwachen, Weinen, Kopfnicken und vorübergehenden, tonisch-klonischen Bewegungen. Im Video-EEG zeigten sich unabhängige epileptogene fronto-zentrale Herde über beiden Hemisphären. Unter einer Therapie mit Carbamazepin wurde die Patientin anfallsfrei. Die Behandlung wurde im Alter von 9 Jahren beendet, seither trat kein Rezidiv der Anfälle auf. Ein EEG im Alter von 13 Jahren war ebenfalls unauffällig. Im Alter von 8 Jahren wurde bei Patientin II:3 eine leichte bis mittelschwere geistige Behinderung diagnostiziert. Zum Ausmaß dieser ist aber keine genauere Dokumentation verfügbar. Bei ihrer Schwester, der Patientin II:1, wurde im Alter von 12 Jahren eine Aufmerksamkeitsdefizit-Hyperaktivitätsstörung (ADHS) diagnostiziert und eine Behandlung mit Methylphenidat eingeleitet. Kurz darauf entwickelte die Patientin psychotische Attacken mit selbstverletzendem Verhalten, woraufhin die Diagnose einer schizoaffektiven Störung gestellt wurde. Die Behandlung mit Aripiprazol führte zu einer deutlichen Verbesserung der Symptomatik und zum Sistieren der psychotischen Episoden.

Bei einer klinischen Untersuchung im Alter von 14 bzw. 16 Jahren zeigten sich bei beiden Mädchen hyperluxierbare Gelenke, eine Skoliose, Arachnodaktylie, eine Hyperreflexie sowie ein beidseits positiver Babinski-Reflex.

Zusammenfassend präsentierten sich die beiden Patientinnen mit einem ähnlichen Phänotyp bestehend aus Makrozephalie, Entwicklungsverzögerung, Pyramidenbahnzeichen sowie weiteren Auffälligkeiten des Nervensystems, des Skeletts und der Psyche, den wir als Hinweis auf das Vorliegen einer genetischen Erkrankung betrachteten. Aufgrund der Konsanguinität der Eltern erschien ein autosomal rezessiver Erbgang wahrscheinlich.

4.1.3 Stand der Forschung: MDFPMR Syndrom

Das MDFPMR Syndrom (OMIM #617011) bezeichnet einen Symptomkomplex mit den gemeinsamen Merkmalen Makrozephalie, Gesichtsdysmorphie und psychomotorischer Retardierung (**M**acrocephaly, **D**ysmorphic **F**acies, **P**sychomotor **R**etardation, MDFPMR) und beruht laut übereinstimmender Berichte auf Mutationen im *HERC1* (HECT and RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase Family Member 1) Gen. Ortega-Recalde und Kolleg*innen (Ortega-Recalde et al. 2015) beschrieben 2015 erstmals zwei Geschwister mit Makrozephalie, Hochwuchs, psychomotorischer Retardierung sowie

muskulärer Hypotonie. Die Autoren identifizierten mit Hilfe einer Gesamtexomsequenzierung eine *compound* heterozygote Mutation in *HERC1*, deren Segregation mit der Krankheit sich per Sanger-Sequenzierung bestätigte (Ortega-Recalde et al. 2015). Nachfolgend wurde der Symptomkomplex in unterschiedlicher Ausprägung bis zum Jahr 2017 von weiteren Autor*innen im Zusammenhang mit unterschiedlichen *HERC1* Mutationen beschrieben (Nguyen et al. 2016; Aggarwal et al. 2016; Utine et al. 2017) und fand schließlich Eingang in die OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man) (Amberger et al. 2009) Datenbank als MDFPMR Syndrom (OMIM #617011). Zusätzlich beschriebene klinische Auffälligkeiten umfassen unter anderem Gangataxie, Epilepsie sowie Hyperreflexie (Schwarz et al. 2020). Auch Fehlstellungen der Wirbelsäule im Sinne einer Skoliose sind bekannt.

Bei den bisher beschriebenen Mutationen handelt es sich größtenteils um *compound* heterozygote oder homozygote *nonsense*- bzw. trunkierende Spleißmutationen. Diese Mutationen führen mutmaßlich zum Funktionsverlust oder zum vollständigen Fehlen des *HERC1* Proteins. Es wurden bis zum Zeitpunkt des Beginns meiner Arbeit noch keine Ergebnisse funktioneller Analysen von *HERC1* Mutationen in Patient*innen publiziert und es gab bisher keine Erkenntnisse zum molekularen Pathomechanismus des MDFPMR Syndroms.

4.1.4 Stand der Forschung: *HERC1*, mTOR und neuromuskuläre Erkrankungen

HERC1 gehört zur Familie der *HERC* Proteine, die charakteristischerweise eine HECT Domäne (*Homologous to the E6-AP Carboxyl Terminus*) und eine RLD-1 Domäne (*RCC1 (Regulator of Chromosome Condensation) - Like Domain 1*) enthalten. Das menschliche Genom beherbergt sechs verschiedene *HERC* Gene, wobei *HERC1* und *HERC2* für sehr große Proteine kodieren, während *HERC3-6* deutlich kleiner sind (Rotin and Kumar 2009). Das riesige *HERC1* Protein (532 kDa) wird ubiquitär exprimiert mit etwas stärkerer Expression in Hoden und Gehirn (Rosa et al. 1996; Sánchez-Tena et al. 2016). *HERC1* verfügt über zwei RLD-1 Domänen, mehrere WD40-Repeats und eine C-terminale HECT Domäne (**Abbildung 1D**). Die RLD-1 Domäne dient als Regulator kleiner GTPasen. Die HECT-Domäne mit ihrer E3-Ubiquitinligaseaktivität (Huibregtse et al. 1995; Garcia-Gonzalo and Rosa 2005) ist unter anderem am selektiven Abbau von Proteinen beteiligt (Hershko and Ciechanover 1998). Eine fein austarierte Regulierung des Auf- und Abbaus von Proteinen ist essentiell für die zelluläre Homöostase, insbesondere für empfindliche Neuronen. So verwundert es nicht, dass Störungen des Ubiquitin-Proteasom-Systems

mit neuromuskulären Erkrankungen in Verbindung gebracht werden. Hierzu zählen zum Beispiel die spinale Muskelatrophie (SMA), die spinale und bulbäre Muskelatrophie (SBMA), die X-chromosomale spinale Muskelatrophie (XL-SMA), die X-chromosomale juvenile und adulte amyotrophe Lateralsklerose (ALS), sowie periphere Neuropathien wie die Charcot-Marie-Tooth-Krankheit (CMT) (Rusmini et al. 2007; Ramser et al. 2008; Deng et al. 2011; Bogdanik et al. 2013; Dlamini et al. 2013; Aghamaleky Sarvestany et al. 2014).

HERC1 interagiert mit einer Vielzahl von Proteinen, z. B. ARF1 (ADP-Ribosylierungsfaktor 1) und CLTC (Clathrin Heavy Chain) über eine RLD-1-Domäne (Rosa et al. 1996; Rosa and Barbacid 1997) oder mit PKM (Pyruvatkinase M1/2) und TSC2 (TSC-Komplex-Untereinheit 2) über seine HECT-Domäne (Garcia-Gonzalo et al. 2003; Chong-Kopera et al. 2006). Durch Interaktion mit TSC2 dient HERC1 als Upstream-Regulator des mTOR-Signalwegs (mammalian Target Of Rapamycin). mTOR ist eine Serin/Threonin-Kinase, die als katalytische Untereinheit in zwei verschiedenen Signalkomplexen, mTORC1 und mTORC2, fungiert, die sich in den spezifischen Komponenten und durch ihre Downstream-Effektoren unterscheiden (Hay and Sonenberg 2004; Bhaskar and Hay 2007). Der mTOR-Signalweg ist an der Regulierung zentraler zellulärer Prozesse wie Glykolyse, Proteinsynthese, Zellwachstum, Proliferation, Entzündung, Differenzierung und Autophagie beteiligt (Wataya-Kaneda 2015). TSC2 wird durch den zellulären Energiestatus über AMPK reguliert und vermittelt Signale an mTOR-abhängige Downstream-Targets (Inoki et al. 2003b). Bei Energiemangel bildet es einen Komplex mit TSC1 und dient als Upstream-Inhibitor von mTORC1 durch Hemmung von Rheb (Ras homolog enriched in brain), einem direkten Upstream-Aktivator des mTORC1-Komplexes. Unter Nährstoffzufuhr wird TSC2 resultierend aus der Interaktion mit HERC1 abgebaut (Chong-Kopera et al. 2006). Der genaue Mechanismus des Abbaus von TSC2 ist bisher nicht geklärt. Eine schematische Darstellung der bekannten Prozesse und der mutmaßlichen Rolle von HERC1 findet sich in **Abbildung 2**.

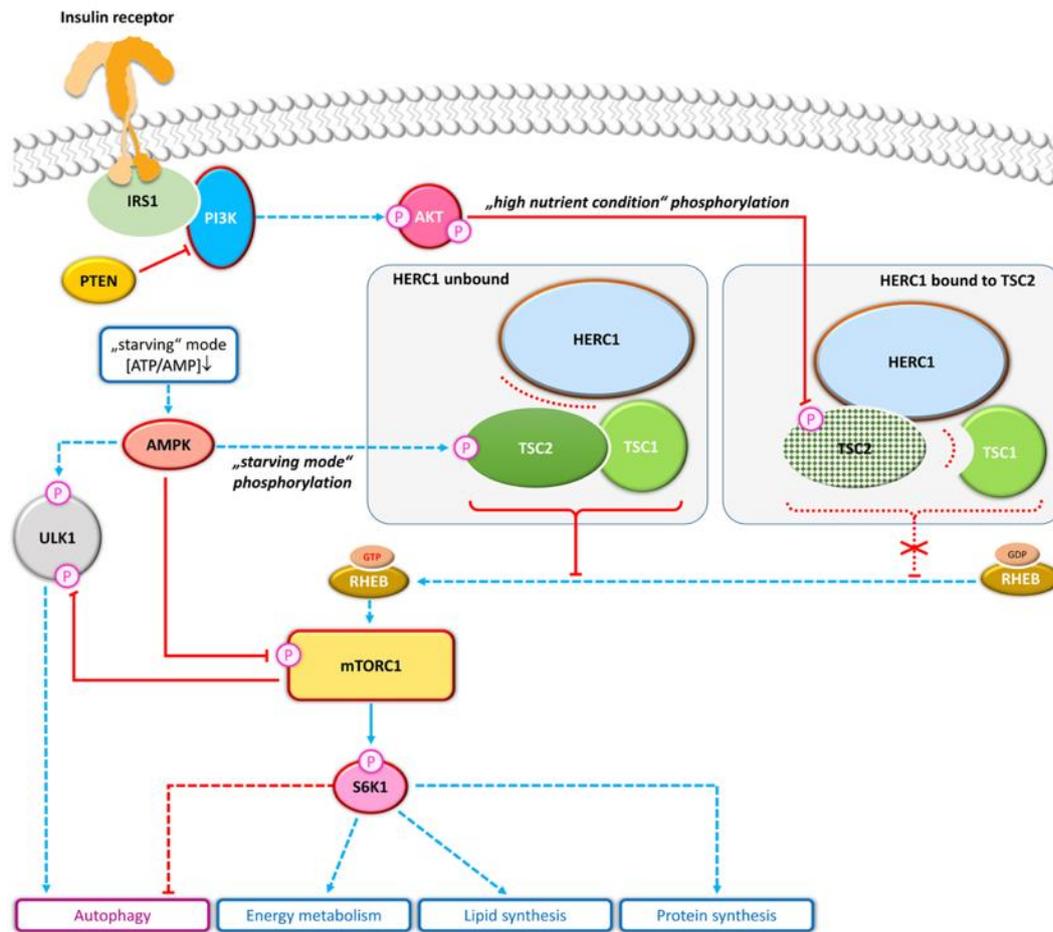


Abbildung 2 Schematische Darstellung wichtiger Komponenten des mTOR Signalweges und der mutmaßlichen Rolle von HERC1; Abbildung entnommen aus der Publikation (**Schwarz et al. 2020**). Rot gepunktete Linie, Proteine interagieren nicht; Rote durchgezogene Linie, Hemmung; Blaue gestrichelte Linie, Aktivierung. AKT1, AKT serine/threonine kinase 1; AMPK, AMP-Activated Protein Kinase; HERC1, HECT and RLD Domain Containing E3 Ubiquitin Protein Ligase Family Member 1, IRS1, Insulin Receptor Substrate 1; mTORC1, mammalian Target Of Rapamycin Complex 1; P, phosphate; PI3K, Phosphatidylinositol-4,5-Bisphosphate 3-Kinase; PTEN, Phosphatase and Tensin Homolog; RHEB, Ras Homolog Enriched in Brain; S6K1, Ribosomal Protein S6 Kinase B1; TSC1/2, Tuberous Sclerosis Protein 1 and 2; Ub, Ubiquitin; ULK1, Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase.

Deaktivierende Mutationen von entweder *TSC1* oder *TSC2* führen zu einer Hyperaktivierung des mTOR-Signalwegs und in der Folge zur Tuberösen Sklerose, einer Erkrankung, die durch gutartige Tumore (z.B. Rhabdomyome des Herzens, sublinguale Fibrome, Angioleiomyomatose der Nieren) in verschiedenen Organen des Körpers und neurologische Symptome wie Epilepsie, geistige Behinderung (engl. intellectual disability = ID) und Autismus-Spektrum-Störung (engl. autism-spectrum disease = ASD) gekennzeichnet ist (Curatolo et al. 2015; Wataya-Kaneda 2015). Mutationen in *HERC1* wurden mit dem zuvor bereits eingeführten MDFPMR Syndrom mit geistiger Behinderung, Krampfanfällen und Symptomen der ASD in Verbindung gebracht (Ortega-Recalde et al.

2015; Nguyen et al. 2016; Aggarwal et al. 2016; Utine et al. 2017) und teilen somit einige phänotypische Merkmale mit der Tuberösen Sklerose. Tumore wurden im Zusammenhang mit *HERC1* Mutationen bisher nicht beschrieben.

4.2 Methodik

4.2.1 Gesamtexom-Sequenzierung und Evaluation gefundener DNA-Varianten

Um eine mögliche krankheitsverursachende DNA-Veränderung zu detektieren, führten wir eine Gesamtexomsequenzierung durch. Dabei werden sämtliche proteinkodierenden Bereiche des Genoms gezielt amplifiziert und anschließend sequenziert. Dafür muss zunächst genomische DNA extrahiert werden, im vorliegenden Fall dienten periphere Leukozyten der beiden Patientinnen (II:1 und II:3) sowie einem gesunden Geschwister (II:4) als Ausgangspunkt für die DNA Extraktion. Die NGS-Sequenzierung selbst wurde als Dienstleistung durch ein großes kommerzielles Labor durchgeführt (BGI Genomics, Shenzhen, VR China). Ausgehend von den Rohdaten im FASTQ Format führte ich dann die weitere bioinformatische Aufarbeitung der Sequenzdaten durch. Die eingehende Analyse hinsichtlich des Krankheitspotentials gefundener Varianten wurde von mir zunächst semi-automatisch und dann für eine kleine Auswahl vielversprechender Varianten manuell durchgeführt. Die Segregation der zum Schluss verbliebenen, mutmaßlichen Krankheitsvariante wurde per Sanger-Sequenzierung in unserem Labor untersucht. Technische Details zur Sequenzierung und zur Prozessierung der Rohdaten vom FASTQ Format bis hin zur VCF-Datei mit allen Varianten, d.h. Abweichungen der sequenzierten DNA von einer Referenzsequenz, finden sich in der begleitenden Publikation (Schwarz et al. 2020).

