

Aus dem Institut für Vegetative Anatomie
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

**Charakterisierung von Cohen-Syndrom-assoziierten *missense*-
Varianten**

zur Erlangung des akademischen Grades
Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Malte William Michael Zorn

aus Berlin

Datum der Promotion:

23.06.2019

*Für
Johann und Julius*

Inhaltsverzeichnis

INHALTSVERZEICHNIS	II
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VI
TABELLENVERZEICHNIS	VII
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VIII
ZUSAMMENFASSUNG	1
SUMMARY	2
1 EINLEITUNG	3
1.1 PRÄVALENZ DES COHEN-SYNDROMS.....	3
1.2 KLINIK DES COHEN-SYNDROMS	4
1.2.1 <i>Entwicklungsstadien des Cohen-Syndroms</i>	4
1.2.2 <i>Charakteristik der fazialen Dysmorphie</i>	5
1.2.3 <i>Progressive Retinopathie und Myopie</i>	6
1.2.4 <i>Klinische Zeichen des Bewegungsapparates</i>	7
1.2.5 <i>Motorische und Neurologische Besonderheiten</i>	7
1.2.6 <i>Kognition und Verhalten</i>	8
1.2.7 <i>Zyklische Neutropenie</i>	9
1.2.8 <i>Weitere fakultative klinische Merkmale</i>	9
1.3 DIFFERENTIALDIAGNOSEN	9
1.4 THERAPIE	10
1.5 DAS GEN <i>COH1</i>	10
1.6 POLYMORPHISMEN UND MUTATIONEN	11
1.7 PHÄNOTYP-GENOTYP-KORRELATION.....	15
1.8 ZELLBIOLOGIE VON <i>COH1</i>	15
1.8.1 <i>Funktion des Golgi-Apparates</i>	16
1.8.2 <i>Molekulare Struktur des Golgi-Apparates</i>	18
1.8.3 <i>Subzelluläre Lokalisation von COH1</i>	19
1.8.4 <i>Molekulare Veränderungen bei COH1-Defizienz</i>	20
1.9 ZIELSTELLUNG	20
2 MATERIAL UND METHODEN	21
2.1 MATERIAL.....	21
2.1.1 <i>Vektoren</i>	21
2.1.2 <i>Primer</i>	22
2.1.3 <i>Lösungen, Puffer und Medien</i>	24

2.1.4	Enzyme.....	25
2.1.5	Transfektionsagencien.....	26
2.1.6	Antikörper.....	26
2.1.7	siRNAs.....	27
2.1.8	Kulturen.....	27
2.1.9	Verbrauchsmaterialien.....	27
2.1.10	Geräte.....	28
2.2	MOLEKULARGENETISCHE METHODEN.....	28
2.2.1	Polymerasekettenreaktion.....	28
2.2.2	Kolonie-PCR.....	29
2.2.3	Mutagenese-PCR.....	29
2.2.4	Relative Quantitative-PCR.....	32
2.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	32
2.2.6	Restriktionsverdau zur Selektion und Kontrolle.....	33
2.2.7	Ligation.....	33
2.2.8	Transformation.....	33
2.2.9	Analytische und Präparative Extration von Plasmid-DNA aus Bakterien.....	34
2.3	ZELLBIOLOGISCHE METHODEN.....	35
2.3.1	Zellkultur.....	35
2.3.2	Transiente Transfektion.....	35
2.4	HISTOLOGISCH-MORPHOLOGISCHE METHODEN.....	36
2.4.1	Immunofluoreszenz.....	36
2.4.2	Konfokalmikroskopie.....	37
2.4.3	Golgi-Fragmentanalyse mit ImageJ.....	37
2.5	PROTEINBIOCHEMISCHE METHODEN.....	37
2.5.1	Membranpräparation.....	37
2.5.2	SDS-PAGE/Westernblot.....	38
2.6	PRÄDIKTIONSALGORITHMEN.....	39
2.6.1	Grantham-Substitutionsmatrix.....	39
2.6.2	PROVEAN.....	39
2.6.3	PolyPhen-2.....	39
2.6.4	MutationTaster.....	40
2.6.5	SIFT.....	40
2.6.6	MutPred2.....	40
2.6.7	SNPs&GO.....	40
2.7	ACMG-LEITLINIEN ZUR INTERPRETATION VON SEQUENZVARIATIONEN.....	41
2.8	RICHTLINIEN.....	42

3	ERGEBNISSE	43
3.1	<i>MISSENSE</i> -VARIANTEN IN COH1	43
3.2	ZUSAMMENFASSUNG DER BESCHRIEBENEN PHÄNOTYPEN VON PATIENTEN MIT <i>MISSENSE</i> -VARIANTEN IN COH1	43
3.2.1	<i>Ala590Thr</i>	44
3.2.2	<i>Ser824Ala</i>	44
3.2.3	<i>Thr1289Ser</i>	44
3.2.4	<i>Ile1611Asn</i>	45
3.2.5	<i>Leu2168Arg</i>	45
3.2.6	<i>Tyr2316Cys</i>	45
3.2.7	<i>Gly2620Asp</i>	46
3.2.8	<i>Gly2704Arg</i>	46
3.2.9	<i>Ser2748Leu</i>	46
3.2.10	<i>Ile2795Thr</i>	47
3.2.11	<i>Asn2968Ser</i>	47
3.2.12	<i>Ser3303Arg</i> und <i>Ala3691Thr</i>	47
3.3	PHÄNOTYPISCHER VERGLEICH DER PATIENTEN MIT COH1-SNV	48
3.4	<i>IN SILICO</i> ANALYSE ZUR BEWERTUNG DES KRANKHEITSPOTENTIALS DER COH1- <i>MISSENSE</i> -VARIANTEN	49
3.4.1	Häufigkeit der COH1 missense-Varianten in der GnomAD-Datenbank	49
3.4.2	Beurteilung der missense-Varianten in COH1 anhand von Prädiktionsalgorithmen ...	51
3.4.3	Analyse der Konservierung der missense-Varianten in COH1	53
3.4.4	Analyse der COH1 missense-Varianten hinsichtlich ihrer Nähe zu bekannten Proteinmotiven	54
3.5	HERSTELLUNG VON EXPRESSIONSVEKTOREN MIT COH1-SNV	54
3.5.1	Mutagenese-PCR der Expressionsvektoren	54
3.6	ETABLIERUNG EINER MURINEN ZELLKULTUR ZUR TRANSFEKTION DER COH1- MUT UND BEURTEILUNG DER GA-MORPHOLOGIE	55
3.7	STUDIEN ZUR LOKALISATION DER COH1-MUTANTEN	57
3.8	STUDIEN ZUR MORPHOLOGIE DES GA BEI COH1-SIRNA-KNOCKDOWN	59
3.9	STUDIEN ZUR WIEDERHERSTELLUNG DER GA-MORPHOLOGIE DURCH TRANSFEKTION VON COH1-MUT NACH RNAI (<i>RESCUE</i>)	63
3.10	STUDIEN ZUR MEMBRANBINDUNG DER COH1-SNV	66
4	DISKUSSION	69
4.1	ZUSAMMENFASSENDE BEWERTUNG DER DIGNITÄT DER COH1- <i>MISSENSE</i> -VARIANTEN	70
4.1.1	<i>Ala590Thr</i>	70

4.1.2	<i>Ser824Ala</i>	70
4.1.3	<i>Thr1289Ser</i>	71
4.1.4	<i>Ile1611Asn</i>	71
4.1.5	<i>Leu2168Arg</i>	72
4.1.6	<i>Tyr2316Cys</i>	72
4.1.7	<i>Gly2620Asp</i>	73
4.1.8	<i>Gly2704Arg</i>	73
4.1.9	<i>Ser2748Leu</i>	73
4.1.10	<i>Ile2795Thr</i>	74
4.1.11	<i>Asn2968Ser</i>	74
4.1.12	<i>Ser3303Arg und Ala3691Thr</i>	75
4.2	LITERATUR UND <i>IN SILICO</i> ANALYTIK DER COH1-MISSENSE-VARIANTEN	75
4.3	QUANTITATIVE BEWERTUNG.....	76
4.4	QUALITATIVE ANALYSE MITTELS PRÄDIKTIONSALGORITHMEN	77
4.5	PHÄNOTYPEN DER PATIENTEN.....	78
4.6	ETABLIERUNG DER MUTAGENESE-PCR UND KLONIERUNG DER EXPRESSIONSVEKTOREN	78
4.7	FRAGMENTIERUNG DES GOLGI-APPARATES BEI COH1-DEFIZIENZ	79
4.8	INTRAZELLULÄRE LOKALISATION DER COH1-MUTANTEN.....	80
4.8.1	<i>Transiente Transfektion der COH1-Konstrukte</i>	80
4.8.2	<i>Transiente Transfektion der COH1-Konstrukte nach RNAi</i>	81
4.9	MEMBRANBINDUNG DER COH1-SNV PROTEINE.....	82
4.10	STRUKTUR- UND FUNKTIONSBEZIEHUNG.....	83
4.11	SCHLUSSFOLGERUNGEN UND AUSBLICK	84
5	LITERATUR	85
	ANHANG A1 – KONSERVIERUNGSDARSTELLUNG DER COH1-NSSNV	95
	ANHANG A2 – PUTATIVE FUNKTIONELLE PROTEINDOMÄNEN IN VPS13 UND DER VPS13-FAMILIE	96
	ANHANG A3 – GOLGI-PARTIKEL-ANALYSE-MAKRO FÜR IMAGEJ	97
	EIDESSTATTLICHE VERSICHERUNG	98
	DANKSAGUNG	99
	LEBENS LAUF	100

Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1.1 SCHEMATISCHER ZEITLICHER VERLAUF DER PHÄNOTYPISCHEN VERÄNDERUNGEN DES COHEN-SYNDROMS.	5
ABBILDUNG 1.2 ZWEI PATIENTEN MIT TYPISCHER GESICHTSDYSMORPHIE	5
ABBILDUNG 1.3 RP FRÜHSTADIUM BEI COHEN-SYNDROM: OPTIKUSATROPHIE, VERENGUNG RETINALER GEFÄßE UND ERSTE PIGMENTABLAGERUNGEN.	6
ABBILDUNG 1.4 KRANIALE MAGNETRESONANZTOMOGRAPHIE VON (1) EINER 15-JÄHRIGEN PATIENTIN MIT COHEN-SYNDROM UND (2) EINER 15-JÄHRIGEN KONTROLLPATIENTIN.	8
ABBILDUNG 1.5 STRUKTUR DES COH1-GENS MIT SPLEIßVARIANTEN NACH KOLEHMAINEN ET AL., 2003.....	11
ABBILDUNG 1.6 ZUSAMMENFASSUNG ALLER BISHER BEKANNTEN <i>COH1</i> -VARIANTEN.	14
ABBILDUNG 2.1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER VERWENDETEN VEKTORSYSTEME.....	21
ABBILDUNG 2.2 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER MUTAGENESE-PCR.....	31
ABBILDUNG 3.1 AUS LITERATUR VERFÜGBARE FAZIALE PHÄNOTYPEN VON PATIENTEN MIT COH1-SNV.....	48
ABBILDUNG 3.2 DARSTELLUNG EINES MUTAGENESE-PCR-AMPLIFIKATS IM PRÄPARATIVEN AGAROSE-GEL	55
ABBILDUNG 3.3 IMMUNOFLUORESCENZ-DARSTELLUNG DER NATIVEN GA-MORPHOLOGIE IN UNTERSCHIEDLICHEN ZELLINIEN.....	56
ABBILDUNG 3.4 LOKALISATION DES pCDNA3.1_hCOH1-WT UND DER NICHT-TRANSFIZIERTEN KONTROLLE IN HELA.	57
ABBILDUNG 3.5 LOKALISATION NACH ÜBEREXPRESSION VON pCDNA3.1_hCOH1-MUT LEU2168ARG, TYR2316CYS, GLY2704ARG, SER2748LEU UND ILE1611ASN, GLY2620ASP+ASN2968SER IN HELA-ZELLEN.	58
ABBILDUNG 3.6 LOKALISATION NACH ÜBEREXPRESSION VON pCDNA3.1_hCOH1-MUT ALA590THR, SER824ALA, ILE2795THR, ASN2986SER IN HELA-ZELLEN.	59
ABBILDUNG 3.7 RELATIVE QUANTIFIZIERUNG DER mRNA-EXPRESSION VON <i>COH1</i> IN NIH3T3-ZELLEN NACH RNAI-VERMITTELTEM <i>KNOCKDOWN</i>	60
ABBILDUNG 3.8 ANALYSE DER GA-MORPHOLOGIE MIT <i>COH1</i> -siRNA- <i>KNOCKDOWN</i> -BEHANDLUNG IN NIH3T3-ZELLEN ..	61
ABBILDUNG 3.9 IMMUNOFLUORESCENZ-MORPHOLOGIE DES GA IN NIH3T3-ZELLEN NACH RNAI.	63
ABBILDUNG 3.10 IMMUNOFLUORESCENZ-MORPHOLOGIE DES GA IN HELA-ZELLEN KONTROLLEN.	64
ABBILDUNG 3.11 IMMUNOFLUORESCENZ-MORPHOLOGIE DES GA IN HELA-ZELLEN NACH TRANSFEKTION MIT COH1-SIRNA UND pCDNA3.1_hCOH1-MUT.	65
ABBILDUNG 3.12 IMMUNOFLUORESCENZ-MORPHOLOGIE DES GA IN HELA-ZELLEN NACH TRANSFEKTION MIT COH1-SIRNA UND pCDNA3.1_hCOH1-MUT.	66
ABBILDUNG 4.1 SCHEMATISCHE DARSTELLUNG DER <i>COH1</i> -cDNA MIT EXON-NUMMERIERUNG.....	83

Tabellenverzeichnis

TABELLE 2.1 IN DIESER STUDIE ANGEWANDTE BZW. HERGESTELLTE EXPRESSIONSVEKTOREN.	22
TABELLE 2.2 AUFLISTUNG DER KLONIERUNGSPRIMER. ROTE MARKIERUNG ENTSpricht DEM BASENAUSTAUSCH.	22
TABELLE 2.3 LISTE DER FÜR DIE SEQUENZIERUNG VERWENDETEN PRIMER.	23
TABELLE 2.4 ÜBERSICHT DER VERWENDETEN LÖSUNGEN, PUFFER UND MEDIEN NACH ANWENDUNGSBEREICH.	24
TABELLE 2.5 ÜBERSICHT DER VERWENDETEN ENZYME UND ZUGEHÖRIGEN PUFFER.	25
TABELLE 2.6 ÜBERSICHT DER GENUTZTEN TRANSFEKTIONSAGENZIEEN UND KOMBINIERTEN MEDIEN BZW. LÖSUNGEN.	26
TABELLE 2.7 ZUSAMMENSTELLUNG DER VERWENDETEN PRIMÄRANTIKÖRPER.	26
TABELLE 2.8 ZUSAMMENSTELLUNG DER VERWENDETEN SEKUNDÄRANTIKÖRPER.	26
TABELLE 2.9 ZUSAMMENSTELLUNG DER ZIELSEQUENZEN DER VERWENDETEN SIRNAS.	27
TABELLE 2.10 AUFLISTUNG VERWENDETER VERBRAUCHSMATERIALIEN.	27
TABELLE 2.11 ÜBERSICHT GENUTZTER GERÄTE.	28
TABELLE 2.12 EINFACHER REAKTIONSANSATZ FÜR DIE KOLONIE-PCR.	29
TABELLE 2.13 ZYKLISCHES TEMPERATURPROFIL FÜR DIE KOLONIE-PCR.	29
TABELLE 2.14 EINFACHER REAKTIONSANSATZ FÜR DIE MUTAGENESE-PCR.	30
TABELLE 2.15 ZYKLISCHES TEMPERATURPROFIL FÜR DIE MUTAGENESE-PCR.	30
TABELLE 2.16 EINFACHER REAKTIONSANSATZ FÜR DIE MUTAGENESE-PCR.	32
TABELLE 2.17 ZYKLISCHES TEMPERATURPROFIL FÜR DIE qPCR UND SCHMELZKURVE.	32
TABELLE 2.18 AUSWAHL DER DIESE ARBEIT BETREFFENDEN REGELN ZUR BEWERTUNG VON SNV. ÜBERSETZT NACH DEN <i>ACMG STANDARDS AND GUIDELINES 2015 (72)</i>	41
TABELLE 2.19 AUSWAHL DER DIESE ARBEIT BETREFFENDEN REGELN ZUR BEWERTUNG VON SNV. ÜBERSETZUNG ANGELEHNT AN DIE <i>ACMG STANDARDS AND GUIDELINES 2015 (72)</i>	42
TABELLE 3.1 ÜBERSICHT BEKANNTER <i>MISSENSE</i> -VARIANTEN IN <i>COH1</i> MIT ASSOZIATION ZU GENETISCHEN ERKRANKUNGEN.	43
TABELLE 3.2 ÜBERSICHT DER IN DEN STUDIEN VERWENDETEN DNA-SEQUENZIERUNGSMETHODEN.	48
TABELLE 3.3 DIAGNOSTISCHE KRITERIEN DES COHEN-SYNDROM PHÄNOTYPUS. MODIFIZIERT NACH KOLEHMAINEN ET AL. 2004.	48
TABELLE 3.4 ÜBERSICHT UND VERGLEICH DER PHÄNOTYPEN.	49
TABELLE 3.5 ZUSAMMENSTELLUNG DER <i>GNOMAD</i> -DATEN ZUR ALLELVERTEILUNG DER <i>COH1</i> -SNV. STAND: 07/2018.	50
TABELLE 3.6 ZUSAMMENSTELLUNG DER <i>GNOMAD</i> -DATEN ZU ZUSÄTZLICHEN SEQUENZVARIATIONEN AN DEN IN DIESER STUDIE ANALYSIERTEN <i>COH1</i> -SNV-LOCI. STAND: 07/2018.	51
TABELLE 3.7 ZUSAMMENSTELLUNG DER ERGEBNISSE DER PRÄDIKTIONSALGORITHMEN.	53
TABELLE 3.8 ZUSAMMENSTELLUNG DER ERGEBNISSE DER MEMBRANPRÄPARATION ZUR VERTEILUNG VON MEMBRANGEBUNDENEM UND ZYTOSOLISCHEM <i>COH1</i>	67
TABELLE 3.9 ANALYSE DER VERTEILUNG VON <i>COH1</i> -WT UND <i>COH1</i> -MUT ZWISCHEN ZYTOSOLISCHER UND MEMBRANFRAKTION. BASIEREND AUF WESTERNBLOT-ERGEBNISSEN. SCHWARZE BALKEN REPRÄSENTIEREN DIE MEMBRANFRAKTION, WEIßE BALKEN DIE ZYTOSOLISCHE FRAKTION.	68

Abkürzungsverzeichnis

AS	Aminosäurerest
array-CGH	<i>array-comparative genomic hybridization</i> , Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung
BFA	Brefeldin A
c.	Position in der kodierenden Sequenz
cDNA	<i>complementary</i> , komplementäre DNA
CGN	<i>cis</i> -Golgi Netzwerk
CNV	<i>copy number variant</i> , Kopienzahlvariation
<i>COH1</i>	humanes <i>COH1</i> -Gen
COH1	humanes COH1-Protein
<i>Coh1</i>	murines <i>Coh1</i> -Gen
Coh1	murines Coh1-Protein
COP	<i>coat protein complex</i> , Hüll-Protein-Komplex
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure (DNA)
dbEST	Datenbank für EST
EEA1	<i>early endosome</i> , frühes endosomales-Antigen 1
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERES	ER <i>exit sites</i> , ER Austrittsstelle
ERGIC	<i>ER to Golgi intermediate compartment</i> , intermediäres ER-zu-Golgi Kompartiment
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i> , exprimierter DNA-Sequenzbereich
et al.	und andere
Etc.	et cetera
GA	Golgi-Apparat
GAP	<i>GTPase-activating proteins</i> , GTPase-aktivierende Proteine
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
GFP	<i>green fluorescent protein</i> , grün-fluoreszierendes Protein
GM	Golgi-Matrix
GTP	Guanosintriphosphat
GTPase	Guanosintriphosphatase
GWAS	<i>Genome-wide association study</i> , Genomweite Assoziationsstudie
HAF	<i>human adult skin fibroblast cultures</i> , humane adulte Hautfibroblasten Zellkultur
IQ	Intelligenzquotient
kB	Kilobase
kDa	Kilodalton
LAMP	Lysosomen-assoziiertes Membranprotein
MAF	mittlere Allelfrequenz
MIM	<i>Mendelian inheritance in man</i> , Datenbank humaner krankheitsrelevanter Gene
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i> , multiplexe ligationsabhängige Sondenamplifikation
mRNA	<i>messenger RNA</i> , Boten RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
n.a.	nicht aufgeführt
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i> , US-amerikanisches Institut für Datenverarbeitung und -speicherung in der Molekularbiologie
NGS	<i>next generation sequencing</i> , nächste Generation der DNA-

	Sequenziertechnologie
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decay</i> , mRNA-Abbau bei <i>nonsense</i> -Mutation
nt	Nukleotid
nsSNV	<i>non-synonymous SNV</i> , nicht-synonyme SNV
OMIM	Online MIM
p.	Position in Protein
PCR	Polymeraseketten(- <i>chain</i>)reaktion
PFA	Paraformaldehyd
PTC	<i>premature termination codon</i> , vorzeitiges Stoppcodon
qPCR	quantitative <i>Real-Time</i> PCR
RAB	<i>ras-related in brain</i> , zerebrale RAS-Proteinfamilie
rER	rauhes Endoplasmatisches Retikulum
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA Interferenz
RP	Retinopathia pigmentosa
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
siRNA	<i>small interfering</i> RNA, kleine eingreifende RNA
SNP	<i>single nucleotide polymorphism</i> , Einzelnukleotidpolymorphismus
SNV	<i>single nucleotide variant</i> , Einzelnukleotidvariation
TfR	Transferrinrezeptor
TGN	<i>trans</i> -Golgi Netzwerk
VPS/Vps	<i>vacuolar protein sorting</i> , vakuoläre Proteinsortierung
WT	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel

Häufig verwandte englische Begriffe:

coiled-coil – bezeichnet ein Proteinstrukturmotiv, das einer Doppelwendel gleicht

de-novo-Variante – bezeichnet das erstmalige Auftreten einer Alteration des Erbgutes bei einem betroffenen Familienmitglied als Resultat einer Veränderung in einer Keimzelle eines Elternteils

floppy-infant – schlaffes Kind, Neugeborenes oder Säugling mit abnorm schlaffen Muskeltonus

frameshift – Leserasterverschiebung

loss-of-function – Funktionsverlust

missense-Variante – sinnverändernde Variante des Erbgutes, die durch Veränderung des Triplets den Einbau einer anderen Aminosäure verursacht

nonsense-Variante – sinnentstellende Variante, Punktmutation, die den Einbau eines nichtkodierenden Triplets verursacht und damit zum Stop der Translation führt

postnatal – nach der Geburt

silent-Variante – stille oder neutrale Variante; Punktvariante, die durch Veränderung des Triplets den Einbau der gleichen Aminosäure bewirkt

Zusammenfassung

Das Cohen-Syndrom ist ein komplexes Dysmorphiesyndrom, das durch genetische Defekte im *COH1*-Gen verursacht wird. *COH1* kodiert das 450 kDa große periphere Membranprotein COH1, das an dem Erhalt der Golgi-Struktur und an intrazellulären Transportprozessen beteiligt ist. Bei der Mehrzahl der Patienten verursachen *loss-of-function*-Varianten von *COH1* im Sinne eines verfrühten Stoppcodons via *nonsense-mediated mRNA decay* das Cohen-Syndrom. Dagegen ist das pathogene Potential der 13 bislang beschriebenen nicht-synonymen *COH1* Einzelnukleotidvarianten (*COH1*-nsSNV), die mit neuronalen Erkrankungen wie dem Cohen-Syndrom oder Autismus assoziiert wurden, unklar. Angesichts wachsender Genom-Datenmengen und damit auch der Anzahl von annotierten nsSNV ist die Beurteilung und Interpretation dieser Varianten essentiell, um einen individuellen Krankheitswert zu prüfen.

In dieser Arbeit wurden die 13 *COH1*-nsSNV funktionell *in vitro* und *in silico* charakterisiert. Die *in silico* Analyse erfolgte mittels 7 etablierter Prädiktionsalgorithmen und ergab ein pathogenes Potential für 8 von 13 COH1-nsSNV. Für die *in vitro* Analyse wurden 10 *COH1*-nsSNV mittels ortsspezifischer Mutagenese in COH1-Expressionskonstrukte kloniert. Wildtyp-COH1 und die mutierten COH1 (mutCOH1) Proteine wurde hinsichtlich der intrazellulären Lokalisation an den Golgi-Apparat nach Überexpression in HeLa Zellen untersucht. Hier zeigte sich für 6 der mutCOH1 eine Dissoziation von der sonst kolokalisierenden Golgi-Struktur. Weiterhin wurde die Morphologie des Golgi-Apparates nach *COH1*-RNAi und anschließender Überexpression der *COH1*-nsSNV Konstrukte analysiert. In Einklang mit den Ergebnissen der Kolo-kalisation zeigte sich hier für die entsprechenden mutCOH1 keine Rekonstitution der durch *COH1 knock-down* induzierten Fragmentierung des Golgi-Apparates. Abschließend wurden die *COH1*-nsSNV nach etablierten Kriterien zur Charakterisierung von Sequenzvariationen evaluiert. Die mutCOH1 konnten als pathogen (p.Leu2168Arg, p.Tyr2316Cys, p.Gly2620Asp, p.Gly2704Asp, p.Ser2748Leu), benigne (p.Ala590Thr, p.Ser824Ala, p.Thr1289Ser, p.Asn2968Ser) und mit unklarem Effekt (p.Ile2795Thr, p.Ser3303Arg, p.Ala3691Thr) klassifiziert werden.

Diese Arbeit zeigt, dass die mit dem Cohen-Syndrom-assoziierten *COH1*-nsSNV ein variables pathogenes Potential haben. Bezüglich der Struktur-Funktionsbeziehung zeigen die mutCOH1, die im mittleren COH1 Abschnitt (Aminosäuren 2168-2748) und in der Nähe der SHR-Bindungsdomäne (Aminosäuren 2603-2702) liegen, ein höheres pathogenes Potential. Diese Erkenntnis kann unter Einbeziehung weiterer Daten und des spezifischen Familienkontextes zukünftig Eingang in die genetische Diagnostik des *COH1*-Gens und des Cohen-Syndroms finden. Die weitere zellbiologische Charakterisierung der seltenen pathogenen mutCOH1, die nicht zu einem vollständigen *loss-of-function* des COH1-Proteins führen, wird bei der Identifizierung der molekularen Pathomechanismen von Cohen-Syndrom und Autismus eine wichtige Rolle spielen.

Summary

Cohen syndrome is a complex dysmorphic disorder caused by genetic defects in the *COH1* gene. *COH1* encodes the 450 kDa large peripheral membrane protein COH1 that is involved in the maintenance of the Golgi structure and intracellular transport processes. The majority of Cohen syndrome patients show loss-of-function variations in *COH1*. In addition, 13 *COH1* non-synonymous single nucleotide variations (*COH1*-nsSNV) have been described for Cohen syndrome and autism. Their pathogenicity is yet to be elucidated. In general the necessity for a functional validation of nsSNV is gaining in importance due to the massive annotation of genomic sequence variants uncovered by high-throughput genomic sequencing.

This study aims at the functional *in vivo* and *in silico* characterization of the 13 COH1-nsSNV. *In silico*-analysis was performed using seven established pathogenicity prediction algorithms estimating eight *COH1*-nsSNV as pathogenic. For further *in vitro* experiments, 10 *COH1*-nsSNV were cloned into expression vectors using site-specific mutagenesis. To assess their subcellular localization COH1-wildtype and mutated COH1 (mutCOH1) were expressed in HeLa cells and subsequently detected by immunostaining. Six mutCOH1 did not localize to the Golgi apparatus. In line with this, the expression of these six mutCOH1 did not reconstitute the Golgi apparatus after *COH1*-RNAi-induced Golgi fragmentation. The *COH1*-nsSNV were classified as likely benign (p.Ala590Thr, p.Ser824Ala, p.Thr1289Ser, p.Asn2968Ser), likely pathogenic (p.Leu2168Arg, p.Tyr2316Cys, p.Gly2620Asp, p.Gly2704Asp, p.Gly2704Arg, p.Ser2748Leu) and with uncertain significance (p.Ile2795Thr, p.Ser3303Arg, p.Ala3691Thr) according to established standards and guidelines for the interpretation of sequence variants.

This study shows that Cohen syndrome-associated *COH1*-nsSNV expose a variable pathogenic potential. Data further suggest a higher pathogenic potential in the central region of the protein (aa 2168-2748), notably in proximity to the putative SHR-binding-domain in COH1 (aa 2603-2702). *COH1*-nsSNV in the C- and N-terminal regions appear to have a reduced pathological impact. Together with detailed family data, these findings may have further implications with respect to the study of *COH1* and diagnosis of Cohen syndrome in the future. Further functional characterization of the identified pathogenic *COH1*-nsSNV will be crucial to decipher the function of COH1 in Cohen syndrome and autism

1 Einleitung

Basierend auf klinischen Beobachtungen von drei Patienten, beschrieb 1973 der amerikanisch-kanadische Humangenetiker Michael Cohen jr. ein bis dato unbekanntes Dysmorphiesyndrom, das später nach ihm benannte Cohen-Syndrom (MIM 216550) (1). Das Cohen-Syndrom ist ein sehr seltener, autosomal-rezessiv vererbter Symptomkomplex. Zu den obligaten Charakteristika des heterogenen Phänotyps gehören eine nicht-progrediente mentale Retardierung, eine faziale Dysmorphie, eine progressive Retinopathie und/oder Myopie sowie eine intermittierende Neutropenie. 2003 konnte von finnischen Humangenetikern das Gen *COH1* identifiziert werden, der bis heute einzige bekannte Genlocus des Cohen-Syndroms (2). Synonym werden in Quellen die Bezeichnungen *VPSI3B* und *CHS1* verwendet, im Rahmen dieser Arbeit wird der Name *COH1* fortgeführt. Das Genprodukt von *COH1*, das Protein COH1, ist an der strukturellen Integrität des Golgi-Apparates beteiligt (3). Der Großteil der bei Cohen-Syndrom Patienten beschriebenen Varianten in *COH1* führt zu einem artifiziellen Stoppcodon durch Punktvarianten (*nonsense*-Varianten), Verschiebung des Leserasters (*frameshift*-Varianten) oder Veränderungen des Spleißvorgangs (*splice-site*-Varianten) und somit zum Abbruch der Translation und zur Defizienz eines funktionellen COH1-Proteins (4, 5). Neben diesen *loss-of-function* Varianten wurden zudem eine Reihe potentieller *missense*-Varianten in *COH1* beschrieben, deren Rolle für die Pathogenese des Cohen-Syndroms noch unklar ist (2, 6-14).

1.1 Prävalenz des Cohen-Syndroms

In der Literatur sind weltweit bis heute etwa 160 Fälle des Cohen-Syndroms dokumentiert. Insbesondere in genetisch isolierten ethnischen Populationen mit erhöhtem Risiko für Konsanguinität bzw. genetischer Homogenität wurden Häufungen beobachtet. Schätzungen des amerikanischen *National Cohen Syndrome Support Center* gehen von 500 bis 1000 klinisch diagnostizierten und weit mehr nicht-diagnostizierten Betroffenen aus.

Eine Häufung der Fälle zeigte sich bei aschkenasischen Juden in den USA (15-22) und in der Volksgruppe der ethnischen Finnen (2, 23-25). In beiden Fällen wird eine geringere genetische Vielfalt aufgrund sozio-kultureller Mechanismen dieser Bevölkerungsgruppen diskutiert (17). In Finnland zählt das Cohen-Syndrom zum sogenannten *Finnish Disease Heritage*, einer Gruppe von seltenen Erbkrankheiten, die aufgrund der Populationsdynamik der ethnischen Finnen eine erhöhte Prävalenz haben. Weitere Studien von Cohen-Syndrom-Betroffenen folgten aus Japan (26), Israel (27), Großbritannien (28-30), Deutschland (8, 12, 31, 32), Belgien (33), im Mittelmeerraum (34-36), den USA (13, 37), Frankreich (38), Pakistan (39), China (40).

1.2 Klinik des Cohen-Syndroms

Eine präzise klinische Erfassung eines Patienten bei begründetem Verdacht auf eine genetische Erkrankung ist essentiell für die weitere molekulargenetische Diagnostik. Einige genetische Erkrankungen fallen durch einen weitgehend homogenen Phänotyp auf, der die Etablierung eines spezifischen klinischen Kriterienkataloges ermöglicht. Ein Beispiel hierfür ist die (modifizierte) Ghent-Nosologie für das Marfan-Syndrom (41).

Für das Cohen-Syndrom haben bisher geringe Fallzahlen und ein insgesamt heterogenes klinisches Bild mit zum Teil komplexem zeitlichen Verlauf der Symptome die Erstellung eines solchen Kataloges erschwert (42). Analoge Phänotypen konnten nur innerhalb genetisch isolierter Bevölkerungsgruppen beobachtet werden. In Finnland wurde beispielsweise der „Finnische-Phänotyp“ des Cohen-Syndroms mit einem gemeinsamen klinischen Profil für 29 Patienten beschrieben (43) (25).