4.2.2 Funktionelle Charakterisierung der *HERC1* Variante

Um die vermutete Pathogenität der detektierten DNA-Veränderung im *HERC1* Gen experimentell zu bestätigen, führte ich verschiedene Laboruntersuchungen an Fibroblasten der Patientin II:3 sowie an Fibroblasten dreier gesunder Kontrollprobanden durch. Die Untersuchungen habe ich, sofern nicht anders ausgewiesen, eigenständig konzipiert und durchgeführt. Durch zwei Kooperationen mit wissenschaftlichen Kollegen konnten darüber hinaus zusätzliche Experimente durchgeführt werden: Dr. Pedrazza und Prof. Dr. Rosa vom IDIBELL Barcelona, beides Experten im Bereich der *HERC1* Proteine, führten einen *HERC1* Western Blot durch mit von mir aus aus Fibroblasten der Patientin

II:3 und den drei Kontrollen isolierten Proteinlysaten. Da das HERC1 Protein sehr groß ist, stellt ein Western Blot besondere Anforderungen an die Laborausstattung und das experimentelle Handling, welche sämtlich in der Arbeitsgruppe um Prof. Dr. Rosa und Dr. Pedrazza vorhanden waren. Experimentelle Details und Ergebnisse zum HERC1 Western Blot finden sich in der Publikation (Schwarz et al. 2020). Prof. Dr. Stenzel aus dem Institut für Pathologie der Charité fertigte freundlicherweise sowohl elektronenmikroskopische als auch lichtmikroskopische Aufnahmen von Fibroblasten der Patientin II:3 und der gesunden Kontrollen an. Diese zusätzlichen Experimente fanden keinen Eingang in die Publikation, gaben mir jedoch interessante Denkanstöße für den möglichen Pathomechanismus der Mutation und die Konzeption der funktionellen Assays. Ich werde daher im Verlauf an geeigneter Stelle kurz näher darauf eingehen, auch wenn ich die eigentlichen Laborarbeiten nicht eigenständig durchgeführt habe.

4.2.2.1 Zellkultur

Als Ausgangspunkt für alle Untersuchungen wurden Fibroblasten der Patientin II:3 sowie dreier gesunder Kontrollen wie in der Publikation beschrieben kultiviert (Schwarz et al. 2020).

4.2.2.2 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Darstellung der subzellulären Lokalisierung des HERC1 Proteins führte ich verschiedene Immunfluoreszenzfärbungen (IF) durch. Dazu wurden jeweils 40.000 Zellen der Patientin II:3 und der gesunden Kontrollen in Kulturplatten mit 24 Vertiefungen (engl. *wells*), die teils mit Deckgläschen bestückt waren, ausgesät. Um im Verlauf verschiedene Antikörper-Verdünnungen testen zu können, habe ich für jede Probe mehrere Ansätze vorbereitet. Nach 24 Stunden Kultivierung zu Standardbedingungen war die gewünschte Konfluenz der Zellen von ca. 75-80% erreicht. Es folgte die Fixierung der Zellen mit eiskaltem 4% Paraformaldehyd (PFA), die Permeabilisierung mit 0,1% Triton-X für zehn Minuten und die Blockierung mit 10% normalem Ziegen Serum (engl. normal goat serum = NGS) verdünnt in phosphatgepufferter Salzlösung (engl. phosphate-buffered saline = PBS) für eine Stunde bei Raumtemperatur (RT). Anschließend wurden die Deckgläschen mit dem gegen HERC1 gerichteten Erstantikörper (Spezies: Kaninchen) in den Verdünnungen 1:50 und 1:100 bei 4°C über Nacht inkubiert. Die Inkubation mit dem Zweitantikörper in der Verdünnung 1:200 erfolgte für eine Stunde bei RT und im Dunkeln (Ziege anti-Kaninchen IgG H + L, gekoppelt an Alexa-Fluor 568). Ab diesem Arbeitsschritt sollten die Deckgläschen folglich möglichst wenig Licht ausgesetzt

sein, um ein zu rasches Ausbleichen der Fluoreszenz zu verhindern. Zum Schluss wurden die Deckgläschen mit DAPI Mount auf Objektträgern eingedeckt (engl. *mounting*). Dieses spezielle Eindeckmedium reduziert das sog. *photobleaching*, d.h. das Ausbleichen des Fluorophors durch Lichteinstrahlung und markiert zusätzlich die DNA in den Zellkernen blau. Die Fotos habe ich mit einem konfokalen Spinning-Disk-Mikroskop gemeinsam mit Prof. Dr. Schülke aufgenommen.

4.2.2.3 Proteinextraktion, Western Blot und SDS-Gelelektrophorese

Die Proteinextraktion erfolgte wie in der Publikation beschrieben. Für den Western Blot mit Antikörpern gegen RPS6KB1 (ribosomal protein S6 kinase B1, in der Folge kurz S6K1) und MAP1LC3B (Microtubule Associateated Protein 1 Light Chain 3 Beta, in der Folge kurz LC3B) im Rahmen der funktionellen Assays (siehe 4.2.2.4 mTOR Aktivitäts-Assay und Autophagie-Assay) musste ich zunächst die Bedingungen der Proteinextraktion und des Blotting-Vorgangs optimieren. Für die Untersuchung der mTOR Aktivität wurden die phosphorylierte sowie die nicht-phosphorylierte Form der S6K1 Kinase visualisiert. Die post-translationale Modifikation eines Proteins durch das Hinzufügen oder die Entfernung einer Phosphatgruppe ist ein dynamischer Vorgang. Die Behandlung der adhärent wachsenden Fibroblasten mit Trypsin, um sie vom Boden der Zellkulturflaschen zu lösen, könnte für die Zellen einen Stressreiz darstellen und im ungünstigsten Fall in einer ungewollten Verfälschung des Phosphorylierungsstatus resultieren. Daher entschied ich mich, für die Proteinextraktion die Zellen nicht wie sonst üblich, zunächst mit Hilfe von Trypsin vom Boden der Zellkulturflasche abzulösen, durch Zentrifugation zu pelletieren und im Anschluss in einer angemessenen Menge Lysepuffer zu resuspendieren. Stattdessen habe ich nach einem Waschschrift mit PBS direkt eine entsprechende Menge eisgekühlten RIPA Lysepuffers, versetzt mit Phosphataseinhibitor und Proteaseinhibitor, auf die Zellen gegeben, und diese dann mit einem Zellschaber vom Boden der Kulturflasche gelöst. Durch wiederholtes Vortexen wurden die Proben mechanisch weiter aufgeschlossen und homogenisiert und im Anschluss der Zelldebris durch Zentrifugation entfernt. Auf diese Weise sollten verfälschende Einflüsse durch das *Handling* der Zellen möglichst minimiert werden, da ab der Zugabe des eisgekühlten Lysepuffers inklusive Phosphataseinhibitor keine signifikanten Änderungen des Phosphorylierungsstatus mehr zu erwarten sind. Darüber hinaus erfolgten alle Schritte der Proteinextraktion mit gekühlten Lösungen sowie in einem Kühlraum mit

Umgebungstemperatur von 4°C, um ungewollte Degradierung der Proteine zu minimieren. Die Auftrennung der Proteine *via* Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (engl. sodium dodecylsulfate polyacrylamide gel electrophoresis = SDS-PAGE) erfolgte bei konstanter hoher Spannung von 200 Volt (V) um eine kurze Laufzeit zu gewährleisten. Dies stellte sich als vorteilhaft heraus, insbesondere um das LC3B Protein mit dem nur geringen Molekulargewicht von 16-18 kDa zufriedenstellend zu trennen. Die Tendenz kleinerer Proteine, im Gel in verschiedene Richtungen zu diffundieren, wird durch eine kürzere Laufzeit bei höherer Spannung reduziert, so dass schärfere Banden und somit eine höhere Auflösung resultieren.

Der Transfer der Proteine vom SDS-Gel auf eine Nitrozellulosemembran, sowie die anschließende Visualisierung der Proteine mit verschiedenen Antikörpern wird in der Publikation beschrieben. Ich habe die optimale Kombination von Stromstärke und Transferdauer für den Western Blot optimiert, um eine bestmögliche Darstellung von sowohl sehr kleinen Proteinen wie dem LC3B mit 16-18 kDa als auch von mittelgroßen Proteinen wie der S6K1 mit ca. 70 kDa zu gewährleisten. Dazu färbte ich das SDS-Gel nach dem Transfer mit Coomassie Blau, um die nach dem Blotten noch im Gel verbliebene Menge an Protein sichtbar zu machen. Ich variierte Transferdauer und Stromstärke, bis die optimale Einstellung gefunden war, bei der sowohl sehr kleine als auch mittelgroße Proteine in ausreichender Menge vom Gel auf die Membran transferiert wurden.

4.2.2.4 mTOR Aktivitäts-Assay und Autophagie-Assay

Die funktionellen Assays habe ich wie in der Publikation (Schwarz et al. 2020) beschrieben durchgeführt. Es wurden 200.000 Zellen pro Vertiefung (engl. *well*) einer 6-*well* Platte ausgesät und bis zu einer Konfluenz von ca. 60-70% kultiviert. Die optimale Zellzahl habe ich im Rahmen einiger Vorversuche ermittelt. Zu beachten ist, dass eine zu geringe Konfluenz in einer zu geringen Proteinausbeute resultiert, was die Visualisierung im Western Blot beeinträchtigt. Eine zu starke Konfluenz hingegen führt zur Kontaktinhibition, d.h. die Zellen werden in ihrem Wachstum gehemmt (Eagle and Levine 1967). Da die Kontaktinhibition u.a. über eine Deaktivierung des mTOR Signalwegs abläuft (Leontieva et al. 2014) und auch der Prozess der Autophagie herunterreguliert wird (Pavel et al. 2018), würde dies meine Ergebnisse verfälschen, weshalb ich für die geplante Untersuchung eine zu hohe Konfluenz vermieden habe. Ich testete verschiedene experimentelle Ansätze, bis ein guter Kompromiss aus

angemessener Konfluenz und resultierender Proteinkonzentration bzw. Signalstärke im Western Blot gefunden war. Neben der ausgesäten Zellzahl und der Dauer der Zellkultivierung bis zur Proteinextraktion optimierte ich auch das Volumen des Lysepuffers, welches ich zur Proteinextraktion (siehe 4.2.2.3 Proteinextraktion, Western Blot und SDS-Gelelektrophorese) verwendete. Hierzu musste ich einerseits genug Volumen verwenden, um die Zellen mechanisch von der Kulturplatte zu lösen und die Extrakte in Lösung zu bringen, andererseits durfte das Volumen nicht zu groß gewählt werden, da sonst die Proteinkonzentration für die anschließende SDS-PAGE und Visualisierung mittels Western Blot zu gering sein würde. Eine Beschreibung des endgültigen Vorgehens findet sich in der Publikation (Schwarz et al. 2020) im Methodik-Teil (2.5 Protein extraction und 2.8 Assay to track mTOR activity and autophagy).

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Ergebnisse der Exomsequenzierung und Variantenanalyse

Im WES-Datensatz habe ich eine homozygote *missense* Variante im *HERC1* Gen detektiert [15:g.63,907,989C>G GRCh37.p11 | c.14,072G>C NM_003922 | p.(Arg4,691Pro)], welche mutmaßlich die ursächliche Krankheitsmutation darstellt. Für eine detaillierte Beschreibung der zur Anwendung gekommenen Filterschritte und die Kriterien für die Bewertung der Pathogenität gefundener Varianten möchte ich auf die Publikation sowie den zugehörigen Anhang (*Supplementary material*) verweisen. Die *HERC1* Variante erfüllte die notwendigen Kriterien: **(i)** keine homozygote Präsenz in den Varianten-Datenbanken des *Exome Aggregation Consortium* (ExAC) und des *1000 Genomes Project* (1000G), **(ii)** nicht-synonymer Austausch einer Aminosäure im Protein (d.h. *nonsense*, *missense*, oder *splice site* Variante), **(iii)** Vorhersage als „krankheitsverursachend“ (*disease causing*) durch das Programm MutationTaster2 (Schwarz et al. 2014), und **(iv)** homozygote Präsenz in beiden Patientinnen und heterozygote Präsenz in den Eltern, verifiziert durch Sanger-Sequenzierung. Eine manuelle Recherche zur Funktion von *HERC1* und eventueller pathogener Implikationen förderte Publikationen zu Patient*innen mit Mutationen in *HERC1* zutage, deren Phänotyp teilweise mit dem Phänotyp unserer Patientinnen übereinstimmte. Auch nach den ACMG *Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants* kann die Variante als pathogen/krankheitsverursachend (*pathogenic*) eingestuft werden (Richards et al. 2015).

4.3.2 Ergebnisse des Western Blots und der Immunfluoreszenzfärbung

Durch die Kooperation mit Dr. Pedrazza und Prof. Dr. Rosa konnten wir mittels Proteingelelektrophorese und Western Blot nachweisen, dass **(i)** das HERC1 Protein in Fibroblasten der Patientin vorhanden ist, d.h. durch die Variante kommt es nicht zu einem Abbau der mRNA oder des Proteins und dass **(ii)** die Menge an HERC1 in Fibroblasten der Patientin größer war als in Kontrollfibroblasten, siehe **Fig. 2A** in der Publikation (Schwarz et al. 2020). Letzteres zeigte sich daran, dass bei der Patientenprobe im Western Blot eine deutlich stärkere Bande sichtbar war als bei den Proben der drei Kontrollen.

Die Immunfluoreszenzfärbung zeigte keinen Unterschied in der subzellulären Lokalisierung von HERC1 in Fibroblasten der Patientin im Vergleich zu Fibroblasten der gesunden Kontrollen (siehe dazu **Fig. 2B** (Schwarz et al. 2020)). Dies war in Anbetracht der Natur der Variante (Aminosäureaustausch in der HECT Domäne von HERC1) auch primär nicht anders zu erwarten.

4.3.3 Ergebnisse des mTOR Aktivitäts-Assays

Ziel der funktionellen Analysen war es, herauszufinden ob die vermutete Krankheitsmutation in *HERC1* (p.R4691P) zu einem Funktionsverlust oder zu einem Funktionsgewinn führt. Für das bessere Verständnis der Ergebnisse möchte ich zunächst noch genauer auf die relevanten Interaktionen und Komponenten des Signalnetzwerkes rund um HERC1 und mTOR eingehen. Wie in der Einleitung (siehe 4.1.4 Stand der Forschung: HERC1, mTOR und neuromuskuläre Erkrankungen) ausgeführt, interagiert HERC1 unter anderem mit TSC2 (Chong-Kopera et al. 2006) und dient somit als Upstream-Regulator des mTOR-Signalwegs. TSC2 bildet unter bestimmten Umständen einen Komplex mit TSC1 und hemmt dadurch mTORC1 (Inoki et al. 2003a). In Abwesenheit von TSC1 interagiert TSC2 jedoch mit HERC1 und TSC2 wird in der Folge degradiert (Chong-Kopera et al. 2006). mTORC1 wird nicht mehr durch TSC1/2 gehemmt, sondern ist aktiv. HERC1 kann somit als indirekter Aktivator von mTORC1 betrachtet werden. Aktives mTORC1 fungiert als Kinase und phosphoryliert u.a. S6K1 (Magnuson et al. 2012). Das Ausmaß der Phosphorylierung von S6K1 wurde in diesem Assay als Surrogat Marker für die mTORC1 Aktivität herangezogen. Im Falle einer Reduktion oder dem kompletten Verlust der HERC1 Funktion (*loss-of-function*) wäre auch mit einer reduzierten mTOR Aktivität, d.h. mehr unphosphoryliertes S6K1, zu rechnen. Umgekehrt würde ein aus der HERC1 Mutation resultierender Funktionsgewinn (*gain-of-function*) zu

einer verstärkten mTORC1 Aktivität führen, d.h. mehr phosphoryliertes S6K1 (in der Folge kurz als pS6K1 bezeichnet) führen.

Da bekannt ist, dass der mTOR Signalweg ein wichtiger Knotenpunkt ist für die Regulation von anabolem und katabolem Stoffwechsel (Magnuson et al. 2012), habe ich den Phosphorylierungsstatus von S6K1 in zwei verschiedenen experimentellen Ansätzen untersucht: **(i)** Induktion des katabolen Stoffwechsels durch Kultivierung der Zellen ohne Serumzusatz (0% FCS = *starving*) und **(ii)** Induktion des anabolen Stoffwechsels durch Kultivierung der Zellen mit Serumzusatz (15% FCS = *feeding*). Details zum experimentellen Prozedere finden sich in der Publikation und im Kapitel 4.2.2.4 mTOR Aktivitäts-Assay und Autophagie-Assay dieses Manteltextes.

Für die statistische Auswertung wiederholte ich das Experiment mehrfach nach einem identischen Protokoll. Die resultierenden Western Blots von n = 6 Wiederholungen analysierte ich semi-quantitativ und stellte die Ergebnisse deskriptiv-statistisch dar (siehe **Abbildung 3B**). In **Abbildung 3A** ist ein repräsentativer Western Blot von n = 2 Wiederholungen gezeigt.

Unter der *feeding* Kondition zeigte sich kein Unterschied in der mTOR Aktivität zwischen Patienten- und Kontrollfibroblasten, gemessen anhand des Phosphorylierungsstatus von S6K1. Es zeigt sich bei allen Proben ein deutliches pS6K1 Signal ohne einen signifikanten Unterschied zwischen Patientin und den Kontrollen. Für die Auswertung habe ich die Ratio von pS6K1 zu S6K1 gebildet und diese zwischen der Probe der Patientin (Px) und den Proben der Kontrollen (Co1, Co2, Co3) verglichen ($p = 0,7211$ im nicht-parametrischen Mann-Whitney Test mit 2 Freiheitsgraden).

Unter *starving* Bedingungen jedoch ist ein Unterschied sichtbar. Bei der Probe der Patientin (Px) erscheint ein deutlich stärkeres Signal von pS6K1 als bei den Kontrollen (Co1, Co2, Co3). Für die Auswertung habe ich die Ratio von phosphoryliertem S6K1 zu nicht-phosphoryliertem S6K1 gebildet. Das Verhältnis von pS6K1 (mTORC1 aktiv) zu S6K1 (mTORC1 inaktiv) ist bei der der Probe der Patientin (Px) erhöht. Der Unterschied zwischen Patientin und Kontrollen ist über n = 6 Wiederholungen signifikant ($p < 0,0001$ im Mann-Whitney Test mit 2 Freiheitsgraden). Folglich findet sich unter *starving* Bedingungen in Zellen der Patientin mehr mTOR Aktivität als in den Kontrollen.

4.3.4 Ergebnisse des Autophagie-Assays

Weiterhin untersuchte ich, ob in Fibroblasten der Patientin der Prozess der Autophagie möglicherweise gestört sein könnte. Man unterscheidet drei Arten der Autophagie: **(i)** die Mikroautophagie, **(ii)** die Chaperon-vermittelte Autophagie und **(iii)** die Makroautophagie (Hansen et al. 2018). Genauer eingehen möchte ich hier auf die Regulation der Makroautophagie, bei der zytoplasmatische Inhalte in Autophagolysosomen degradiert werden (Katabolismus) und der Zelle im Anschluss wieder als Bausteine zum Aufbau von Makromolekülen (Anabolismus) oder zur ATP-Gewinnung zur Verfügung stehen. mTORC1 spielt hier eine bedeutende Rolle, denn es ist gewissermaßen ein zentraler Schalter um Katabolismus und Anabolismus auszubalancieren. Dies geschieht unter anderem durch die feine Regulation des Prozesses der Autophagie. Ein niedriger Energiestatus der Zelle wird unter anderem durch die *AMP-Activated Protein Kinase* (AMPK) registriert und führt in der Folge durch Aktivierung von TSC2 zu einer Inaktivierung von mTORC1. So kann mTORC1 einerseits nicht die entsprechenden Signalkaskaden mit dem Ziel des Wachstums und der Proliferation aktivieren, andererseits wird neben der Wachstums- und Proliferationshemmung das Signal für die Autophagie heraufreguliert. Dafür ist *Unc-51 Like Autophagy Activating Kinase* (ULK1) wichtig. Bei anabolem Stoffwechsel (*feeding*), ist mTORC1 aktiv und phosphoryliert ULK1, welches dadurch inhibiert wird. Bei katabolem Stoffwechsel (*starving*) entfällt diese inhibierende Phosphorylierung durch mTORC1, wodurch ULK1 aktiv ist und den Prozess der Autophagie in Gang setzt (Kim et al. 2011; Wang and Zhang 2019).

Neben der mTOR Aktivität untersuchte ich auch den Prozess der Autophagie sowohl bei anabolem Stoffwechsel, d.h. Kultivierung der Zellen unter Zugabe von Serum, als auch bei katabolem Stoffwechsel, also Kultivierung der Zellen ohne Zugabe von Serum. Auf die verschiedenen Konditionen *feeding* und *starving* gehe ich im Methodenteil in Kapitel 4.2.2.4 mTOR Aktivitäts-Assay und Autophagie-Assay sowie in der Publikation genauer ein.

Ein Marker für den Autophagiestatus der Zelle ist das Protein LC3B. Autophagie ist ein mehrstufiger Prozess, an dessen Ende das zytosolische Protein LC3BI an Phosphatidylethanolamin (PE) gekoppelt und in die Membran des Autophagosoms eingebaut wird, bevor diese schlussendlich mit einem Lysosom zum Autophagolysosom verschmilzt (Kabeya et al. 2000; Kabeya et al. 2004; Sharifi et al. 2015). Die an PE gekoppelte, membrangefundene Form wird LC3BII genannt. Das Verhältnis von LC3BII

zu LC3BI kann genutzt werden, um das Ausmaß der stattfindenden Autophagie zu untersuchen (Mizushima and Yoshimori 2007; Klionsky et al. 2012). Dabei gilt, dass je mehr LC3BII im Verhältnis zu LC3BI entsteht, desto mehr Autophagosomen existieren, also desto mehr Autophagie stattfindet.

Unter *feeding* Konditionen zeigte sich kein Unterschied im Ausmaß der Autophagie zwischen Patienten- und Kontrollfibroblasten, gemessen mithilfe der Ratio LC3BII/I (siehe **Abbildung 3A,C**). Die Auswertung basiert auf n = 6 Wiederholungen des Experiments, im Mann-Whitney Test mit 2 Freiheitsgraden betrug der p-Wert 0,2509 (d.h. nicht signifikant).

Unter *starving* Konditionen zeigte sich jedoch, dass in den Fibroblasten der Patientin (Px) im Vergleich zu Kontrollfibroblasten (Co1, Co2, Co3) die Ratio von LC3II/I signifikant erniedrigt war (siehe **Abbildung 3A,C**). Die Auswertung der Banden für n = 6 Wiederholungen des Experiments erfolgte semi-quantitativ, der p-Wert im Mann-Whitney Test mit 2 Freiheitsgraden betrug 0,0007. Dies kann so interpretiert werden, dass im Verhältnis weniger LC3BI zu LC3BII umgewandelt wird, also weniger Autophagosomen gebildet werden und somit in der Summe weniger Autophagie stattfindet.

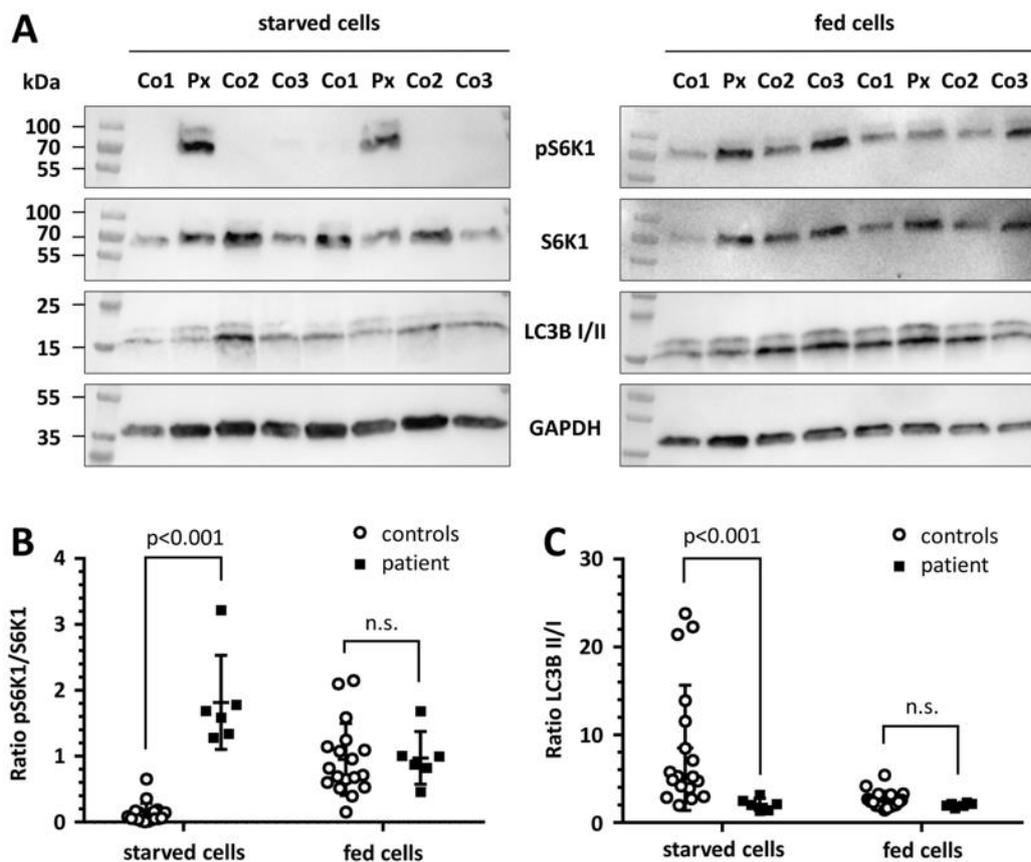


Abbildung 3 Ergebnisse der funktionellen Assays zur Messung von mTOR Aktivität und Autophagie in Fibroblasten der Patientin (Px) und gesunder Kontrollen (Co1, Co2, Co3), Abbildung entnommen aus (Schwarz et al. 2020). **(A)** Repräsentativer Western Blot zur Analyse des Phosphorylierungsstatus von S6K1, einer nachgeschalteten Komponente von mTORC1, und von LC3B I/II, einem Marker für Autophagosomen unter *starving* Kondition (links) und *feeding* Kondition (rechts). **(B)** Ergebnisse der densitometrischen Analyse der Western Blots zum S6K1 Phosphorylierungsstatus von n = 6 wiederholten Experimenten. **(C)** Ergebnisse der densitometrischen Analyse der Western Blots zum Autophagie-Marker LC3BI/II von n = 6 wiederholten Experimenten.

4.3.5 Diskussion experimenteller Limitationen, klinischer Implikationen und weiterführender Fragestellungen

Die Ergebnisse der Mutationsanalyse mit der Detektion einer homozygoten *missense* Variante in *HERC1* sowie die *in silico* Evaluation des Krankheitsheitspotentials wurden bereits ausführlich in der Publikation besprochen. Auch mögliche Assoziationen zwischen einer überschießenden mTOR Aktivität und den Symptomen Hochwuchs und Skoliose sowie eine eventuelle Verbindung zwischen fehlreguliertem TSC1/2 und Epilepsie, Autismus und geistiger Retardierung werden in der Publikation diskutiert.

Ich möchte an dieser Stelle kurz auf die Ergebnisse des *HERC1* Western Blots und genauer auf die Ergebnisse der funktionellen Assays, deren Limitation, mögliche

klinische Implikationen und weiterführende Fragestellungen sowie nicht in der Publikation dargestellte Experimente eingehen.

Im HERC1 Western Blot zeigte sich eine stärkere HERC1 Bande in der Probe der Patientin im Vergleich zu Kontrollen. Dies könnte bedeuten, dass der durch die Mutation entstehende Aminosäureaustausch zu einer verstärkten Stabilität des HERC1 Proteins führt. Es bleibt zu klären, wie genau sich der Aminosäureaustausch auf die Proteinstabilität auswirkt. Eine Möglichkeit wäre, dass durch eine veränderte dreidimensionale Struktur die Stabilität *per se* verändert wird. Es könnte ebenfalls sein, dass durch den Aminosäureaustausch Interaktionen mit anderen Proteinen, die normalerweise zum Proteinabbau führen, gestört werden.

Die Ergebnisse der Untersuchungen legen nahe, dass es durch die *missense* Mutation in *HERC1* zu einem Funktionsgewinn des Proteins kommt. Es stellt sich die Frage, ob eine möglicherweise verstärkte Stabilität an sich zum Funktionsgewinn von HERC1 führt, oder ob diese durch einen anderen Mechanismus entsteht. Dass es zu einem Funktionsgewinn kommt, schließen wir daraus, dass wir in Hautfibroblasten von Patientin II:3 bei katabolem Stoffwechsel eine abnorm starke mTORC1 Aktivität beobachten konnten, obwohl physiologischerweise das Gegenteil zu erwarten wäre. Passend dazu fand selbst bei kataboler Stoffwechsellage ungewöhnlich wenig Autophagie statt, auch hier sollte normalerweise das Gegenteil der Fall sein. Die geringe autophagische Aktivität kann mit einer abnorm hohen mTORC1 Aktivität erklärt werden, da aktives mTORC1 ein Gegenspieler der Autophagie ist. Bei der Autophagie handelt es sich um einen physiologischen Prozess, der essenziell ist zur Erhaltung der zellulären Homöostase (Kim et al. 2011; Hansen et al. 2018). Autophagie gewährleistet die Bereitstellung von Aminosäuren, Fetten und Kohlenhydraten auch in Zeiten niedriger externer Energie- oder Nährstoffzufuhr. Zu diesem Zwecke werden beispielsweise fehlgefaltete und aggregierte Proteine, nicht mehr benötigte Zellorganellen, Glykogen, aber auch pathogene Organismen wie Viren oder Bakterien in ihre Ausgangsbestandteile zerlegt (Katabolismus). Diese dienen einerseits der ATP- und somit Energiegewinnung, andererseits nutzt die Zelle sie als Substrate zum Aufbau neuer Makromoleküle wie Proteine, Nukleinsäuren, Glykogen oder Membranen (Anabolismus) (Boya et al. 2013). Daraus resultieren in der Summe Wachstum und Proliferation. Autophagie unterliegt einer fein austarierten Regulation und fungiert als wichtiger Schutzmechanismus der Zelle gegenüber Stress. Fehlregulierte oder gestörte Autophagie steht im

Zusammenhang mit zahlreichen, auch neurologischen Krankheiten wie zum Beispiel dem *Morbus Parkinson*, dem *Morbus Alzheimer* oder der Chorea Huntington (Rana et al. 2021).