Im Verlauf sind die wichtigsten und häufigsten Veränderungen des Cohen-Syndroms zusammengestellt. Es wird unterschieden nach Auffälligkeiten in der Entwicklung, Dismorphie von Gesicht, Händen und Füßen. Zudem wurden ophthalmologische, neurologische, orthopädische, kognitive Veränderungen und Verhaltensauffälligkeiten beschrieben. Abbildung 1.1 gibt einen Überblick über den zeitlichen Verlauf der phänotypischen Ausprägung des Cohen-Syndroms.

1.2.1 Entwicklungsstadien des Cohen-Syndroms

Der Schwangerschaftsverlauf zeigte sich in den meisten Studien unauffällig. Nur in der finnischen Kohorte wurden retrospektiv in 50% der Fälle verminderte Kindsbewegungen beschrieben. Mit durchschnittlich 2800 g (28) bzw. 50% unter 3000 g (25) war das Geburtsgewicht reduziert. Ob die bei adulten Cohen-Syndrom-Patienten fast zu 100% vorliegende Mikrozephalie bereits perinatal vorlag, ist umstritten bzw. in der Literatur nicht präzise genug dokumentiert. Die finnische Kohorte war perinatal normozephal und entwickelte erst in den ersten Lebensjahren zu 100% eine Mikrozephalie (25). Diese Beobachtung korreliert auch mit Daten zur *in-situ* Expression des murinen *Cohl* während der Hirnentwicklung (11). Studienübergreifend traten bei 75-82% der Säuglinge eine Trinkschwäche mit folgender Wachstumsverzögerung auf (25, 28). In zwei Fällen wurde eine künstliche Ernährung notwendig (28). Die Entwicklung der ersten Jahre war global verzögert und so wurden die Meilensteine der Entwicklung überwiegend mit Latenz erreicht. 66% der irischen und 50% der griechischen Betroffenen blieben neben 18% der finnischen und 17% der deutschen Patienten nonverbal (12, 25, 30, 34). Aufgrund der ausgeprägten Lernschwierigkeiten wurde im Schulalter meist ein Besuch von sonderpädagogischen Einrichtungen notwendig (25). Der Eintritt in die Pubertät zeigte sich ebenfalls verzögert. Die Studienteilnehmer lebten im weiteren Verlauf meist in ihren Elternhäusern bzw. in

Betreuungseinrichtungen. Die geistige Behinderung ist nicht progredient (44). Die allgemeine Lebenserwartung scheint nicht eingeschränkt, obwohl in der finnischen Kohorte ein beschleunigter Alterungsprozess beschrieben wurde. Sporadisch kam es zu kardialem, linksventrikulärem Leistungsabfall (25). In Abbildung 1.1 ist die phänotypische Ausprägung des Cohen-Syndroms in einer Zeitskala zusammengefasst.

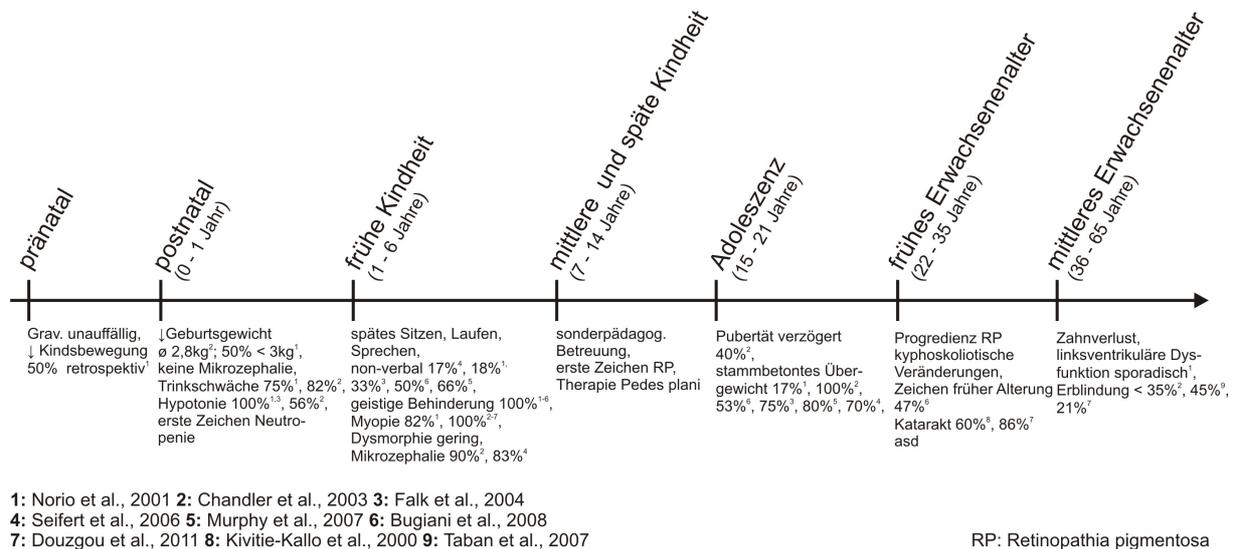


Abbildung 1.1 Schematischer zeitlicher Verlauf der phänotypischen Veränderungen des Cohen-Syndroms.

1.2.2 Charakteristik der fazialen Dysmorphie

Die faziale Dysmorphie ist ein häufiges Charakteristikum des Cohen-Syndroms. Zu den häufigsten Abweichungen gehören die wellenförmige Lidspalte mit lateral abfallenden Lidachsen und das kurze Philtrum (17, 29). In Kombination mit einer dünnen Oberlippe werden die meist vergrößerten Schneidezähne freilegt (1). Der Haaransatz ist tief, das Kopfhaar, die Augenbrauen und die Wimpern dicht. Die Nasenwurzel ist typischerweise verbreitert und die Nase hakenförmig. Über 80% der finnischen Betroffenen haben einen Steilgaumen. Im Säuglingsalter sind die Patienten meist unauffällig. Der Grad der Ausprägung der Dysmorphie nimmt ab dem Kindesalter zu (25, 28, 45). Zwei Cohen-Syndrom-Patienten mit typischer fazialer Dysmorphie sind in Abbildung 1.2 dargestellt.



Abbildung 1.2 Zwei Patienten im Alter von 18 Jahren (1) bzw. 46 Jahren (2) mit typischer Gesichts-dysmorphie. Aus Chandler et al., 2003.

1.2.3 Progressive Retinopathie und Myopie

Mit fast vollständiger Penetranz entwickelten Cohen-Syndrom-Patienten in den ersten Lebensjahren eine korrekturbedürftige Myopie (\emptyset -5dpt). Bis zur zweiten Lebensdekade kam es zur weiteren Progression der Fehlsichtigkeit (\emptyset -7 dpt) bis zur malignen Myopie ($>$ -8dpt). Auslöser der hohen Myopie ist die starke Brechkraft von Hornhaut und Linse, nicht die Bulbuslänge (46). Eine ebenfalls häufige ophthalmologische Veränderung ist die Retinopathia pigmentosa (RP) (Abb. 1.3). Die RP ist ein Sammelbegriff für degenerative Netzhauterkrankungen, an deren Endpunkt der Funktionsverlust der Photorezeptoren mit Visus- und Gesichtsfeldeinschränkungen steht. Meist beginnt die Degeneration im Jugendalter in der Netzhautperipherie und breitet sich über Jahre in das Zentrum aus (47). Man unterscheidet syndromale (z.B. Usher-, Bardet-Biedl-, Cohen-Syndrom) und nicht-syndromale Formen (48). Obwohl nicht alle Cohen-Syndrom-Patienten in Kindheit und Jugend diagnostizierbare Veränderungen aufwiesen, hatten fast 100% ab dem mittleren Alter charakteristische Fundusveränderungen, sofern eine ophthalmologische Untersuchung durchgeführt wurde. Der Visus war in diesen Fällen eingeschränkt und Symptome wie Nachtblindheit und Gesichtsfeldeinschränkungen traten auf. Die RP war progressiv, führte jedoch nicht immer zur völligen Erblindung. Strabismus, meist als Strabismus divergens, trat mit 77% und 80% in der finnischen bzw. britischen Kohorte auf (49, 50). Der finnische Cohen-Syndrom-Phänotyp ist okulär mild ausgeprägt und führte in keinem der Fälle zur vollständigen Erblindung (25). Eine detailliertes ophthalmologisches Assessment, mit zusätzlicher OCT (optische Kohärenztomographie)-Diagnostik und Elektroretinogramm, erfolgte bei einer 13-jährigen kaukasischen Cohen-Syndrom-Patientin(51). Es zeigte sich eine Myopie, OCT-morphologisch ein Verlust der äußeren Segmente der Photorezeptoren, eine verminderte ERG-Amplitude und bilaterale Retinoschisis. Eine derart detaillierte Erfassung erfolgte bisher nur in einem Fall, so dass eine allgemeine Aussage bezüglich dieser Pathologien nicht möglich ist.

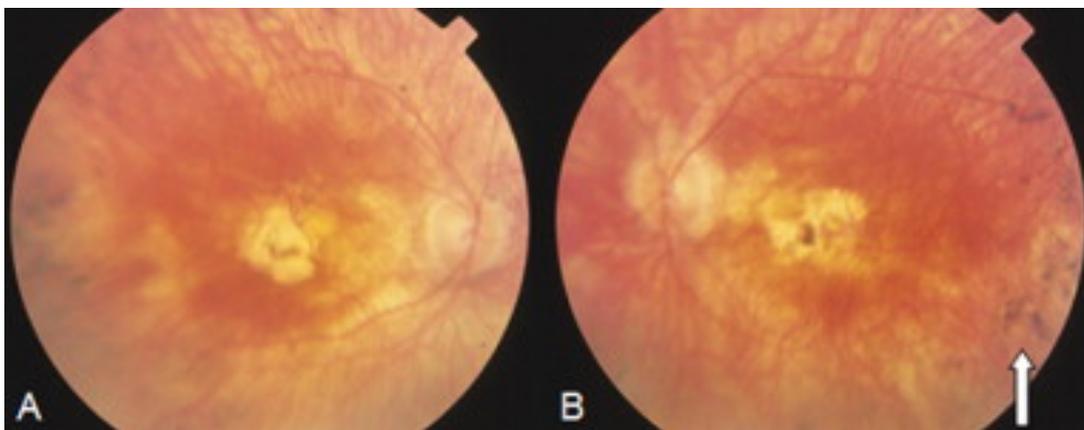


Abbildung 1.3 RP Frühstadium bei Cohen-Syndrom (Amish, 26 Jahre, männlich): Optikusatrophie, Verengung retinaler Gefäße und erste Pigmentablagerungen (Pfeil). Native Fundusfotographie des (A) rechten und (B) linken Auges aus Taban et al., 2007.

1.2.4 Klinische Zeichen des Bewegungsapparates

Orthopädisch fielen Cohen-Syndrom-Patienten mit einer globalen Überdehnbarkeit der Gelenke, zu 90-95% mit *Pedes plani* und zu zwei Dritteln mit *Genua valga* auf (28). Ab der vierten Lebensdekade bildeten sich verstärkt Kyphosen bzw. Skoliosen der Wirbelsäule, insbesondere in finnischen und griechischen Kohorten, aus (25, 35). Bei letzteren fanden sich in allen Fällen zusätzlich eine Kielbrust (*Pectus carinatum*). Weiterhin zeigte sich mit unterschiedlicher Häufigkeit ein vergrößerter Abstand zwischen dem 1. und 2. Zeh (Sandalenlücke, vgl. Down-Syndrom) sowie lange, schmale Finger (91%) (25, 28, 45).