Im Bestreben, etwaige pathologische Prozesse im Rahmen fehlregulierter Autophagie sichtbar zu machen, haben wir neben den in der Publikation dargestellten mTOR-Aktivitäts- und Autophagie-Assay zunächst elektronenmikroskopische und lichtmikroskopische Aufnahmen von Patientinnen- und Kontrollfibroblasten anfertigen lassen. Diese sind entstanden, nachdem die Zellen zuvor unter *feeding* Bedingungen kultiviert wurden. Um diffuse Unterschiede in Morphologie und Anzahl der Vakuolen in den Zellen zu quantifizieren, habe ich eine größere Anzahl (jeweils $n = 150$) von Zellen der Patientin und den Kontrollen auf lichtmikroskopischen Aufnahmen genauer untersucht. Ich habe mit dem Ziel einer Sichtbarmachung und möglicher Quantifizierung von Unterschieden in der Anzahl oder Größe von Vakuolen diese semi-automatisch mithilfe eines ImageJ Makros ausgezählt und vermessen. Für $n = 150$ Zellen pro Patientin bzw. pro Kontrolle zeigte sich jedoch kein signifikanter Unterschied in durchschnittlicher Größe und Anzahl von Vakuolen. Diese Untersuchung könnte wiederholt werden mit Aufnahmen von Zellen, die zuvor 24 Stunden unter *starving* Konditionen kultiviert wurden. Es ist nicht auszuschließen, dass ähnlich wie für die mTOR Aktivität und den Autophagiestatus Unterschiede erst dann sichtbar werden.

Eine Limitation des durchgeführten Autophagie-Assays liegt darin begründet, dass ich die Experimente ohne Einsatz eines lysosomalen Inhibitors wie Bafilomycin A oder Chloroquin durchgeführt habe. Die Bestimmung der Ratio von LC3BII/I stellt stets nur eine Momentaufnahme des autophagischen Fluxes dar, weil durch den Prozess der Autophagie auch das Autophago(lyso)som selbst und damit das sich in der Membran befindende LC3BII abgebaut wird. Eine erniedrigte Ratio von LC3BII zu LC3BI kann also theoretisch entweder im Sinne einer geringeren Bildung von LC3BII (d.h. Vorliegen von weniger Autophagosomen) interpretiert werden, oder aber im Sinne eines verstärkten Abbaus von Autophagolysosomen. Die Substanzen Bafilomycin A oder Chloroquin inhibieren einen der letzten Schritte des Abbaus der Autophagolysosomen und führen zur Akkumulation von LC3B (Barth et al. 2010; Klionsky et al. 2012). Somit kann die gesamte Menge an entstandenem LC3BII im Verhältnis zu LC3BI oder einem ubiquitären Kontrollprotein bestimmt werden. Eine geringere Ratio von LC3BII zu LC3BI würde hier dann eindeutig auf eine geringere Bildung von LC3BII hinweisen. Jedoch ist auch bekannt,

dass Substanzen wie Bafilomycin A in andere wichtige Signalwege und zelluläre Funktionen eingreifen (Redmann et al. 2016) und es ist kaum möglich, Zellen über einen längeren Zeitraum mit derartigen Substanzen zu kultivieren, ohne dass die Kultur zugrunde geht. Es wären somit ggf. andere verfälschende Ergebnisse zu berücksichtigen. Ich habe mich daher entschieden, zunächst ohne Zusätze wie Bafilomycin A zu arbeiten. In Zusammenschau mit den Ergebnissen zur Untersuchung Phosphorylierungsstatus von S6K1 und dem Befund der in der Patientin erhöhten mTOR Aktivität interpretiere ich die erniedrigte Ratio von LC3BII dahingehend, dass es sich um eine reduzierte Bildung von LC3BII handelt, dies wäre mechanistisch in Einklang zu bringen mit der erhöhten mTOR Aktivität. Um diese Frage sicher zu klären, müsste man eine Erweiterung des Assays dahingehend etablieren, dass die Zellen in einem zusätzlichen Ansatz mit Bafilomycin A oder einer vergleichbaren Substanz kultiviert werden.

Abgesehen vom mTOR-Aktivitäts- und Autophagie-Assay sind weiterführende Untersuchungen nötig, um den Pathomechanismus der gefundenen *HERC1* Mutation im Detail zu verstehen und eine Aussage zur klinischen Implikation dieser Arbeit machen zu können. mTOR ist ein zentraler Knotenpunkt in einem ganzen Netzwerk von Signalwegen. mTOR integriert intra- und extrazelluläre Informationen über den Energie- und Gesundheitsstatus der Zelle und kontrolliert die Balance zwischen Anabolismus und Katabolismus (Saxton and Sabatini 2017; Valvezan and Manning 2019). Neben Wachstum und Proliferation spielt mTOR auch eine zentrale Rolle für neuronale Plastizität, Lernen und Gedächtnisbildung (Jaworski and Sheng 2006). Die Regulation dieses ganzen Netzwerkes aus Signalwegen ist jedoch sehr komplex. Zusätzliche Untersuchungen weiterer Komponenten *up-* und *downstream* von *HERC1*, *TSC1/2* und *mTORC1* sind nötig, um die genaue Verknüpfung zwischen einem Funktionsgewinn von *HERC1*, der gesteigerten *mTORC1* Aktivität und den Symptomen im Rahmen des MDFPMR Syndroms aufzudecken. Hier ist denkbar, sowohl den Phosphorylierungsstatus (als Aktivitätsmarker für Kinasen) als auch die Proteinmenge an sich zu untersuchen, um eventuelle Unterschiede aufzudecken. Bezüglich des Einflusses der von *HERC1* Mutationen auf *TSC2* sollte bedacht werden, dass nicht nur die Stabilität des *TSC1/2* Komplexes (und damit dessen Menge) eine Rolle für die Pathogenese spielen kann, sondern auch die Lokalisation des *TSC1/2* Komplexes innerhalb der Zelle. Hinweise darauf ergeben sich aus einer Studie zum Wirkmechanismus der Insulinstimulation auf die *mTORC1* Aktivität. Menon und Kolleg*innen konnten zeigen, dass sich in einer HeLa-

Zellkultur unter Serumentzug der TSC1/2 Komplex zu großen Teilen auf der Oberfläche von Lysosomen befand, und zwar in räumlicher Nähe zum sich ebenfalls dort befindlichen mTORC1 Komplex (Menon et al. 2014). Nach Stimulation der Zellen mit dem Hormon Insulin (welches die Aktivität von mTORC1 erhöht) dissoziierte der TSC1/2 Komplex zu großen Teilen von der lysosomalen Membran ab. Die Autoren schlussfolgern daraus, dass die räumliche Anordnung von TSC1/2 in der Nähe von mTORC1 an der lysosomalen Membran unter Serumentzug (entspricht der *starving* Kondition) und dessen Insulin-stimulierte Dissoziation (entspricht annähernd der *feeding* Kondition) ein Mechanismus der mTORC1 Aktivierung sein könnte (Menon et al. 2014). Ein ähnlicher Mechanismus wäre grundsätzlich denkbar, um den Funktionsgewinn (bezogen auf mTORC1 Aktivität) der von uns detektierten *HERC1 missense* Mutation zu erklären. Die experimentelle Herangehensweise könnte sich auf Unterschiede von TSC1/2 in den unterschiedlichen subzellulären Kompartimenten konzentrieren (fraktionierte Proteinextraktion).

Von Interesse für weiterführende Experimente könnte auch sein, dass die präzise Kontrolle der katalytischen E3-Ubiquitinligaseaktivität von HECT Domänen auf dezidierten intramolekularen Interaktionen zwischen dem N- und dem C-terminalen Teil der HECT Domäne beruht (Fajner et al. 2017). Dies wurde zwar bislang nicht für *HERC1* selbst, aber für andere E3-Ubiquitinligasen mit HECT Domänen gezeigt (Wiesner et al. 2007). Es wäre denkbar, dass die von uns detektierte p.R4691P *HERC1 missense* Mutation aufgrund einer Verformung der 3D-Struktur eventuelle hemmende Interaktionen stört, insbesondere der HECT Domäne. Dadurch könnte die katalytische Hemmung verloren gehen in Situationen, wo diese physiologischer Weise eigentlich gewahrt bleiben sollte.

Genauere Einblicke in den Mechanismus der überschießenden mTOR Aktivität wären von großem Interesse im Hinblick auf eventuelle therapeutische Ansätze. Diese ergeben sich aus der vorliegenden Arbeit jedoch nicht unmittelbar. Mögliche Zielstrukturen einer medikamentösen Therapie könnten die E3-Ubiquitinligaseaktivität von *HERC1* oder mTOR selbst sein. Zwar gibt es mit der Substanz Rapamycin, auch bekannt unter dem Namen Sirolimus, einen für den medikamentösen Gebrauch zugelassenen mTOR Inhibitor (Rapamune®, Pfizer). Jedoch beschränkt sich sowohl in Europa als auch in den USA der indikationsgemäße Gebrauch auf den Einsatz als Immunsuppressivum für die Prophylaxe der Organabstoßung nach Nierentransplantation sowie die Behandlung der

sporadischen Lymphangioliomyomatose^{de}. Es gibt jedoch zahlreiche Untersuchungen (vor allem an Modellorganismen aber auch im Rahmen klinischer Studien mit Patient*innen) zu alternativen Einsatzmöglichkeiten, beispielsweise zur Reduktion des Tumorwachstums im Rahmen der Tuberösen Sklerose (Lee et al. 2005; Franz et al. 2006; Bissler et al. 2008) oder als Antiepileptikum bei verschiedenen Formen der angeborenen oder erworbenen Epilepsien (Zeng et al. 2009; Chi et al. 2017; Akman et al. 2021). Auch zur Behandlung der Epilepsie im Rahmen der Tuberösen Sklerose wurde der Einsatz von mTOR Inhibitoren untersucht. Der Einsatz von Everolimus, einem mTOR Inhibitor, als Begleittherapie zu einer antikonvulsiven Therapie im Rahmen der Phase 3 Studie EXIST-3 reduzierte die Last epileptischer Anfälle signifikant (French et al. 2016), was letztlich die Grundlage für eine Zulassung des Medikaments in der EU war^f.

So lange für das MDFPMR Syndrom der molekulare Pathomechanismus nicht aufgeklärt ist, scheinen Studien zum Einsatz eines mTOR Inhibitors verfrüht. Zwar ist in den Zellen unserer Patientinnen eine Überfunktion von mTOR zu beobachten. Jedoch ist nicht klar, wie genau diese vermittelt wird, und welche weiteren Komponenten des Signalnetzwerkes noch betroffen sind. Es erscheint paradox, dass Patient*innen sowohl mit einer *gain-of-function* Mutation in *HERC1* als auch mit *loss-of-function* Mutationen einen ähnlichen Phänotyp aufweisen. Eine ausführliche Zusammenstellung bislang publizierter Mutationen in *HERC1* und des phänotypischen Spektrums findet sich im Anhang (*supplementary material*) der Publikation (Schwarz et al. 2020). Möglicherweise gibt es Kompensations- oder *feedback* Mechanismen, die sowohl bei einem Funktionsgewinn als auch bei einem Funktionsverlust von *HERC1* zum Tragen kommen und in der Summe zu einer Überaktivierung von mTOR führen. Da jedoch für die übrigen bislang publizierten Mutationen keine funktionellen Untersuchungen zur mTOR Aktivität vorliegen, bleibt dies vorerst eine Hypothese. Es ist ebenfalls noch zu klären, über welchen Mechanismus genau *HERC1* zu einer Destabilisierung von *TSC2* führt, und wie sich die von uns detektierte *missense* Mutation darauf auswirkt. Möglicherweise führt nicht eine Störung der Interaktion von *TSC2* und *HERC1* zur mTOR Hyperaktivierung, sondern eine Störung seiner Funktion als E3-Ubiquitinligase bei der Interaktion von *HERC1* mit anderen Substraten. Fehler im Ubiquitin-Proteasom-System sind die Ursache zahlreicher neurologischer Erkrankungen und es ist denkbar, dass hier ebenfalls eine

^d https://www.accessdata.fda.gov/drugsatfda_docs/label/2017/021083s059,021110s076lbl.pdf (17.07.2021)

^e <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/rapamune> (17.07.2021)

^f <https://www.ema.europa.eu/en/medicines/human/EPAR/afinitor> (23.07.2021)

Ursache für den Phänotyp der Patientinnen begründet liegt. Da Patient*innen mit anderen mTOR aktivierenden Mutationen ein teilweise erhöhtes Tumorrisiko haben, sollte man empfehlen, die Patient*innen zu regelmäßigen Vorsorgeuntersuchungen vorzustellen.

Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die detektierte Variante in *HERC1* in Zellen einer Patientin mit MDFPMR Syndrom unter katabolen Stoffwechselbedingungen zu einer erhöhten Aktivität von mTORC1 und zu reduzierter Autophagie führt. Dies stellt einen Funktionsgewinn (*gain-of-function*) dar. mTORC1 ist ein maßgeblicher Treiber anaboler Stoffwechselforgänge, und ein wichtiger Regulator der zellulären Homöostase. Die detektierte Variante ist pathogenetisch vereinbar mit dem beobachteten Phänotyp bestehend aus Makrozephalie, Hochwuchs, Entwicklungsverzögerung und weiteren skelettären und neurologischen Auffälligkeiten. Mit diesen Ergebnissen haben wir erstmals einen grundlegenden Einblick in die molekulare Ursache der Entstehung dieses Krankheitsbildes gewonnen. Weitere Untersuchungen sind nötig, um den genauen Mechanismus zu klären und um sich daraus ergebende klinische Implikationen zu überprüfen. Für die Eltern der Patientin bedeutet das Wissen um die Ursache der Erkrankung ihrer Töchter, dass im Falle eines weiteren Kinderwunsches gegebenenfalls eine Pränataldiagnostik durchgeführt werden kann und für die Patientinnen, dass weitere belastende diagnostische Untersuchungen zur Findung der Ursache ihrer Erkrankung reduziert oder eingestellt werden können.

4.4 Literatur

- Abicht A, Neuhann T, Mehnert L, Rost I, Reis A, Zweier C, Holinski-Feder E (2019) Diagnostik seltener Erkrankungen mit „next generation sequencing“ – angekommen oder abgewehrt? *Med Genet* 31:335–343. <https://doi.org/10.1007/s11825-019-00258-3>
- Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR (2013) Predicting Functional Effect of Human Missense Mutations Using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet Editor Board Jonathan Haines AI 0 7:Unit7.20*. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg0720s76>
- Aggarwal S, Bhowmik AD, Ramprasad VL, Murugan S, Dalal A (2016) A splice site mutation in *HERC1* leads to syndromic intellectual disability with macrocephaly and facial dysmorphism: Further delineation of the phenotypic spectrum. *Am J Med Genet A* 170:1868–1873. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.37654>
- Aghamaleky Sarvestany A, Hunter G, Tavendale A, Lamont DJ, Llaverro Hurtado M, Graham LC, Wishart TM, Gillingwater TH (2014) Label-free quantitative proteomic profiling identifies disruption of ubiquitin homeostasis as a key driver of Schwann cell defects in spinal muscular atrophy. *J Proteome Res* 13:4546–4557. <https://doi.org/10.1021/pr500492j>
- Akman O, Briggs SW, Mowrey WB, Moshé SL, Galanopoulou AS (2021) Antiepileptogenic effects of rapamycin in a model of infantile spasms due to structural lesions. *Epilepsia*. <https://doi.org/10.1111/epi.16975>
- Amberger J, Bocchini CA, Scott AF, Hamosh A (2009) McKusick's Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Nucleic Acids Res* 37:D793-796. <https://doi.org/10.1093/nar/gkn665>
- Ärzteblatt DÄG Redaktion Deutsches (2018) Seltene Erkrankungen: Ethikrat bemängelt schlechte Versorgung. In: *Dtsch. Ärztebl.* <https://www.aerzteblatt.de/archiv/203795/Seltene-Erkrankungen-Ethikrat-bemaengelt-schlechte-Versorgung>. Accessed 14 May 2021
- Barth S, Glick D, Macleod KF (2010) Autophagy: assays and artifacts. *J Pathol* 221:117–124. <https://doi.org/10.1002/path.2694>
- Bhaskar PT, Hay N (2007) The Two TORCs and Akt. *Dev Cell* 12:487–502. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2007.03.020>
- Bissler JJ, McCormack FX, Young LR, Elwing JM, Chuck G, Leonard JM, Schmithorst VJ, Laor T, Brody AS, Bean J, Salisbury S, Franz DN (2008) Sirolimus for angiomyolipoma in tuberous sclerosis complex or lymphangiomyomatosis. *N Engl J Med* 358:140–151. <https://doi.org/10.1056/NEJMoa063564>
- Bogdanik LP, Sleight JN, Tian C, Samuels ME, Bedard K, Seburn KL, Burgess RW (2013) Loss of the E3 ubiquitin ligase *LRSAM1* sensitizes peripheral axons to degeneration in a mouse model of Charcot-Marie-Tooth disease. *Dis Model Mech* 6:780–792. <https://doi.org/10.1242/dmm.010942>
- Boya P, Reggiori F, Codogno P (2013) Emerging regulation and functions of autophagy.

Nat Cell Biol 15:713–720. <https://doi.org/10.1038/ncb2788>

Chi X, Huang C, Li R, Wang W, Wu M, Li J, Zhou D (2017) Inhibition of mTOR Pathway by Rapamycin Decreases P-glycoprotein Expression and Spontaneous Seizures in Pharmacoresistant Epilepsy. *J Mol Neurosci* MN 61:553–562. <https://doi.org/10.1007/s12031-017-0897-x>

Chong-Kopera H, Inoki K, Li Y, Zhu T, Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL, Guan K-L (2006) TSC1 Stabilizes TSC2 by Inhibiting the Interaction between TSC2 and the HERC1 Ubiquitin Ligase. *J Biol Chem* 281:8313–8316. <https://doi.org/10.1074/jbc.C500451200>

Curatolo P, Moavero R, de Vries PJ (2015) Neurological and neuropsychiatric aspects of tuberous sclerosis complex. *Lancet Neurol* 14:733–745. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00069-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00069-1)

Deng H-X, Chen W, Hong S-T, Boycott KM, Gorrie GH, Siddique N, Yang Y, Fecto F, Shi Y, Zhai H, Jiang H, Hirano M, Rampersaud E, Jansen GH, Donkervoort S, Bigio EH, Brooks BR, Ajroud K, Sufit RL, Haines JL, Mugnaini E, Pericak-Vance MA, Siddique T (2011) Mutations in UBQLN2 cause dominant X-linked juvenile and adult-onset ALS and ALS/dementia. *Nature* 477:211–215. <https://doi.org/10.1038/nature10353>

Dlamini N, Josifova DJ, Paine SML, Wraige E, Pitt M, Murphy AJ, King A, Buk S, Smith F, Abbs S, Sewry C, Jacques TS, Jungbluth H (2013) Clinical and neuropathological features of X-linked spinal muscular atrophy (SMAX2) associated with a novel mutation in the UBA1 gene. *Neuromuscul Disord* NMD 23:391–398. <https://doi.org/10.1016/j.nmd.2013.02.001>

Eagle H, Levine EM (1967) Growth Regulatory Effects of Cellular Interaction. *Nature* 213:1102–1106. <https://doi.org/10.1038/2131102a0>

Europäisches Parlament, Europäischer Rat (2000) Verordnung (EG) Nr. 141/2000 des Europäischen Parlaments und des Rates vom 16. Dezember 1999 über Arzneimittel für seltene Leiden. *Amtsbl Eur Gemeinschaften*

Fajner V, Maspero E, Polo S (2017) Targeting HECT-type E3 ligases - insights from catalysis, regulation and inhibitors. *FEBS Lett* 591:2636–2647. <https://doi.org/10.1002/1873-3468.12775>

Frank M, Eidt-Koch D, Aumann I, Reimann A, Wagner TOF, Graf von der Schulenburg J-M (2014) Maßnahmen zur Verbesserung der gesundheitlichen Situation von Menschen mit seltenen Erkrankungen in Deutschland: Ein Vergleich mit dem Nationalen Aktionsplan. *Bundesgesundheitsblatt - Gesundheitsforschung - Gesundheitsschutz* 57:1216–1223. <https://doi.org/10.1007/s00103-014-2040-2>

Franz DN, Leonard J, Tudor C, Chuck G, Care M, Sethuraman G, Dinopoulos A, Thomas G, Crone KR (2006) Rapamycin causes regression of astrocytomas in tuberous sclerosis complex. *Ann Neurol* 59:490–498. <https://doi.org/10.1002/ana.20784>

French JA, Lawson JA, Yapici Z, Ikeda H, Polster T, Nabbout R, Curatolo P, de Vries

- PJ, Dlugos DJ, Berkowitz N, Voi M, Peyrard S, Pelov D, Franz DN (2016) Adjunctive everolimus therapy for treatment-resistant focal-onset seizures associated with tuberous sclerosis (EXIST-3): a phase 3, randomised, double-blind, placebo-controlled study. *Lancet Lond Engl* 388:2153–2163. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)31419-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)31419-2)
- Garcia-Gonzalo FR, Cruz C, Muñoz P, Mazurek S, Eigenbrodt E, Ventura F, Bartrons R, Rosa JL (2003) Interaction between HERC1 and M2-type pyruvate kinase. *FEBS Lett* 539:78–84
- Garcia-Gonzalo FR, Rosa JL (2005) The HERC proteins: functional and evolutionary insights. *Cell Mol Life Sci CMLS* 62:1826–1838. <https://doi.org/10.1007/s00018-005-5119-y>
- Gieldon L, Mackenroth L, Kahlert A-K, Lemke JR, Pörmann J, Schallner J, Hagen M von der, Markus S, Weidensee S, Novotna B, Soerensen C, Klink B, Wagner J, Tzschach A, Jahn A, Kuhlee F, Hackmann K, Schrock E, Donato ND, Rump A (2018) Diagnostic value of partial exome sequencing in developmental disorders. *PLOS ONE* 13:e0201041. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0201041>
- Haendel M, Vasilevsky N, Unni D, Bologna C, Harris N, Rehm H, Hamosh A, Baynam G, Groza T, McMurry J, Dawkins H, Rath A, Thaxon C, Bocci G, Joachimiak MP, Köhler S, Robinson PN, Mungall C, Oprea TI (2020) How many rare diseases are there? *Nat Rev Drug Discov* 19:77–78. <https://doi.org/10.1038/d41573-019-00180-y>
- Hansen M, Rubinsztein DC, Walker DW (2018) Autophagy as a promoter of longevity: insights from model organisms. *Nat Rev Mol Cell Biol* 19:579–593. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0033-y>
- Hay N, Sonenberg N (2004) Upstream and downstream of mTOR. *Genes Dev* 18:1926–1945. <https://doi.org/10.1101/gad.1212704>
- Heemstra HE, de Vreeh RLA, van Weely S, Büller HA, Leufkens HGM (2008) Orphan drug development across Europe: bottlenecks and opportunities. *Drug Discov Today* 13:670–676. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.05.001>
- Hershko A, Ciechanover A (1998) The ubiquitin system. *Annu Rev Biochem* 67:425–479. <https://doi.org/10.1146/annurev.biochem.67.1.425>
- Huibregtse JM, Scheffner M, Beaudenon S, Howley PM (1995) A family of proteins structurally and functionally related to the E6-AP ubiquitin-protein ligase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92:2563–2567. <https://doi.org/10.1073/pnas.92.7.2563>
- Inoki K, Li Y, Xu T, Guan K-L (2003a) Rheb GTPase is a direct target of TSC2 GAP activity and regulates mTOR signaling. *Genes Dev* 17:1829–1834. <https://doi.org/10.1101/gad.1110003>
- Inoki K, Zhu T, Guan K-L (2003b) TSC2 mediates cellular energy response to control cell growth and survival. *Cell* 115:577–590
- Jaworski J, Sheng M (2006) The growing role of mTOR in neuronal development and

plasticity. *Mol Neurobiol* 34:205–219. <https://doi.org/10.1385/MN:34:3:205>

Kabeya Y, Mizushima N, Ueno T, Yamamoto A, Kirisako T, Noda T, Kominami E, Ohsumi Y, Yoshimori T (2000) LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* 19:5720–5728. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.21.5720>

Kabeya Y, Mizushima N, Yamamoto A, Oshitani-Okamoto S, Ohsumi Y, Yoshimori T (2004) LC3, GABARAP and GATE16 localize to autophagosomal membrane depending on form-II formation. *J Cell Sci* 117:2805–2812. <https://doi.org/10.1242/jcs.01131>

Kim J, Kundu M, Viollet B, Guan K-L (2011) AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nat Cell Biol* 13:132–141. <https://doi.org/10.1038/ncb2152>

Klionsky DJ, Abdalla FC, Abeliovich H, Abraham RT, Acevedo-Arozena A, Adeli K, Agholme L, Agnello M, Agostinis P, Aguirre-Ghiso JA, Ahn HJ, Ait-Mohamed O, Ait-Si-Ali S, Akematsu T, Akira S, Al-Younes HM, Al-Zeer MA, Albert ML, Albin RL, Alegre-Abarrategui J, Aleo MF, Alirezaei M, Almasan A, Almonte-Becerril M, Amano A, Amaravadi RK, Amarnath S, Amer AO, Andrieu-Abadie N, Anantharam V, Ann DK, Anoopkumar-Dukie S, Aoki H, Apostolova N, Arancia G, Aris JP, Asanuma K, Asare NYO, Ashida H, Askanas V, Askew DS, Auberger P, Baba M, Backues SK, Baehrecke EH, Bahr BA, Bai X-Y, Bailly Y, Baiocchi R, Baldini G, Balduini W, Ballabio A, Bamber BA, Bampton ETW, Juhász G, Bartholomew CR, Bassham DC, Bast RC, Batoko H, Bay B-H, Beau I, Béchet DM, Begley TJ, Behl C, Behrends C, Bekri S, Bellaire B, Bendall LJ, Benetti L, Berliocchi L, Bernardi H, Bernassola F, Besteiro S, Bhatia-Kissova I, Bi X, Biard-Piechaczyk M, Blum JS, Boise LH, Bonaldo P, Boone DL, Bornhauser BC, Bortoluci KR, Bossis I, Bost F, Bourquin J-P, Boya P, Boyer-Guittaut M, Bozhkov PV, Brady NR, Brancolini C, Brech A, Brenman JE, Brennand A, Bresnick EH, Brest P, Bridges D, Bristol ML, Brookes PS, Brown EJ, Brumell JH, Brunetti-Pierri N, Brunk UT, Bulman DE, Bultman SJ, Bultynck G, Burbulla LF, Bursch W, Butchar JP, Buzgariu W, Bydlowski SP, Cadwell K, Cahová M, Cai D, Cai J, Cai Q, Calabretta B, Calvo-Garrido J, Camougrand N, Campanella M, Campos-Salinas J, Candi E, Cao L, Caplan AB, Carding SR, Cardoso SM, Carew JS, Carlin CR, Carmignac V, Carneiro LAM, Carra S, Caruso RA, Casari G, Casas C, Castino R, Cebollero E, Cecconi F, Celli J, Chaachouay H, Chae H-J, Chai C-Y, Chan DC, Chan EY, Chang RC-C, Che C-M, Chen C-C, Chen G-C, Chen G-Q, Chen M, Chen Q, Chen SS-L, Chen W, Chen X, Chen X, Chen X, Chen Y-G, Chen Y, Chen Y, Chen Y-J, Chen Z, Cheng A, Cheng CHK, Cheng Y, Cheong H, Cheong J-H, Cherry S, Chess-Williams R, Cheung ZH, Chevet E, Chiang H-L, Chiarelli R, Chiba T, Chin L-S, Chiou S-H, Chisari FV, Cho CH, Cho D-H, Choi AMK, Choi D, Choi KS, Choi ME, Chouaib S, Choubey D, Choubey V, Chu CT, Chuang T-H, Chueh S-H, Chun T, Chwae Y-J, Chye M-L, Ciarcia R, Ciriolo MR, Clague MJ, Clark RSB, Clarke PGH, Clarke R, Codogno P, Collier HA, Colombo MI, Comincini S, Condello M, Condorelli F, Cookson MR, Coombs GH, Coppens I, Corbalan R, Cossart P, Costelli P, Costes S, Coto-Montes A, Couve E, Coxon FP, Cregg JM, Crespo JL, Cronjé MJ, Cuervo AM, Cullen JJ, Czaja MJ, D'Amelio M, Darfeuille-Michaud A, Davids LM, Davies FE, De Felici M, de Groot JF, de Haan CAM, De Martino L, De Milito A, De Tata V, Debnath J, Degterev A, Dehay