1.2.5 Motorische und Neurologische Besonderheiten

Bereits im Säuglingsalter wiesen Cohen-Syndrom-Patienten eine muskuläre Hypotonie auf (12). Dieses Symptom ist auch als *floppy-infant*- („schlaffes Kind“)-Syndrom bekannt und kann im Rahmen einer Reihe von genetischen Syndromen auftreten (z.B. Prader-Willi-, Down-, 22q13-Del-Syndrom) (52). Pränatal können bereits verminderte Kindsbewegungen und ein Polyhydramnion auftreten. Postnatal weisen betroffene Neugeborene einen zentral verminderten Muskeltonus, damit eine charakteristische Körperhaltung mit Abduktion und Außenrotation der Beine und schlaffer Extension der Arme auf. Insuffizienzen der oralen- und pharyngealen Muskulatur haben häufig eine Trinkschwäche zur Folge, wie sie auch zum Teil beim Cohen-Syndrom zu beobachten ist (25, 28). Die muskuläre Hypotonie gehört zu den häufig beobachtenden klinischen Symptomen des Cohen-Syndroms (s. Abb 1.1) (12, 13, 28, 30).

Morphologisch fällt bei Cohen-Syndrom-Patienten, wie bereits oben beschrieben, eine Mikrozephalie, also ein Kopfumfang unterhalb der doppelten Standardabweichung, auf. Die perinatale Normozephalie der finnischen Kohorte lässt den Subtyp der *postnatalen* Mikrozephalie, auch sekundären Mikrozephalie, vermuten, bei der der Kopfumfang zur Geburt der Norm entspricht und sich erst im Verlauf durch unterproportionales Wachstum des Kopfes manifestiert (12, 28). Ähnlich wie die Hypotonie ist auch die postnatale Mikrozephalie häufig mit genetischen Syndromen, klassischerweise dem Angleman- und MECP2-Syndrom, assoziiert (53). Das MECP2-Syndrom, ehemals Rett-Syndrom, führt zu einer alterierten Funktion von MECP2 (*Methyl-CpG-binding protein 2*), einem verstärkt zerebral exprimiertem Transkriptionsfaktor, der bei Funktionsverlust u.a. zu einer Reduktion GABAerger-Aktivität führt.

Die Ausbildung der Sprache ist in den meisten Fällen der postnatalen Mikrozephalie, so auch bei Cohen-Syndrom-Patienten, stark eingeschränkt bis nicht vorhanden (12, 13, 25, 30, 34).

Formen des syndromalen Autismus können ebenfalls mit einer postnatalen Mikrozephalie assoziiert sein. Hier wurden neben der Ausprägung bei Angleman-Patienten auch Fälle des MECP2-Syndromes publiziert (53, 54). Die Betroffenen weisen eine Entwicklungsverzögerung

mit Bewegungstereotypien der Hände, Verlust der Gehfähigkeit, Feinmotorik und Sprache auf (55, 56). Eine neuroanatomische Besonderheit, die bisher nur bei finnischen Cohen-Patienten dokumentiert werden konnte, ist eine relative Vergrößerung des *Corpus callosum* (CC) (57). An 18 von 28 bekannten Betroffenen wurden kraniale MRT-Untersuchungen durchgeführt, die zeigten, dass der relative Durchmesser des CC bei Cohen-Patienten im Vergleich zu einer Kontrollgruppe signifikant größer ist (Abb. 1.4). Im CC kreuzen die Kommissurfasern der beiden Hemisphären zur jeweiligen Gegenseite. Die Pons, Medulla oblongata und das Mesenzephalon waren im Gegensatz dazu kleiner (57). Eine ähnliche zerebrale Morphologie mit relativ vergrößertem CC zeigt sich bei Patienten mit *loss-of-function*-Varianten in *CASK* (58). Aufgrund von Ethikstandards sind erneute Studien dieser Art nur eingeschränkt möglich, da derzeit kein diagnostischer oder behandlungsrelevanter Nutzen für den einzelnen Cohen-Syndrom Betroffenen hierdurch erzielt werden kann. Somit liegen keine Ergebnisse aus weiteren Studien oder eigenen Untersuchungen vor.

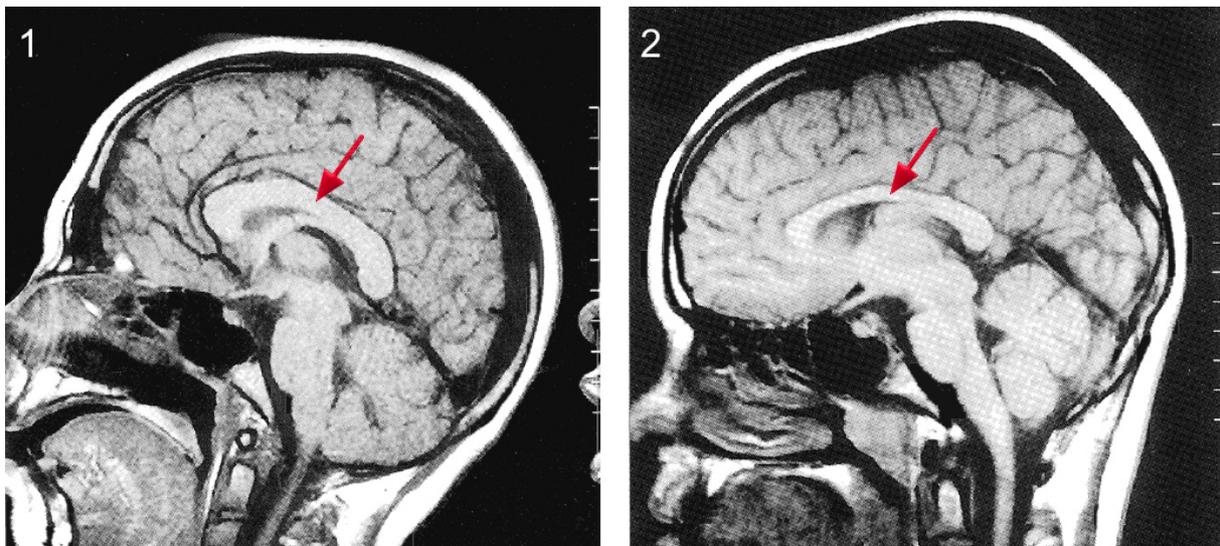


Abbildung 1.4 Kraniale Magnetresonanztomographie von (1) einer 15-jährigen Patientin mit Cohen-Syndrom und (2) einer 15-jährigen Kontrollpatientin. Der rote Pfeil markiert das Corpus callosum, in (1) deutlich prominenter. Sagittale Aufnahme, T1-gewichtet. Aus Kivitie-Kallio et al., 1998.

1.2.6 Kognition und Verhalten

Alle Cohen-Syndrom-Patienten hatten kognitive Einschränkungen. Die Schwere der Ausprägung variiert zwischen den Kohorten, so waren in der finnischen Studie 11% leicht, 6% mittelgradig, 61% schwer und 22% schwerst geistig behindert (25). Die britische Studie zählte 62% mittelgradig bis schwere und 25% schwerste Behinderungen (30). Die geistige Behinderung war in keinem der Fälle progredient. Wie bereits beschrieben ist die Sprachentwicklung verzögert und erreicht ein stark variables Niveau. Grundsätzlich ist aber das Sprachverständnis besser ausgeprägt als die Sprachproduktion.

Ihrem Umfeld zeigten sich die Patienten im Kindesalter meist ruhig und als Erwachsene sozial interaktiv. In der *adaptive behavior scale* der *American Association on Mental Deficiency* (AAMD) erzielten finnische Betroffene hohe Werte in den Kategorien Sozialverhalten, Selbstbestimmung, Verantwortung und zeigten keine Anpassungsstörung (25). Im Gegensatz dazu stehen Beobachtungen von Verhaltensauffälligkeiten bei Patienten mit Cohen-Syndrom in der griechischen und Teilen der irischen und amischen Kohorten (13, 35). Sie zeigten autismustypische stereotype Bewegungsmuster, Entwicklungsverzögerung und Störungen der sozialen Interaktion (13, 30, 34, 35). Autismus, oder Autismusspektrum-Störung, ist eine Gruppe frühkindlicher Verhaltensentwicklungsstörungen mit der Symptomtrias aus eingeschränktem Sozialverhalten, gestörter Kommunikation und repetitiver Bewegungsmuster (59). Ein hoher Vererbungsindex von 0,85-0,92 deutet auf einer starke genetische Komponente des Autismus hin (60), die aktuell jedoch nur in 20-25% der Fälle identifiziert werden kann (59). In *Genome wide association studies* (GWAS) zur weiteren Identifikation genetischer Ursachen für Autismus wurden bei Patienten auch Varianten in *COH1* detektiert (7).

1.2.7 Zyklische Neutropenie

Die Neutropenie, also die Verminderung neurophiler Granulozyten im Blut, wurde bei allen finnischen Patienten mit Cohen-Syndrom beschrieben (23), unbeständig in den übrigen und in keinem Fall der jüdischen Kohorte (27). Bei zyklischer Ausprägung sind die klinischen Konsequenzen dieser Immunschwäche gering. Gelegentlich kam es zu Infektionen im Mund, insbesondere parodontale Entzündungen, die zum Verlust von Zähnen führen. In der irischen Kohorte wurden zusätzlich rezidivierende Infekte der oberen Atemwege dokumentiert. Die Detektion einer zyklischen Neutropenie gelingt nur bei sorgfältiger klinisch-hämatologischer Untersuchung (30).

1.2.8 Weitere fakultative klinische Merkmale

In der amischen und irischen Kohorte waren alle untersuchten Cohen-Syndrom-Patienten, in der britischen (~ 60%), deutschen (67%) und griechischen (93%) Kohorte (30) (12) nur Teile kleinwüchsig. Chandler et al. fanden 2003 zusätzlich Kehlkopfveränderungen, die sich zum Teil in Laryngomalazie, -stenosen und einer hohen Stimme manifestierten. Letzteres war auch bei 68% der finnischen Kohorte zu finden.

1.3 Differentialdiagnosen

Ähnlichkeiten zu anderen genetischen Syndromen aufgrund der inkohärenten Ausprägung und Seltenheit des Cohen-Syndroms können zu Fehldiagnosen führen. Retinopathien und das

stammbetonte Übergewicht können auch bei Patienten mit Bardet-Biedl- und Alström-Syndrom auftreten. Hypotonie, Trinkschwäche und Entwicklungsverzögerung sind ebenfalls Charakteristika des Prader-Willi-Syndroms. Die Dysmorphie des Gesichtes kann in der frühen Entwicklung an das Rubinstein-Taybi-Syndrom erinnern. Ein verkürztes Philtrum ist ebenfalls beim Mowat-Wilson-Syndrom ausgeprägt. Das Mirhosseini-Holmes-Walton-Syndrom wurde 1972 erstmals beschrieben und ist nach heutigen Einschätzungen identisch mit dem Cohen-Syndrom (31, 32).