B, Delbridge LMD, Demarchi F, Deng YZ, Dengjel J, Dent P, Denton D, Deretic V, Desai SD, Devenish RJ, Di Gioacchino M, Di Paolo G, Di Pietro C, Díaz-Araya G, Díaz-Laviada I, Diaz-Meco MT, Diaz-Nido J, Dikic I, Dinesh-Kumar SP, Ding W-X, Distelhorst CW, Diwan A, Djavaheri-Mergny M, Dokudovskaya S, Dong Z, Dorsey FC, Dosenko V, Dowling JJ, Doxsey S, Dreux M, Drew ME, Duan Q, Duchosal MA, Duff KE, Dugail I, Durbeej M, Duszenko M, Edelstein CL, Edinger AL, Egea G, Eichinger L, Eissa NT, Ekmekcioglu S, El-Deiry WS, Elazar Z, Elgendy M, Ellerby LM, Eng KE, Engelbrecht A-M, Engelender S, Erenpreisa J, Escalante R, Esclatine A, Eskelinen E-L, Espert L, Espina V, Fan H, Fan J, Fan Q-W, Fan Z, Fang S, Fang Y, Fanto M, Fanzani A, Farkas T, Farre J-C, Faure M, Fechheimer M, Feng CG, Feng J, Feng Q, Feng Y, Fésüs L, Feuer R, Figueiredo-Pereira ME, Fimia GM, Fingar DC, Finkbeiner S, Finkel T, Finley KD, Fiorito F, Fisher EA, Fisher PB, Flajolet M, Florez-McClure ML, Florio S, Fon EA, Fornai F, Fortunato F, Fotedar R, Fowler DH, Fox HS, Franco R, Frankel LB, Fransen M, Fuentes JM, Fueyo J, Fujii J, Fujisaki K, Fujita E, Fukuda M, Furukawa RH, Gaestel M, Gailly P, Gajewska M, Galliot B, Galy V, Ganesh S, Ganetzky B, Ganley IG, Gao F-B, Gao GF, Gao J, Garcia L, Garcia-Manero G, Garcia-Marcos M, Garmyn M, Gartel AL, Gatti E, Gautel M, Gawriluk TR, Gegg ME, Geng J, Germain M, Gestwicki JE, Gewirtz DA, Ghavami S, Ghosh P, Giammarioli AM, Giatromanolaki AN, Gibson SB, Gilkerson RW, Ginger ML, Ginsberg HN, Golab J, Goligorsky MS, Golstein P, Gomez-Manzano C, Goncu E, Gongora C, Gonzalez CD, Gonzalez R, González-Estévez C, González-Polo RA, Gonzalez-Rey E, Gorbunov NV, Gorski S, Goruppi S, Gottlieb RA, Gozuacik D, Granato GE, Grant GD, Green KN, Gregorc A, Gros F, Grose C, Grunt TW, Gual P, Guan J-L, Guan K-L, Guichard SM, Gukovskaya AS, Gukovsky I, Gunst J, Gustafsson ÅB, Halayko AJ, Hale AN, Halonen SK, Hamasaki M, Han F, Han T, Hancock MK, Hansen M, Harada H, Harada M, Hardt SE, Harper JW, Harris AL, Harris J, Harris SD, Hashimoto M, Haspel JA, Hayashi S, Hazelhurst LA, He C, He Y-W, Hébert M-J, Heidenreich KA, Helfrich MH, Helgason GV, Henske EP, Herman B, Herman PK, Hetz C, Hilfiker S, Hill JA, Hocking LJ, Hofman P, Hofmann TG, Höhfeld J, Holyoake TL, Hong M-H, Hood DA, Hotamisligil GS, Houwerzijl EJ, Høyer-Hansen M, Hu B, Hu CA, Hu H-M, Hua Y, Huang C, Huang J, Huang S, Huang W-P, Huber TB, Huh W-K, Hung T-H, Hupp TR, Hur GM, Hurley JB, Hussain SNA, Hussey PJ, Hwang JJ, Hwang S, Ichihara A, Ilkhanizadeh S, Inoki K, Into T, Iovane V, Iovanna JL, Ip NY, Isaka Y, Ishida H, Isidoro C, Isobe K, Iwasaki A, Izquierdo M, Izumi Y, Jaakkola PM, Jäättelä M, Jackson GR, Jackson WT, Janji B, Jendrach M, Jeon J-H, Jeung E-B, Jiang H, Jiang H, Jiang JX, Jiang M, Jiang Q, Jiang X, Jiang X, Jiménez A, Jin M, Jin SV, Joe CO, Johansen T, Johnson DE, Johnson GVW, Jones NL, Joseph B, Joseph SK, Joubert AM, Juhász G, Juillerat-Jeanneret L, Jung CH, Jung Y-K, Kaarniranta K, Kaasik A, Kabuta T, Kadowaki M, Kâgedal K, Kamada Y, Kaminsky VO, Kampinga HH, Kanamori H, Kang C, Kang KB, Kang KI, Kang R, Kang Y-A, Kanki T, Kanneganti T-D, Kanno H, Kanthasamy AG, Kanthasamy A, Karantza V, Kaushal GP, Kaushik S, Kawazoe Y, Ke P-Y, Kehrl JH, Kelekar A, Kerkhoff C, Kessel DH, Khalil H, Kiel JAKW, Kiger AA, Kihara A, Kim DR, Kim D-H, Kim D-H, Kim E-K, Kim H-R, Kim J-S, Kim JH, Kim JC, Kim JK, Kim PK, Kim SW, Kim Y-S, Kim Y, Kimchi A, Kimmelman AC, King JS, Kinsella TJ, Kirkin V, Kirshenbaum LA, Kitamoto K, Kitazato K, Klein L, Klimecki WT, Klucken J, Knecht E, Ko BCB, Koch JC, Koga H, Koh J-Y, Koh YH, Koike M, Komatsu M, Kominami E, Kong HJ, Kong W-J, Korolchuk VI, Kotake Y, Koukourakis MI,

Flores JBK, Kovács AL, Kraft C, Krainc D, Krämer H, Kretz-Remy C, Krichevsky AM, Kroemer G, Krüger R, Krut O, Ktistakis NT, Kuan C-Y, Kucharczyk R, Kumar A, Kumar R, Kumar S, Kundu M, Kung H-J, Kurz T, Kwon HJ, La Spada AR, Lafont F, Lamark T, Landry J, Lane JD, Lapaquette P, Laporte JF, László L, Lavandero S, Lavoie JN, Layfield R, Lazo PA, Le W, Le Cam L, Ledbetter DJ, Lee AJX, Lee B-W, Lee GM, Lee J, Lee J, Lee M, Lee M-S, Lee SH, Leeuwenburgh C, Legembre P, Legouis R, Lehmann M, Lei H-Y, Lei Q-Y, Leib DA, Leiro J, Lemasters JJ, Lemoine A, Lesniak MS, Lev D, Levenson VV, Levine B, Levy E, Li F, Li J-L, Li L, Li S, Li W, Li X-J, Li Y-B, Li Y-P, Liang C, Liang Q, Liao Y-F, Liberski PP, Lieberman A, Lim HJ, Lim K-L, Lim K, Lin C-F, Lin F-C, Lin J, Lin JD, Lin K, Lin W-W, Lin W-C, Lin Y-L, Linden R, Lingor P, Lippincott-Schwartz J, Lisanti MP, Liton PB, Liu B, Liu C-F, Liu K, Liu L, Liu QA, Liu W, Liu Y-C, Liu Y, Lockshin RA, Lok C-N, Lonial S, Loos B, Lopez-Berestein G, López-Otín C, Lossi L, Lotze MT, Low P, Lu B, Lu B, Lu B, Lu Z, Luciano F, Lukacs NW, Lund AH, Lynch-Day MA, Ma Y, Macian F, MacKeigan JP, Macleod KF, Madeo F, Maiuri L, Maiuri MC, Malagoli D, Malicdan MCV, Malorni W, Man N, Mandelkow E-M, Manon S, Manov I, Mao K, Mao X, Mao Z, Marambaud P, Marazziti D, Marcel YL, Marchbank K, Marchetti P, Marciniak SJ, Marcondes M, Mardi M, Marfe G, Mariño G, Markaki M, Marten MR, Martin SJ, Martinand-Mari C, Martinet W, Martinez-Vicente M, Masini M, Matarrese P, Matsuo S, Matteoni R, Mayer A, Mazure NM, McConkey DJ, McConnell MJ, McDermott C, McDonald C, McInerney GM, McKenna SL, McLaughlin B, McLean PJ, McMaster CR, McQuibban GA, Meijer AJ, Meisler MH, Meléndez A, Melia TJ, Melino G, Mena MA, Menendez JA, Menna-Barreto RFS, Menon MB, Menzies FM, Mercer CA, Merighi A, Merry DE, Meschini S, Meyer CG, Meyer TF, Miao C-Y, Miao J-Y, Michels PAM, Michiels C, Mijaljica D, Milojkovic A, Minucci S, Miracco C, Miranti CK, Mitroulis I, Miyazawa K, Mizushima N, Mograbi B, Mohseni S, Molero X, Mollereau B, Mollinedo F, Momoi T, Monastyrska I, Monick MM, Monteiro MJ, Moore MN, Mora R, Moreau K, Moreira PI, Moriyasu Y, Moscat J, Mostowy S, Mottram JC, Moyal T, Moussa CE-H, Müller S, Muller S, Münger K, Münz C, Murphy LO, Murphy ME, Musarò A, Mysorekar I, Nagata E, Nagata K, Nahimana A, Nair U, Nakagawa T, Nakahira K, Nakano H, Nakatogawa H, Nanjundan M, Naqvi NI, Narendra DP, Narita M, Navarro M, Nawrocki ST, Nazarko TY, Nemchenko A, Netea MG, Neufeld TP, Ney PA, Nezis IP, Nguyen HP, Nie D, Nishino I, Nislow C, Nixon RA, Noda T, Noegel AA, Nogalska A, Noguchi S, Notterpek L, Novak I, Nozaki T, Nukina N, Nürnberger T, Nyfeler B, Obara K, Oberley TD, Oddo S, Ogawa M, Ohashi T, Okamoto K, Oleinick NL, Oliver FJ, Olsen LJ, Olsson S, Opota O, Osborne TF, Ostrander GK, Otsu K, Ou JJ, Ouimet M, Overholtzer M, Ozpolat B, Paganetti P, Pagnini U, Pallet N, Palmer GE, Palumbo C, Pan T, Panaretakis T, Pandey UB, Papackova Z, Papassideri I, Paris I, Park J, Park OK, Parys JB, Parzych KR, Patschan S, Patterson C, Pattingre S, Pawelek JM, Peng J, Perlmutter DH, Perrotta I, Perry G, Pervaiz S, Peter M, Peters GJ, Petersen M, Petrovski G, Phang JM, Piacentini M, Pierre P, Pierrefite-Carle V, Pierron G, Pinkas-Kramarski R, Piras A, Piri N, Plataniias LC, Pöggeler S, Poirot M, Poletti A, Poüs C, Pozuelo-Rubio M, Prætorius-Ibba M, Prasad A, Prescott M, Priault M, Produit-Zengaffinen N, Progulske-Fox A, Proikas-Cezanne T, Przedborski S, Przyklenk K, Puertollano R, Puyal J, Qian S-B, Qin L, Qin Z-H, Quaggin SE, Raben N, Rabinowich H, Rabkin SW, Rahman I, Rami A, Ramm G, Randall G, Randow F, Rao VA, Rathmell JC, Ravikumar B, Ray SK, Reed BH, Reed JC, Reggiori F, Régnier-Vigouroux A, Reichert AS,

Reiners JJ, Reiter RJ, Ren J, Revuelta JL, Rhodes CJ, Ritis K, Rizzo E, Robbins J, Roberge M, Roca H, Roccheri MC, Rocchi S, Rodemann HP, Rodríguez de Córdoba S, Rohrer B, Roninson IB, Rosen K, Rost-Roszkowska MM, Rouis M, Rouschop KMA, Rovetta F, Rubin BP, Rubinsztein DC, Ruckdeschel K, Rucker EB, Rudich A, Rudolf E, Ruiz-Opazo N, Russo R, Rusten TE, Ryan KM, Ryter SW, Sabatini DM, Sadoshima J, Saha T, Saitoh T, Sakagami H, Sakai Y, Salekdeh GH, Salomoni P, Salvaterra PM, Salvesen G, Salvioli R, Sanchez AMJ, Sánchez-Alcázar JA, Sánchez-Prieto R, Sandri M, Sankar U, Sansanwal P, Santambrogio L, Saran S, Sarkar S, Sarwal M, Sasakawa C, Sasnauskiene A, Sass M, Sato K, Sato M, Schapira AHV, Scharl M, Schätzl HM, Scheper W, Schiaffino S, Schneider C, Schneider ME, Schneider-Stock R, Schoenlein PV, Schorderet DF, Schüller C, Schwartz GK, Scorrano L, Sealy L, Seglen PO, Segura-Aguilar J, Seiliez I, Seleverstov O, Sell C, Seo JB, Separovic D, Setaluri V, Setoguchi T, Settembre C, Shacka JJ, Shanmugam M, Shapiro IM, Shaulian E, Shaw RJ, Shelhamer JH, Shen H-M, Shen W-C, Sheng Z-H, Shi Y, Shibuya K, Shidoji Y, Shieh J-J, Shih C-M, Shimada Y, Shimizu S, Shintani T, Shirihai OS, Shore GC, Sibirny AA, Sidhu SB, Sikorska B, Silva-Zacarin ECM, Simmons A, Simon AK, Simon H-U, Simone C, Simonsen A, Sinclair DA, Singh R, Sinha D, Sinicrope FA, Sirko A, Siu PM, Sivridis E, Skop V, Skulachev VP, Slack RS, Smaili SS, Smith DR, Soengas MS, Soldati T, Song X, Sood AK, Soong TW, Sotgia F, Spector SA, Spies CD, Springer W, Srinivasula SM, Stefanis L, Steffan JS, Stendel R, Stenmark H, Stephanou A, Stern ST, Sternberg C, Stork B, Strålfors P, Subauste CS, Sui X, Sulzer D, Sun J, Sun S-Y, Sun Z-J, Sung JJY, Suzuki K, Suzuki T, Swanson MS, Swanton C, Sweeney ST, Sy L-K, Szabadkai G, Tabas I, Taegtmeier H, Tafani M, Takács-Vellai K, Takano Y, Takegawa K, Takemura G, Takeshita F, Talbot NJ, Tan KSW, Tanaka K, Tanaka K, Tang D, Tang D, Tanida I, Tannous BA, Tavernarakis N, Taylor GS, Taylor GA, Taylor JP, Terada LS, Terman A, Tettamanti G, Thevissen K, Thompson CB, Thorburn A, Thumm M, Tian F, Tian Y, Tocchini-Valentini G, Tolkovsky AM, Tomino Y, Tönges L, Tooze SA, Tournier C, Tower J, Towns R, Trajkovic V, Travassos LH, Tsai T-F, Tschan MP, Tsubata T, Tsung A, Turk B, Turner LS, Tyagi SC, Uchiyama Y, Ueno T, Umekawa M, Umemiya-Shirafuji R, Unni VK, Vaccaro MI, Valente EM, Van den Berghe G, van der Klei IJ, van Doorn WG, van Dyk LF, van Egmond M, van Grunsven LA, Vandenabeele P, Vandenbergh WP, Vanhorebeek I, Vaquero EC, Velasco G, Vellai T, Vicencio JM, Vierstra RD, Vila M, Vindis C, Viola G, Viscomi MT, Voitsekhovskaja OV, von Haefen C, Votruba M, Wada K, Wade-Martins R, Walker CL, Walsh CM, Walter J, Wan X-B, Wang A, Wang C, Wang D, Wang F, Wang F, Wang G, Wang H, Wang H-G, Wang H-D, Wang J, Wang K, Wang M, Wang RC, Wang X, Wang XJ, Wang Y-J, Wang Y, Wang Z-B, Wang ZC, Wang Z, Wansink DG, Ward DM, Watada H, Waters SL, Webster P, Wei L, Wehl CC, Weiss WA, Welford SM, Wen L-P, Whitehouse CA, Whitton JL, Whitworth AJ, Wileman T, Wiley JW, Wilkinson S, Willbold D, Williams RL, Williamson PR, Wouters BG, Wu C, Wu D-C, Wu WKK, Wyttenbach A, Xavier RJ, Xi Z, Xia P, Xiao G, Xie Z, Xie Z, Xu D, Xu J, Xu L, Xu X, Yamamoto A, Yamamoto A, Yamashina S, Yamashita M, Yan X, Yanagida M, Yang D-S, Yang E, Yang J-M, Yang SY, Yang W, Yang WY, Yang Z, Yao M-C, Yao T-P, Yeganeh B, Yen W-L, Yin J-J, Yin X-M, Yoo O-J, Yoon G, Yoon S-Y, Yorimitsu T, Yoshikawa Y, Yoshimori T, Yoshimoto K, You HJ, Youle RJ, Younes A, Yu L, Yu L, Yu S-W, Yu WH, Yuan Z-M, Yue Z, Yun C-H, Yuzaki M, Zabirnyk O, Silva-Zacarin E, Zacks D, Zacksenhaus E, Zaffaroni N, Zakeri Z, Zeh, III HJ,

- Zeitlin SO, Zhang H, Zhang H-L, Zhang J, Zhang J-P, Zhang L, Zhang L, Zhang M-Y, Zhang XD, Zhao M, Zhao Y-F, Zhao Y, Zhao ZJ, Zheng X, Zhivotovsky B, Zhong Q, Zhou C-Z, Zhu C, Zhu W-G, Zhu X-F, Zhu X, Zhu Y, Zoladek T, Zong W-X, Zorzano A, Zschocke J, Zuckerbraun B (2012) Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* 8:445–544. <https://doi.org/10.4161/auto.19496>
- Lee L, Sudentas P, Donohue B, Asrican K, Worku A, Walker V, Sun Y, Schmidt K, Albert MS, El-Hashemite N, Lader AS, Onda H, Zhang H, Kwiatkowski DJ, Dabora SL (2005) Efficacy of a rapamycin analog (CCI-779) and IFN- γ in tuberous sclerosis mouse models. *Genes Chromosomes Cancer* 42:213–227. <https://doi.org/10.1002/gcc.20118>
- Leontieva OV, Demidenko ZN, Blagosklonny MV (2014) Contact inhibition and high cell density deactivate the mammalian target of rapamycin pathway, thus suppressing the senescence program. *Proc Natl Acad Sci* 111:8832–8837. <https://doi.org/10.1073/pnas.1405723111>
- Magnuson B, Ekim B, Fingar DC (2012) Regulation and function of ribosomal protein S6 kinase (S6K) within mTOR signalling networks. *Biochem J* 441:1–21. <https://doi.org/10.1042/BJ20110892>
- Meng L, Pammi M, Saronwala A, Magoulas P, Ghazi AR, Vetrini F, Zhang J, He W, Dharmadhikari AV, Qu C, Ward P, Braxton A, Narayanan S, Ge X, Tokita MJ, Santiago-Sim T, Dai H, Chiang T, Smith H, Azamian MS, Robak L, Bostwick BL, Schaaf CP, Potocki L, Scaglia F, Bacino CA, Hanchard NA, Wangler MF, Scott D, Brown C, Hu J, Belmont JW, Burrage LC, Graham BH, Sutton VR, Craigen WJ, Plon SE, Lupski JR, Beaudet AL, Gibbs RA, Muzny DM, Miller MJ, Wang X, Leduc MS, Xiao R, Liu P, Shaw C, Walkiewicz M, Bi W, Xia F, Lee B, Eng CM, Yang Y, Lalani SR (2017) Use of Exome Sequencing for Infants in Intensive Care Units: Ascertainment of Severe Single-Gene Disorders and Effect on Medical Management. *JAMA Pediatr* 171:e173438. <https://doi.org/10.1001/jamapediatrics.2017.3438>
- Menon S, Dibble CC, Talbott G, Hoxhaj G, Valvezan AJ, Takahashi H, Cantley LC, Manning BD (2014) Spatial Control of the TSC Complex Integrates Insulin and Nutrient Regulation of mTORC1 at the Lysosome. *Cell* 156:771–785. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2013.11.049>
- Micallef J, Blin O (2020) Orphan drug designation in Europe: A booster for the research and development of drugs in rare diseases. *Therapie* 75:133–139. <https://doi.org/10.1016/j.therap.2020.02.003>
- Mizushima N, Yoshimori T (2007) How to Interpret LC3 Immunoblotting. *Autophagy* 3:542–545. <https://doi.org/10.4161/auto.4600>
- Nguengang Wakap S, Lambert DM, Olry A, Rodwell C, Gueydan C, Lanneau V, Murphy D, Le Cam Y, Rath A (2020) Estimating cumulative point prevalence of rare diseases: analysis of the Orphanet database. *Eur J Hum Genet* 28:165–173. <https://doi.org/10.1038/s41431-019-0508-0>

- Nguyen LS, Schneider T, Rio M, Moutton S, Siquier-Pernet K, Verny F, Boddaert N, Desguerre I, Munich A, Rosa JL, Cormier-Daire V, Colleaux L (2016) A nonsense variant in *HERC1* is associated with intellectual disability, megalencephaly, thick corpus callosum and cerebellar atrophy. *Eur J Hum Genet EJHG* 24:455–458. <https://doi.org/10.1038/ejhg.2015.140>
- Ortega-Recalde O, Beltrán OI, Gálvez JM, Palma-Montero A, Restrepo CM, Mateus HE, Laissue P (2015) Biallelic *HERC1* mutations in a syndromic form of overgrowth and intellectual disability. *Clin Genet* 88:e1-3. <https://doi.org/10.1111/cge.12634>
- Pavel M, Renna M, Park SJ, Menzies FM, Ricketts T, Füllgrabe J, Ashkenazi A, Frake RA, Lombarte AC, Bento CF, Franze K, Rubinsztein DC (2018) Contact inhibition controls cell survival and proliferation via YAP/TAZ-autophagy axis. *Nat Commun* 9:2961. <https://doi.org/10.1038/s41467-018-05388-x>
- Ramser J, Ahearn ME, Lenski C, Yariz KO, Hellebrand H, von Rhein M, Clark RD, Schmutzler RK, Lichtner P, Hoffman EP, Meindl A, Baumbach-Reardon L (2008) Rare missense and synonymous variants in *UBE1* are associated with X-linked infantile spinal muscular atrophy. *Am J Hum Genet* 82:188–193. <https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2007.09.009>
- Rana T, Behl T, Sehgal A, Mehta V, Singh S, Bhatia S, Al-Harrasi A, Bungau S (2021) Exploring the Role of Autophagy Dysfunction in Neurodegenerative Disorders. *Mol Neurobiol*. <https://doi.org/10.1007/s12035-021-02472-0>
- Redmann M, Benavides GA, Berryhill TF, Wani WY, Ouyang X, Johnson MS, Ravi S, Barnes S, Darley-Usmar VM, Zhang J (2016) Inhibition of autophagy with bafilomycin and chloroquine decreases mitochondrial quality and bioenergetic function in primary neurons. *Redox Biol* 11:73–81. <https://doi.org/10.1016/j.redox.2016.11.004>
- 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* 17:405–423. <https://doi.org/10.1038/gim.2015.30>
- Rosa JL, Barbacid M (1997) A giant protein that stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins forms a cytosolic ternary complex with clathrin and Hsp70. *Oncogene* 15:1. <https://doi.org/10.1038/sj.onc.1201170>
- Rosa JL, Casaroli-Marano RP, Buckler AJ, Vilaró S, Barbacid M (1996) p619, a giant protein related to the chromosome condensation regulator *RCC1*, stimulates guanine nucleotide exchange on ARF1 and Rab proteins. *EMBO J* 15:4262–4273
- Rotin D, Kumar S (2009) Physiological functions of the HECT family of ubiquitin ligases. *Nat Rev Mol Cell Biol* 10:398–409. <https://doi.org/10.1038/nrm2690>
- Rusmini P, Sau D, Crippa V, Palazzolo I, Simonini F, Onesto E, Martini L, Poletti A

- (2007) Aggregation and proteasome: the case of elongated polyglutamine aggregation in spinal and bulbar muscular atrophy. *Neurobiol Aging* 28:1099–1111. <https://doi.org/10.1016/j.neurobiolaging.2006.05.015>
- Sánchez-Tena S, Cubillos-Rojas M, Schneider T, Rosa JL (2016) Functional and pathological relevance of HERC family proteins: a decade later. *Cell Mol Life Sci* 73:1955–1968. <https://doi.org/10.1007/s00018-016-2139-8>
- Saxton RA, Sabatini DM (2017) mTOR Signaling in Growth, Metabolism, and Disease. *Cell* 168:960–976. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.02.004>
- Schuelke M, Finckh B, Siermans EA, Ausems MG, Hübner C, von Moers A (2000) Ataxia with vitamin E deficiency: biochemical effects of malcompliance with vitamin E therapy. *Neurology* 55:1584–1586. <https://doi.org/10.1212/wnl.55.10.1584>
- Schwarz JM, Cooper DN, Schuelke M, Seelow D (2014) MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. *Nat Methods* 11:361–362. <https://doi.org/10.1038/nmeth.2890>
- Schwarz JM, Pedrazza L, Stenzel W, Rosa JL, Schuelke M, Straussberg R (2020) A new homozygous HERC1 gain-of-function variant in MDFPMR syndrome leads to mTORC1 hyperactivation and reduced autophagy during cell catabolism. *Mol Genet Metab* 131:126–134. <https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.08.008>
- Sharifi MN, Mowers EE, Drake LE, Macleod KF (2015) Measuring Autophagy in Stressed Cells. *Methods Mol Biol Clifton NJ* 1292:129–150. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-2522-3_10
- Sim N-L, Kumar P, Hu J, Henikoff S, Schneider G, Ng PC (2012) SIFT web server: predicting effects of amino acid substitutions on proteins. *Nucleic Acids Res* 40:W452–W457. <https://doi.org/10.1093/nar/gks539>
- Steinhaus R, Proft S, Schuelke M, Cooper DN, Schwarz JM, Seelow D (2021) MutationTaster2021. *Nucleic Acids Res*. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab266>
- Utine GE, Taşkıran EZ, Koşukcu C, Karaosmanoğlu B, Güleray N, Doğan ÖA, Kiper PÖŞ, Boduroğlu K, Alikasıfoğlu M (2017) HERC1 mutations in idiopathic intellectual disability. *Eur J Med Genet* 60:279–283. <https://doi.org/10.1016/j.ejmg.2017.03.007>
- Valvezan AJ, Manning BD (2019) Molecular logic of mTORC1 signalling as a metabolic rheostat. *Nat Metab* 1:321–333. <https://doi.org/10.1038/s42255-019-0038-7>
- Wang Y, Zhang H (2019) Regulation of Autophagy by mTOR Signaling Pathway. In: Qin Z-H (ed) *Autophagy: Biology and Diseases: Basic Science*. Springer, Singapore, pp 67–83
- Wataya-Kaneda M (2015) Mammalian target of rapamycin and tuberous sclerosis complex. *J Dermatol Sci* 79:93–100. <https://doi.org/10.1016/j.jdermsci.2015.04.005>

Wiesner S, Ogunjimi AA, Wang H-R, Rotin D, Sicheri F, Wrana JL, Forman-Kay JD (2007) Autoinhibition of the HECT-type ubiquitin ligase Smurf2 through its C2 domain. *Cell* 130:651–662. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.06.050>

Zeng L-H, Rensing NR, Wong M (2009) Developing Antiepileptogenic Drugs for Acquired Epilepsy: Targeting the Mammalian Target of Rapamycin (mTOR) Pathway. *Mol Cell Pharmacol* 1:124–129. <https://doi.org/10.4255/mcpharmacol.09.16>

5. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Jana Marie Schwarz, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Das MDFPMR Syndrom: Detektion und funktionelle Charakterisierung einer gain-of-function Mutation in HERC1 mit Einfluss auf mTOR Aktivität und Autophagie* | *The MDFPMR Syndrome: Detection and functional characterization of a gain-of-function mutation in HERC1 affecting mTOR activity and autophagy* selbständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet. Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden Erklärung angegeben sind. Für sämtliche im Rahmen der Dissertation entstandenen Publikationen wurden die Richtlinien des ICMJE (International Committee of Medical Journal Editors; www.icmje.org) zur Autorenschaft eingehalten. Ich erkläre ferner, dass ich mich zur Einhaltung der Satzung der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung Guter Wissenschaftlicher Praxis verpflichte.

Weiterhin versichere ich, dass ich diese Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form bereits an einer anderen Fakultät eingereicht habe.

Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§§156, 161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Berlin, 01.09.2021

Unterschrift

6. Anteilserklärung

Jana Marie Schwarz hatte an der folgenden Publikation den unten spezifizierten Anteil:

Jana Marie Schwarz, Leonardo Pedrazza, Werner Stenzel, Jose Luis Rosa, Markus Schuelke, Rachel Straussberg: A new homozygous *HERC1* gain-of-function variant in MDFPMR syndrome leads to mTORC1 hyperactivation and reduced autophagy during cell catabolism. *Molecular Genetics and Metabolism* Sep-Oct 2020;131(1-2):126-134. doi: 10.1016/j.ymgme.2020.08.008. Epub 2020 Sep 4. Impact Factor 2020 4,797

Anteilserklärung an der erfolgten Publikation

Jana Marie Schwarz führte folgende Arbeitsschritte durch:

- Analyse der Daten aus der Gesamtexomsequenzierung mittels *in silico* Methoden
 - *alignment, variant calling* (nach einem von Prof. Dr. Schülke optimierten Protokoll), sowie Selektion mutmaßlicher Kandidatengene und -varianten mittels Wahl und Anwendung geeigneter Filter
 - anschließende manuelle Begutachtung und Evaluation der Ergebnisse in Hinblick auf den klinischen Phänotyp der Patientinnen (zusammengefasst dargestellt als *Supplemental tables S1* und *S2*)
 - *in silico* Autozygotiekartierung aus Daten der Gesamtexomsequenzierung mit *HomozygosityMapper* (beispielhaft gezeigt in *Supplemental figure S1*)
- Ausführliche Literaturrecherche zur Funktion von *HERC1* zwecks Evaluation der final verbliebenen, wahrscheinlichen Krankheitsmutation; Zusammenfassung der Rechercheergebnisse sowie Erweiterung durch eine eigene Hypothese zum Pathomechanismus und Darstellung in Fig. 4
- Ausführliche Literaturrecherche zu bislang bekannten Mutationen in *HERC1* und verwandten bzw. klinisch ähnlichen Syndromen zwecks Einordnung des klinischen Phänotyps, Darstellung des *HERC1* Proteins und bekannten Mutationen in Fig. 1D, Darstellung des Vergleichs der mit *HERC1* Mutationen assoziierten, klinischen Phänotypen in *Supplemental table S3*
- Konzeption der Laborexperimente zur funktionellen Charakterisierung der Kandidatenvariante in *HERC1*, basierend auf Erkenntnissen der Literaturrecherche (in Rücksprache mit Prof. Dr. Schülke)