1.4 Therapie

Eine kausale Therapie für das Cohen-Syndrom ist nicht verfügbar. Trotzdem ist eine zügige Diagnosestellung für Betroffene und ihr soziales Umfeld wichtig. Für den individuellen Patienten sind die Prognose und die Entwicklung von hoher Bedeutung. Da die kognitiven Einschränkungen nicht progredient sind, kann und sollte eine sonderpädagogische Ausbildung angestrebt werden. Wie für das Down-Syndrom sind intensive ophthalmologische Kontrollen und Korrekturen essentiell, um eine zusätzliche Entwicklungsverzögerung durch visuelle Deprivation zu verhindern (61). Bei ausgeprägter Neutropenie mit erhöhter Anfälligkeit für Infektionskrankheiten sollten regelmäßige Impfungen durchgeführt werden. Für betroffene Familien ermöglicht die Diagnose gleichzeitig eine spezialisierte humangenetische Betreuung und Beratung.

1.5 Das Gen *COH1*

Der einzige bisher bekannte Genlocus für das Cohen-Syndrom liegt im *COH1*-Gen. *COH1* wurde erstmals 2003 beschrieben (2). Haplotyp-Analysen hatten bereits im Vorfeld den Genlocus auf Chromosom 8q22 zwischen den Markern D8S257 und D8S559 eingeschränkt (62). *COH1* zählt zur Gruppe der *VPS13*-verwandten Gene. Gemeinsam mit *CHAC* (auch *VPS13A*), *VPS13C* und *VPS13D* weist *COH1* (auch *VPS13B*) Sequenz-Homologien zu dem Golgi-Apparat-Transportprotein Vps13p aus der Hefe auf (s.a. 1.7) (63). Das *VPS13A/CHAC*-Gen liegt auf Chromosom 9q21 und ist mit der autosomal rezessiven Chorea-Akanthozytose assoziiert (63). Bei Mutationen in *VPS13C* wurde ein seltener *early-onset* Morbus Parkinson beschrieben (64, 65). Mutationen in *VPS13D* wurden bei Patienten mit Bewegungsstörungen gefunden (66, 67). *COH1* erstreckt sich genomisch über ~864 kb und kodiert 62 Exons. Initial wurde ein komplexes alternatives Spleißen (Exone 8, 17, 28, 31) beschrieben. Basierend auf EST-Daten (*expressed sequence tag*) wurden 13 alternativ gespleißte Transskripte vorhergesagt (Abb. 1.5) (2). Aktuellere Northern Blotting-Experimente lassen jedoch an der Expression der meisten Spleißvarianten zweifeln (4). Kleinere Transkripte konnten nicht reproduziert werden und sind daher

möglicherweise Artefakte fehlerhafter oder unvollendeter Spleißprozesse bzw. Hinweise auf regulatorische Mechanismen (z.B. *nonsense-mediated mRNA decay* (NMD)) (2, 63). Ein Grundniveau an nicht-transkribierter, regulatorischer mRNA kann bei der Erstellung der EST-Datenbanken zu Überrepräsentation und Fehlinterpretation führen (68). NMD ist ein Mechanismus der Genregulation, der die Translation von mRNA verhindert, die durch z.B. fehlerhafte Transkription, Spleißfehler oder Mutationen ein frühzeitiges Stoppkodon enthalten.

Die einzigen signifikant nachgewiesenen Varianten sind NM_152564 und NM_017890 (4). Beide beinhalten die Exons 1-27 und 29-62 und unterscheiden sich in den Exons 28 (NM_017890) bzw. der Spleißvariante 28b (NM_152564) (Abb. 1.5). Relative Quantifizierungen zeigten, dass beide Transkripte in fetalem und adultem Hirngewebe und Retina annähernd gleich exprimiert werden, in allen übrigen Geweben jedoch die Spleißvariante NM_152564 (Exon 28b) dominiert. Dafür spricht auch, dass im murinen *COH1*-Homolog, *Cohl*, ausschließlich die Exon 28b-enthaltende Variante dokumentiert ist. Diese Variante scheint also evolutionär konserviert zu sein (4). *In situ* Hybridisierungen von *Cohl* in Hirngewebeschnitten von Mäusen konnten postnatal (21. Tag) ein hohes Expressionsniveau in Neuronen, nicht aber Gliazellen nachweisen. In pränatalen Mäusehirnen konnte hingegen nur eine sehr niedrige *Cohl*-Expression detektiert werden (11). Diese Beobachtung steht in Einklang mit der sich erst postnatal entwickelnden Mikrozephalie.

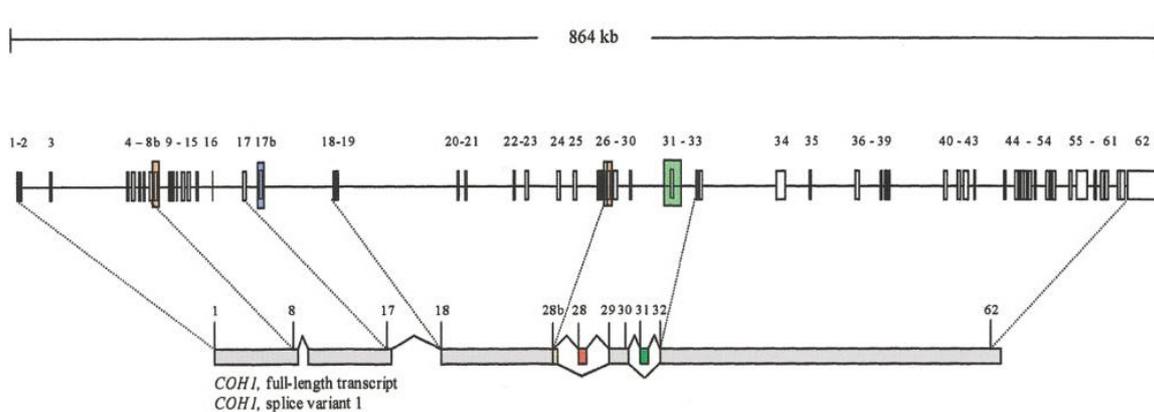


Abbildung 1.5 Struktur des COH1-Gens mit Spleißvarianten nach Kolehmainen et al., 2003.

1.6 Polymorphismen und Mutationen

Ausgehend von einer genetischen Norm innerhalb einer Spezies, also der Summe aller statistisch *normalen* Allele, können Varianten des Genoms abgegrenzt werden. Mögliche Kriterien zur Einteilung der Varianten sind unter anderem die Größe der Veränderung (Punktvariante, Mikro-/Makrodeletion, -inversion, -insertion, Chromosomenabberation) und der Effekt der Veränderung (letal (*nonsense*), sinnverändernd (*missense*, *non-synonymous*) oder still

(*silent/synonymous*)). Ein großer Teil der genetischen Variabilität zwischen Individuen einer Spezies bilden Einzelnukleotid-Variationen (*single-nucleotide-variations*, SNV). SNV sind Unterschiede in einzelnen Basenpaaren der Nukleotidsequenz, die etwa alle 1000 Basenpaare und definitionsgemäß in $\geq 1\%$ der Bevölkerung auftreten. Kodiert ein Basentriplett aufgrund eines SNV eine andere Aminosäure, handelt es sich um einen nicht-synonymen SNV (nsSNV). Statistisch gesehen betreffen SNV jedoch häufiger nicht-kodierende Abschnitte des Genoms (69).

Als Mutation im Genom beschreibt man im Gegensatz dazu Veränderungen mehrerer, bzw. einzelner Basenpaare mit einer niedrigeren Prävalenz ($\leq 1\%$). Entscheidendes Kriterium ist demnach die Häufigkeit der Veränderung. Nach den Prinzipien der natürlichen Selektion scheinen SNV aufgrund ihrer relativen Häufigkeit eher einen geringen negativen, möglicherweise sogar positiven Effekt auf die Proteinfunktion bzw. die des Organismus zu haben. So konnte beispielsweise in *GWAS* gezeigt werden, dass häufige SNV für die Unterschiede in der menschlichen Körperlänge verantwortlich sind (70). Mutationen hingegen sind meist phylogenetisch jünger und häufig mit genetischen Erkrankungen und Syndromen assoziiert (71). Nach jüngsten Standards wird die Verwendung der Begriffe „Polymorphismus“ und „Mutation“ jedoch als kritisch eingestuft, da sie bereits mit dem Begriff selbst eine pathogene oder benigne Beteiligung zugrunde legen. Korrekter ist es demnach, generell von **Varianten** zu sprechen und je nach Beweislage den Begriff „Variante“ mit verschiedenen Attributen zu belegen: pathogen, wahrscheinlich pathogen, unsicher, wahrscheinlich benigne oder benigne (72).

Varianten, die je nur ein bzw. wenige Nukleotide betreffen, können mit Verschiebung des Leserasters oder Substitutionen einhergehen. Bei Verlust (Deletion) oder Einfügung (Insertion) einzelner Basen kann es zu *frameshift*-Varianten (Verschiebung des 3bp-Leserasters) kommen, die häufig die Einführung eines vorzeitigen Translationsstoppcodons (*premature termination codon*, PTC) zur Folge haben. Im Fall von Substitutionen bleibt das Leseraster erhalten, kann aber in kodierenden Abschnitten zu 1) *nonsense*-Varianten (neues Triplett kodiert Stoppcodon), 2) *missense*-Varianten (neues Triplett kodiert andere Aminosäure) oder 3) *silent*-Varianten (neues Triplett kodiert identische Aminosäure) führen. *Silent*-Varianten haben definitionsgemäß keine Auswirkung auf die Funktionalität des Proteins. Bei *nonsense*-Varianten ist das resultierende Protein verkürzt und kann in Abhängigkeit von der Position funktionell eingeschränkt sein. Ob *missense*-Varianten funktionelle Auswirkungen haben, hängt von Faktoren wie den chemischen Eigenschaften der neuen Aminosäure oder der betroffenen Proteindomäne ab und kann von einem Funktionsgewinn (z.B. p53 (73)) über keinen Effekt bis hin zum voll-

ständigen Funktionsverlust reichen. Alterationen in nicht-kodierenden Introns können z.B. genregulatorische Sequenzen betreffen oder auch in Intron-Exon-Übergangnähe das Spleißen beeinflussen und so ebenfalls zu einem Funktionsgewinn oder -verlust des translatierten Proteins führen.

Die Mehrheit der über 100 beschriebenen Varianten in *COH1*, die bei Cohen-Syndrom-Patienten gefunden wurden, führt zu einem PTC und damit zum vorzeitigen Syntheseabbruch und/oder NMD (Abb. 1.6). Einige dieser Varianten lagen jedoch heterozygot vor, was nicht im Einklang mit dem rezessiven Vererbungsmodus des Syndroms steht. In etwa 30% der Fälle konnte nur ein oder gar kein mutiertes Allel sequenziert werden. Aktuellere Studien konnten nun diese Lücke schließen. Mithilfe von zielgerichteten *array*-CGH (*comparative genomic hybridization*) und MLPA (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) konnten bei fast allen dieser Fälle größere, schwer detektierbare *copy number variants* (CNV) gefunden werden (5, 74). CNVs sind von der Durchschnittsbevölkerung abweichende numerische Abberationen von Abschnitten im Genom im Sinne von Deletionen und Duplikationen, die größer als 1 kb sind (75). Die meisten dieser Variationen scheinen benigne zu sein, da, nach aktueller Einschätzung, jeder Mensch im Durchschnitt etwa 12 dieser Variationen trägt (75). Hinweise dafür, dass CNVs einen benignen Charakter haben, sind Heterozygotie, und bei Homozygotie ein großer Abstand zu kodierenden Sequenzabschnitten bzw. einen Fokus in nicht essentiellen Genen (76). Im Kontext des Cohen-Syndroms wurden, aufgrund ihrer Lage im kodierenden Bereich von *COH1*, CNVs mit pathogenem Charakter identifiziert (Abb. 1.6). Die Pathogenität der CNVs für das Cohen-Syndrom konnte durch *compound*-Heterozygotie mit einer weiteren Variante auf dem zweiten Allel in *COH1* in vielen Fällen belegt werden(5).

Neben der Vielzahl an *frameshift*-, *nonsense*-Varianten sowie große CNVs wurden mit dem Cohen-Syndrom nur eine geringe Anzahl an nsSNV assoziiert (Tab. 1). Der pathogene Charakter dieser *missense*-Varianten konnte bislang nicht belegt werden und steht in Kontrast zu der Vielzahl an bekannten benignen *missense*-Varianten in *COH1*.

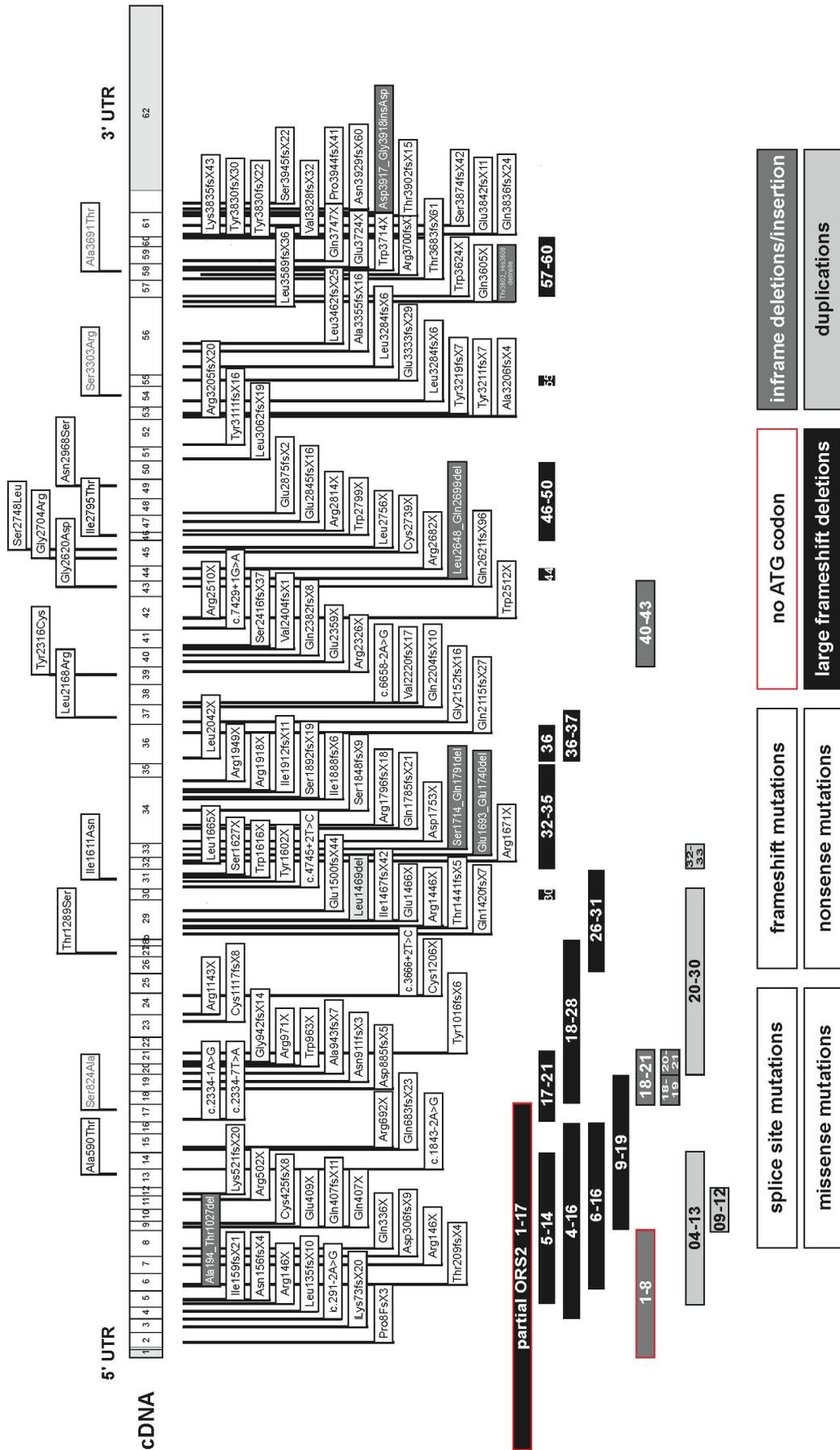


Abbildung 1.6 Zusammenfassung aller bisher bekannten *COHI*-Varianten (Stand: 07/2017). Die *COHI*-cDNA ist schematisch mit proportionalen Exongrößen dargestellt. Putative nsSNV oberhalb der cDNA. Angelehnt an Seifert et al, 2008.

1.7 Phänotyp-Genotyp-Korrelation

Eine eindeutige Phänotyp-Genotyp-Korrelation konnte für das Cohen-Syndrom aufgrund der o.g. klinischen Heterogenität und der geringen Prävalenz nicht erfolgen. Nur innerhalb genetisch isolierter Populationen fielen phänotypische Ähnlichkeiten auf, die auf eine variantenspezifische Symptomausprägung hinweisen. Nach Haplotyp- und *linkage disequilibrium*-Analysen bei finnischen Cohen-Syndrom-Patienten prognostizierte man früh eine Gründermutation (77). Später konnte die gehäuft vorkommende 2-Basen-Deletion (c.3348_3349delCT) identifiziert werden, die dem finnischen Phänotyp mit geistiger Behinderung, Mikrozephalie, motorischen Störungen, Dysmorphie des Gesichts, Muskelhypotonie, RP und Myopie zugrunde zu liegen scheint (2, 25). Bei den betroffenen Amischen in den USA dominiert nach molekulargenetischer Analyse die Nullmutation c.8459T>C in Exon 46 mit führendem Wachstumsdefizit, neurokognitiv-motorischen Einschränkungen und ophthalmologischen Merkmalen. Für die irischen und griechische Patienten konnten zwei Varianten gefunden werden, die eine ähnlichen Phänotyp vermitteln (30, 34). Im Falle der Iren eine Nullmutation c.4471G>T und eine 1-bp Deletion c.11564delA bei den griechischen Patienten. Bei beiden Patientengruppen, gehäuft aber bei den Griechen, ist zusätzlich Autismus beschrieben worden (34).

Ein besonders milder Phänotyp wurde bei einer französischen Patientin dokumentiert, die sich erst im 33. Lebensjahr mit Retinopathie, Neutropenie und milder Dysmorphie, jedoch ohne geistige Behinderung (IQ=100) humangenetisch vorstellte. Molekulargenetische Analysen identifizierten zwei heterozygote *splice-site*-Varianten (IVS34+2T_+3AinsT in intron 34, IVS57+2T>C in intron 57), die in einer Reduktion auf ca. 50% der normalen *COH1*-Expression resultierten. Obwohl die Patientin ebenfalls grenzwertig mikrozephal ist, könnte die verringerte *COH1*-Expression für die neuronale Entwicklung hinreichend gewesen sein, um die kognitiven Einschränkungen zu verhindern. Die Autoren vermuten, dass eine hypomorphe Variante mit einer residualen *COH1*-Expression zu der milden Ausprägung des Syndroms führt. Der phänotypischen Heterogenität des Cohen-Syndroms könnte ein ähnlicher Mechanismus im Sinne eines Expressionsspektrums zugrunde liegen (38).

1.8 Zellbiologie von COH1

COH1 ist ein peripheres Membranprotein, das am Strukturerehalt des Golgi-Apparates (GA) beteiligt ist und somit potentiell den intrazellulären Membrantransport beeinflusst (3).

Aufgrund seiner auffälligen Struktur und prominenten perinukleären Lage beschrieb Camillo Golgi (1843-1926) lichtmikroskopisch den nach ihm benannten Golgi-Apparat. Der GA ist Bestandteil in allen eukaryotischen Zellen und wird von Proteinen auf dem Weg vom rauen Endoplasmatischen Retikulum (rER) zur Zellmembran bzw. dem Extrazellulärraum passiert (78). Man unterscheidet unterschiedliche GA Kompartimente. Einem, dem Nukleus bzw. dem ER zugewandtem *ER-Golgi intermediate compartment* (ERGIC) folgen die *cis*-, *medial*- und *trans*-Golgi-Zisternen und zuletzt das *trans-Golgi network* (TGN).

In tierischen Zellen liegt der GA in der Nähe des Zellkerns und des Zentrosoms. Die 4 bis 6 Golgi-Zisternen sind mit spezifischen Enzymen und Lipiden bestückt. Die Morphologie ist vom Zelltyp, der Funktion und der Zyklusphase abhängig. Zellen in G₀, der Ruhephase des Zellzyklus, haben eine eher kompakte Golgi-Struktur. Sekretorisch hochaktive Zelle, wie Becherzellen des Gastrointestinaltraktes, haben dagegen einen ausgeprägten und aufgelockerten GA. Funktionell ist der GA am Transport und der Reifung sekretorischer und membranständiger Proteine beteiligt. Kompartimentabhängig werden etwa die Entfernung von Mannoseresten, N- und O-Glykosylierungen oder limitierte Proteolyse (z.B. Proinsulin) katalysiert. Alle GA-ständigen Proteine sind membrangebunden und bilden funktionelle Komplexe. Die enzymatischen Reaktionen finden an den Membranen statt.

1.8.1 Funktion des Golgi-Apparates

Der GA bildet strukturell und funktionell die Schnittstelle zwischen dem ER und der Plasmamembran bzw. dem Extrazellulärraum. Der GA vermittelt den anterograden Transport vom ER zur Zellmembran und den retrograden Transport zum ER (79). Neben dem Transport werden die Proteine während der Passage von membrangebundenen Enzymen modifiziert.

Proteine, die aus dem ER zum GA überführt werden sollen, werden durch Signalsequenzen des COPII (*coat protein complex II*)-Proteinen erkannt. Zusätzlich werden sekretorische Moleküle von Transmembranproteinen, wie dem Mannose-bindenden Lectin ERGIC53 (*ERGIC 53 kDa protein*), in Transportvesikel gebunden. Die COPII-Transportvesikel vermitteln den anterograden Transport vom ER zum GA und schnüren sich vom rER (*ER-exit-sites*, *ERES*) ab. Die Vesikel verlieren anschließend ihren COPII-Saum, verschmelzen v-/t-SNARE (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*)-vermittelt in einer homotypischen Fusion und bilden tubulär-vesikuläre Cluster. Die Cluster werden mittels Motorproteinen an Mikrotubuli zum GA transportiert (80, 81).