- Durchführung sämtlicher Zellkulturarbeiten an Fibroblasten von Patientin II:3 und gesunden Kontrollen (in Routineaufgaben gelegentlich unterstützt durch technische Assistentinnen z.B. bei urlaubsbedingter Abwesenheit)
- Durchführung der Immunfluoreszenzfärbungen von Fibroblasten der Patientin II:3 und gesunden Kontrollen (Darstellung in Fig. 2B), Aufnahme der Bilder gemeinsam mit Prof. Dr. Schülke
- Durchführung und Optimierung der Assays zur mTOR Aktivierung und Autophagie
- Durchführung und Optimierung der Western Blots mit Proteinextrakten aus den Assays zur mTOR Aktivierung und Autophagie, Visualisierung der Ergebnisse (beispielhaft dargestellt in Fig. 3A), nach Optimierung zwischenzeitlich punktuell in der Durchführung unterstützt durch eine studentische Hilfskraft
- Semiquantitative Auswertung der Western Blots aus den Assays zur mTOR Aktivierung und Autophagie mit ImageJ sowie statistische Auswertung der Ergebnisse (beschreibende Statistik), Darstellung der Ergebnisse in Fig. 3B und 3C. Die Einweisung in ImageJ erfolgte durch Prof. Dr. Schülke. Die statistische Auswertung erfolgte nach Rücksprache mit Carolin Hermann vom Institut für Biometrie und Klinische Epidemiologie der Charité.
- Kommunikation und logistische Organisation im Rahmen der Kooperation mit Prof. Dr. Rosa und Dr. Peddrizza aus Spanien sowie mit Prof. Dr. Stenzel (Charité Neuropathologie)
- Verfassen des Publikationstextes und Erstellung des *Supplemental material*, im Verlauf Mitarbeit durch Prof. Dr. Schülke und finale Genehmigung durch alle Ko-Autoren

Unterschrift der Doktorandin

7. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2018** Selected Editions: SCIE,SSCI
 Selected Categories: **"GENETICS and HEREDITY"** Selected Category
 Scheme: WoS

Gesamtanzahl: 173 Journale

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
1	NATURE REVIEWS GENETICS	36,697	43.704	0.079260
2	NATURE GENETICS	93,920	25.455	0.221380
3	TRENDS IN ECOLOGY & EVOLUTION	36,697	15.236	0.035920
4	MOLECULAR BIOLOGY AND EVOLUTION	46,915	14.797	0.092200
5	GENOME BIOLOGY	38,920	14.028	0.133310
6	Genome Medicine	5,264	10.886	0.023220
7	TRENDS IN GENETICS	11,959	10.627	0.021110
8	GENOME RESEARCH	39,240	9.944	0.079580
9	AMERICAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS	36,007	9.924	0.063650
10	Annual Review of Genetics	7,478	9.184	0.011380
11	GENES & DEVELOPMENT	54,563	8.990	0.072340
12	GENETICS IN MEDICINE	10,855	8.683	0.035800
13	MOLECULAR THERAPY	16,991	8.402	0.030050
14	Annual Review of Genomics and Human Genetics	2,537	7.914	0.006020
15	ONCOGENE	63,249	6.634	0.074600
16	GENOMICS PROTEOMICS & BIOINFORMATICS	1,612	6.597	0.004790
17	MUTATION RESEARCH-REVIEWS IN MUTATION RESEARCH	3,566	6.081	0.004090
18	JOURNAL OF MEDICAL GENETICS	12,417	5.899	0.016850
19	Molecular Autism	2,107	5.712	0.008000

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
20	AMERICAN JOURNAL OF MEDICAL GENETICS PART C-SEMINARS IN MEDICAL GENETICS	2,139	5.683	0.004860
21	Clinical Epigenetics	2,900	5.496	0.009690
22	CURRENT OPINION IN GENETICS & DEVELOPMENT	7,687	5.288	0.016910
23	PLoS Genetics	43,864	5.224	0.143490
24	HUMAN GENETICS	8,640	5.207	0.014490
25	Advances in Genetics	1,636	4.913	0.003180
26	Forensic Science International-Genetics	4,388	4.884	0.007040
27	Circulation-Cardiovascular Genetics	3,441	4.864	0.010500
28	Microbial Genomics	573	4.853	0.003040
29	JOURNAL OF MOLECULAR MEDICINE-JMM	7,195	4.746	0.010880
30	CANCER GENE THERAPY	2,842	4.681	0.003200
31	Journal of Genetics and Genomics	2,005	4.650	0.004740
32	HUMAN MOLECULAR GENETICS	39,859	4.544	0.069190
33	HUMAN MUTATION	13,037	4.453	0.024570
34	npj Genomic Medicine	305	4.422	0.001620
35	Epigenomics	2,555	4.404	0.007650
36	JOURNAL OF INHERITED METABOLIC DISEASE	5,868	4.287	0.008410
37	Epigenetics & Chromatin	1,623	4.185	0.007590
38	Epigenetics	5,480	4.173	0.013400
39	CLINICAL GENETICS	7,288	4.104	0.014560
40	Plant Genome	1,425	4.042	0.003320

Rank	Full Journal Title	Total Cites	Journal Impact Factor	Eigenfactor Score
41	DNA RESEARCH	2,996	4.000	0.005130
42	MOLECULAR PHYLOGENETICS AND EVOLUTION	19,188	3.992	0.028460
43	THEORETICAL AND APPLIED GENETICS	20,017	3.926	0.013530
44	HUMAN GENE THERAPY	5,639	3.855	0.007540
45	GENE THERAPY	7,223	3.749	0.007040
46	Genome Biology and Evolution	6,587	3.726	0.026090
47	DNA REPAIR	5,058	3.711	0.011920
48	Orphanet Journal of Rare Diseases	6,654	3.687	0.015860
49	EUROPEAN JOURNAL OF HUMAN GENETICS	9,874	3.650	0.023500
50	Mobile DNA	725	3.630	0.003620
51	MOLECULAR GENETICS AND METABOLISM	7,018	3.610	0.009900
52	EVOLUTION	31,677	3.573	0.029010
53	GENETICS	41,941	3.564	0.047260
54	JOURNAL OF HUMAN GENETICS	4,124	3.545	0.008270
55	CHROMOSOMA	3,180	3.530	0.004730
56	Frontiers in Genetics	7,448	3.517	0.026160
57	PHARMACOGENOMICS JOURNAL	2,744	3.503	0.004600
58	BMC GENOMICS	39,876	3.501	0.095280
59	CURRENT GENETICS	3,641	3.464	0.003760
60	MITOCHONDRION	3,539	3.449	0.006690
61	Genes	3,103	3.331	0.009570
62	FUNGAL GENETICS AND BIOLOGY	5,736	3.314	0.007110

8. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

8.1 Schwarz, J.M., Pedrazza, L., Stenzel, W., Rosa, J.L., Schuelke, M., Straussberg, R.: A new homozygous HERC1 gain-of-function variant in MDFPMR syndrome leads to mTORC1 hyperactivation and reduced autophagy during cell catabolism. Mol Genet Metab. 2020;131(1-2):126-34.

<https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.08.008>

9. Lebenslauf

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht

10. Komplette Publikationsliste

2021

Schwarz, J.M., Lüpken, R., Seelow, D., Kehr, B.: **Novel sequencing technologies and bioinformatic tools for deciphering the non-coding genome.** Medizinische Genetik 2021; 33(2):133-145.

DOI: [10.1515/medgen-2021-2072](https://doi.org/10.1515/medgen-2021-2072) Journal Impact Factor 2019: 0,964

Garda, S., Schwarz, J.M., Schuelke, M., Leser, U., Seelow, D.: **Public data sources for regulatory genomic features.** Medizinische Genetik, 2021;33(2):167-177.

DOI: [10.1515/medgen-2021-2075](https://doi.org/10.1515/medgen-2021-2075) Journal Impact Factor 2019: 0,964

Steinhaus, R., Proft, S., Schuelke, M., Cooper, D.N., Schwarz, J.M., Seelow, D.: **MutationTaster2021.**

Nucleic Acids Res. 2021;epub:epub.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/33893808?dopt=Citation>

DOI: [10.1093/nar/gkab266](https://doi.org/10.1093/nar/gkab266) Journal Impact Factor 2020: 16,971

2020

Schwarz, J.M., Pedrazza, L., Stenzel, W., Rosa, J.L., Schuelke, M., Straussberg, R.: **A new homozygous HERC1 gain-of-function variant in MDFPMR syndrome leads to mTORC1 hyperactivation and reduced autophagy during cell catabolism.**

Mol Genet Metab. 2020;131(1-2):126-134.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32921582?dopt=Citation>

DOI: [10.1016/j.ymgme.2020.08.008](https://doi.org/10.1016/j.ymgme.2020.08.008) Journal Impact Factor 2020: 4,797

Lee, C.Y., Petkova, M., Morales-Gonzalez, S., Gimber, N., Schmoranzner, J., Meisel, A., Böhmerle, W., Stenzel, W., Schuelke, M., Schwarz, J.M.:

A spontaneous missense mutation in the chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (CHD8) gene: a novel association with congenital myasthenic syndrome.

Neuropath Appl Neuro. 2020;46(6):588-601.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32267004?dopt=Citation>

DOI: [10.1111/nan.12617](https://doi.org/10.1111/nan.12617) Journal Impact Factor 2020: 8,090

2019

Hombach, D., Schuelke, M., Knierim, E., Ehmke, N., Schwarz, J.M., Fischer-Zirnsak, B., Seelow, D.:

MutationDistiller: user-driven identification of pathogenic DNA variants.

Nucleic Acids Res. 2019;47(W1):W114-120.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31106342?dopt=Citation>

DOI: [10.1093/nar/gkz330](https://doi.org/10.1093/nar/gkz330) Journal Impact Factor 2020: 16,971

Hombach, D.[§], Schwarz, J.M.[§], Knierim, E., Schuelke, M., Seelow, D., Köhler, S.:

Phenotero: Annotate as you write.

Clin Genet. 2019;95(2):287-292.

[§] geteilte Erstautorenschaft (*contributed equally*)

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30417324?dopt=Citation>
DOI: [10.1111/cge.13471](https://doi.org/10.1111/cge.13471) Journal Impact Factor 2020: 4,438

Schwarz, J.M., Hombach, D., Köhler, S., Cooper, D.N., Schuelke, M., Seelow, D.:
RegulationSpotter: annotation and interpretation of extratranscriptic DNA variants.
Nucleic Acids Res. 2019;47(W1):W106-113.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31106382?dopt=Citation>
DOI: [10.1093/nar/gkz327](https://doi.org/10.1093/nar/gkz327) Journal Impact Factor 2020: 16,971

2017

Schottmann, G., Picker-Minh, S., Schwarz, J.M., Gill, E., Rodenburg, R.J.T., Stenzel, W.,
Kaindl, A.M., Schuelke, M.:

Recessive mutation in EXOSC3 associates with mitochondrial dysfunction and pontocerebellar hypoplasia.

Mitochondrion. 2017;37:46-54.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28687512?dopt=Citation>
DOI: [10.1016/j.mito.2017.06.007](https://doi.org/10.1016/j.mito.2017.06.007) Journal Impact Factor 2020: 4,160

2016

Hombach, D., Schwarz, J.M., Robinson, P.N., Schuelke, M., Seelow, D.:

A systematic, large-scale comparison of transcription factor binding site models.

BMC Genomics. 2016;17:388.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27209209?dopt=Citation>
DOI: [10.1186/s12864-016-2729-8](https://doi.org/10.1186/s12864-016-2729-8) Journal Impact Factor 2020: 3,969

Hombach, D., Schwarz, J.M., Robinson, P.N., Schuelke, M., Seelow, D.:

Erratum to: A systematic, large-scale comparison of transcription factor binding site models.

BMC Genomics. 2016;17(1):502.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27440159?dopt=Citation>
DOI: [10.1186/s12864-016-2818-8](https://doi.org/10.1186/s12864-016-2818-8) Journal Impact Factor 2020: 3,969

2014

Schwarz, J.M., Cooper, D.N., Schuelke, M., Seelow, D.:

MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age.

Nat Methods. 2014;11(4):361-2.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24681721?dopt=Citation>
DOI: [10.1038/nmeth.2890](https://doi.org/10.1038/nmeth.2890) Journal Impact Factor 2020: 28,547

2013

Knierim, E., Schwarz, J.M., Schuelke, M., Seelow, D.:

CNVinspector: a web-based tool for the interactive evaluation of copy number variations in single patients and in cohorts.

J Med Genet. 2013;50(8):529-33.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23729504?dopt=Citation>
DOI: [10.1136/jmedgenet-2012-101497](https://doi.org/10.1136/jmedgenet-2012-101497) Journal Impact Factor 2020: 6,318

2011

Knierim, E., Lucke, B., Schwarz, J.M., Schuelke, M., Seelow, D.:
Systematic comparison of three methods for fragmentation of long-range PCR products for next generation sequencing.

PLoS ONE. 2011;6(11):e28240.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22140562?dopt=Citation>

DOI: [10.1371/journal.pone.0028240](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028240) Journal Impact Factor 2020: 3,240

2010

Schwarz, J.M., Rödelsperger, C., Schuelke, M., Seelow, D.:
MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations.

Nat Methods. 2010;7(8):575-6.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20676075?dopt=Citation>

DOI: [10.1038/nmeth0810-575](https://doi.org/10.1038/nmeth0810-575) Journal Impact Factor 2020: 28,547

2008

Seelow, D., Schwarz, J.M., Schuelke, M.:
GeneDistiller--distilling candidate genes from linkage intervals.

PLoS ONE. 2008;3(12):e3874.

Pubmed: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19057649?dopt=Citation>

DOI: [10.1371/journal.pone.0003874](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0003874) Journal Impact Factor 2020: 3,240

11. Danksagung

Mein herzlicher Dank gilt Prof. Dr. med. Markus Schülke, der Ko-Betreuer dieser Dissertation und mein wissenschaftlicher Mentor und Begleiter seit vielen Jahren ist. Er hat nicht nur von der ersten Sekunde an daran geglaubt, dass ich das Zweitstudium der Humanmedizin meistern werde und mich in sämtlichen Situationen auf meinem Weg zur Ärztin unterstützt. Er hat mich darüber hinaus auch unerschütterlich in meinen verschiedenen wissenschaftlichen Bestrebungen bestärkt. Durch seine Leidenschaft für Forschung und Medizin hat er mir vorgelebt, was translationales Denken und Handeln in der Praxis heißt und mich immer wieder aufs Neue inspiriert. Ich danke ihm für die Überlassung des interessanten und lehrreichen Dissertationsprojekts und dafür, dass er mir die Freiheit und Zeit gegeben hat, dieses in aller Gründlichkeit und Tiefe zu bearbeiten. Ich danke ihm für sein Vertrauen.

Mein Dank gilt ebenfalls meiner Betreuerin PD. Dr. med. Ellen Knierim. Sie ist mein Vorbild für die erfolgreiche Vereinbarung von Forschung und Klinik und ein steter Ansporn für die Erreichung meiner Ziele.

Allen aktuellen und ehemaligen Kolleginnen und Kollegen aus der Arbeitsgruppe Schülke möchte ich ebenfalls danken für die stete Unterstützung und das angenehme und freundliche Arbeitsklima. Besonders hervorheben möchte ich an dieser Stelle Esther Gill, Franziska Seifert, Susanne Morales-Gonzalez und Dominik Seelow.

Meiner Familie und insbesondere meinem Partner Martin Daßinnies und meinen beiden Kindern Rosalie und Oscar möchte ich ebenfalls aus tiefstem Herzen danken. Dafür, dass sie mich durch alle stressigen Zeiten hindurch begleitet und unterstützt haben und mich immer noch fest in ihrem Herzen tragen.