Die Frage, wie der Molekültransport innerhalb des GA *en detail* realisiert wird, ist bis heute nicht eindeutig geklärt. Aktuell konkurrieren das Vesikeltransportmodell und das Zisternenreifungsmodell (82, 83). Das Vesikeltransportmodell geht davon aus, dass sich die Proteine in COPI -Vesikeln von einer Zisterne abschnüren und mit der folgenden fusionieren, im Sinne eines anterograden Vesikeltransports (83, 84). Zisternen und Enzyme wären also stationär. Im Zisternenreifungsmodell sind die Zisternen dynamische Strukturen, die sich am *cis*-Golgi kontinuierlich bilden und im Verlauf zu *medial*- und *trans*-Zisternen reifen um anschließend als Clathrin- und Exportvesikel abzuschneiden. In diesem Modell bezeichnet die eigentliche *Reifung* die retrograde Zirkulation spezifischer Enzyme der Kompartimente mittels COPIb-Vesikel (85).

Beobachtungen des Transports großer Moleküle, wie etwa Pro-Kollagene, die aufgrund ihrer Größe nicht in COPI-Vesikeln transportiert werden können, sprechen für das Zisternenreifungsmodell (86). Ebenfalls lassen morphologische Daten auf eine Zisternenfusion auf der *cis*-Seite und eine Dissoziation auf der *trans*-Seite schließen (87-89). Gleichzeitig wurde jedoch in COPI-Vesikeln eine vergleichsweise geringe Konzentration von Golgi-Enzymen gemessen, die für die Reifung notwendig wären (90). Zudem wurden Tubuli beschrieben, die sich dynamisch zwischen Zisternen ausbilden. So entstehen inter-zisterniale Verbindungen, die einen schnellen Transport großer, löslicher Proteine ermöglicht, ohne, dass es zwingend zur Progression der Zisternen kommen muss (91, 92).

Die Vielfalt der Hinweise für beide Hypothesen legt die Vermutung nahe, dass es sich um eine hochdynamische Kombination beider Prozesse handeln könnte. Eine mögliche Kombination ist das jüngst beschriebene *rim-progression* (Kantenprogression)-Modell (92, 93). *In vitro* wurden mit einem extrinsischen Proteinaggregat zentrale Membranregionen benachbarter *cis*-Zisternen verbunden. Im zeitlichen Verlauf zeigte sich, dass die zentralen Proteinaggregate an unveränderter Stelle blieben, die Transportproteine jedoch nach wie vor den GA passierten. Zur Erklärung schlagen die Autoren das *rim-progression*-Modell vor, in dem die lateralen Anteile (*rims*) der Zisternen sich durch den GA bewegen.

Essentielle funktionelle Untereinheiten des GA sind kleine GTPasen. Kleine GTPasen regulieren GTP-/GDP-abhängig Signaltransduktionprozesse (94, 95). Initial werden die Rab-GTPasen mittels GEFs (*guanine nucleotide exchange factor*) aktiviert, die wiederum GEFs für die nächsten GTPasen rekrutieren. Rab-GTPasen sind primär mit Membrantransport, die Arf/Arl-Familie mit Vesikelinteraktion (COPI, Clathrin) assoziiert (94, 96).

1.8.2 Molekulare Struktur des Golgi-Apparates

Die Grundeinheit des Golgi-Apparates sind Golgi-*stacks*. Die *stacks* bestehen aus 4 bis 6 flachen, membranumschlossenen Kompartimenten (Zisternen), die zueinander durch Golgi-Matrix-Proteine stabilisiert werden. Korrespondierende Zisternen verschiedener *stacks* werden durch membranöse Tubuli verbunden und bilden so in ihrer Gesamtheit einen einzigen großen Komplex, den GA. Die tubuläre Verbindung wird u.a. durch Mikrotubuli stabilisiert (97).

Jeder *stack* weist eine polarisierte Struktur auf. Die dem rER zugewandte, konvexe Seite ist die *cis*-Seite und die dem rER abgewandte, konkave Seite die *trans*-Seite. Dazwischen liegen die medialen Zisternen. Zusätzlich liegen der *cis*- und *trans*-Seite vor-, respektive nachgelagert, das CGN und TGN. Diese beiden Kompartimente sind an der Proteinsortierung und dem Recycling von Golgi-Proteinen beteiligt. Im CGN werden die rER-ständigen Proteine COPI-vermittelt retrograd zum rER transportiert, die Transportproteine weiter in Richtung *cis*-Golgi geleitet. Das TGN sortiert Moleküle signalabhängig in Lysosomen, Membranen und sekretorische Vesikel.

Die *cis*-, *medial*- und *trans*-Zisternen unterscheiden sich in ihrem enzymatischen Besatz und demnach in ihrer Funktion im Rahmen der Proteinreifung (s.a. 1.7.1).

Aufgrund der o.g. funktionellen und strukturellen Dynamik des Membran- und Proteintransportes kommt den Strukturproteinen des GA eine besondere Rolle zu. Die strukturelle Integrität der Dictyosomen während des Metabolismus und der Mitose wird durch Golgi-Matrix-Proteine (GM) geleistet. Die Golgi-Matrix ist hierbei ein Gerüst aus Proteinen auf der zytoplasmatischen Seite, das die Architektur des GA bestimmt. So ermöglicht die Interkonversion der GM (GM130, Golgin-84) mittels Phosphorylierung während der Mitose die Fragmentierung und subsequente Aufteilung des GA auf die Tochterzellen. Anschließend werden die GM wieder dephosphoryliert und die *stacks* reassemblieren zu einem kompakten GA (98). Im Verlauf der Apoptose werden einige GM (GM130, Giantin, Golgin-97/160) von Caspasen gespalten, sodass es ebenfalls zur Fragmentierung der Golgi-Struktur kommt (99). Zu den GMs gehören die *Golgi reassembly and stacking proteins* (GRASPs) und die mit *coiled-coil*-Domänen ausgestatteten Golgine (z.B. GM130, golgin-45) (100).

1.8.2.1 GRASPs

GRASPs (GRASP65 und GRASP55) sind periphere Membranproteine. GRASP65 ist ausschließlich am *cis*-Golgi lokalisiert und bindet den C-Terminus von dem Golgin GM130. GRASP55 ist analog eher an den *medial/trans*-Kompartimenten lokalisiert und bindet golgin-45 (101, 102). GRASP65-GM130 bildet stabile membrangebundene Homodimere, die untereinander mit benachbarten Membranbereichen oligodimerisieren und somit die Zisternenstruktur

stabilisieren und die Zisternen lateral verknüpfen (*lateral linking*) (102, 103). Gleichmaßen bildet GRASP55-golgin-45 im *medial/trans*-Golgi Oligodimere (104). In RNA-Interferenz-Experimenten (RNAi) zeigte sich, dass bei Verlust je eines GRASPs die Anzahl der Zisternen pro Dictyosom abnimmt, die Gesamtmorphologie des GA jedoch erhalten bleibt. Nur wenn beide GRASPs fehlen, kommt es zur Fragmentierung des GA (104). GRASPs stabilisieren somit die Zisternen der Dictyosomen intern (*cisternal stacking*) und lateral (*ribbon linking*).

1.8.2.2 Golgine

Golgine sind evolutionär hochkonservierte Golgi-Proteine mit ausgeprägten *coiled-coil*-Domänen, deren genaue Funktion bisher unklar ist. *Coiled-coil*-Domänen sind Strukturmodule, die aus mindestens zwei in sich verdrillten α -Helices bestehen und so antennenartige Ausläuferformen, die als Signalstrukturen vor Membraninteraktionen (z.B. *SNARE*) fungieren können (105, 106). Mittels C-terminalem Membrananker oder Bindung an kleine GTPasen sind die Golgine meist auf der zytoplasmatischen Seite der Zisternenmembranen lokalisiert und unterscheiden sich in der Verteilung über den GA. Spezifische Golgine finden am *cis*-Golgi (z.B. GM130, GMAP-210), am *trans*-Golgi (z.B. Golgin-245, GCC185) und an den lateralen Kanten (*rim*s) der Zisternen (z.B. Giantin, Golgin-84) statt (107). Die experimentelle Inaktivierung einzelner Golgine führt zu einer meist nur leichten Dysfunktion des GA. Es wird daher angenommen, dass Golgine eine Art physikalisches Netzwerk von *coiled-coil*-Antennen und unterschiedlichen Bindungsdomänen um den GA ausbilden, die Kontakt zu regulatorischen Kinasen, zytoskeletalen Elementen und kleinen GTPasen ermöglichen (107). So haben viele Golgine Domänen zur Bindung kleiner GTPasen und sind an der Membranfusion bzw. -dissoziation beteiligt (108-110). Während der Mitose und Apoptose werden Golgine durch Phosphorylierung oder Spaltung durch Caspasen inaktiviert.

1.8.3 Subzelluläre Lokalisation von COH1

N-terminal (AS 1-85) und C-terminal (AS 3639-3826) weist COH1 die einzig gesicherten Homologien zu einem anderen Protein auf, dem prokaryotischen Vps13p (*Vacuolar protein sorting 13 protein*). Vps13p wurde erstmals in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* beschrieben. In der Hefe ist Vps13p am vesikulären Transport zwischen dem prävakuolären Kompartiment und dem TGN (111), an der Sporulation (112-114) und der Spindelpolorganisation über Bindung an das Hefe-Zentrin Cdc31p (115) beteiligt. COH1 ist entgegen initialer Vorhersagen ein peripheres Membranprotein (3, 63). In Kolokalisierungsstudien konnte für COH1 eine subzelluläre Position am *cis*-Golgi-Marker GM130 beschrieben werden, welche durch eine C-terminale Domäne vermittelt wird (3). Zusätzlich kolokalisierte COH1 in den *ERES* mit ERGIC53. COH1

kolokalisiert ebenfalls mit dem Trans-Golgi-Marker TGN46, einem Protein, das am Endosomen-TGN-Recycling beteiligt ist. COH1 scheint funktionell demnach mit prä-, intra- und post-Golgi-Kompartimenten assoziiert zu sein (3).

1.8.4 Molekulare Veränderungen bei *COH1*-Defizienz

In Fibroblastenkulturen von Cohen-Syndrom Patienten und RNAi-*in vitro*-Experimenten zeigte sich bei fehlendem COH1 eine ausgeprägte Fragmentierung des GA (3). Der Golgi-*stack* ist in *mini-stacks* fragmentiert, eine Auflösung in *cis/medial/trans*-Golgi ist nicht mehr möglich. Nach Behandlung mit dem Mikrotubuli-Polymerisierungsinhibitor Nocodazol, das subzellulär ebenfalls eine Fragmentierung des GA induziert, waren Kontrollzellen in der Lage, den GA zu reassemblieren. In *COH1*-defizienten Zellen blieb er fragmentiert (3). COH1 ist also an der Erholung der kompakten GA-Struktur beteiligt. Die vergleichbare GA-Morphologie zwischen Patientenfibroblasten und HeLa-Kulturen nach *COH1*-RNAi legt nahe, dass die betreffenden PTC-Mutationen in *COH1* mit einem kompletten Funktionsverlust einhergehen.

Serumproteine von Cohen-Syndrom-Patienten zeigen ein atypisches Glykosylierungsmuster (116). Eine Akkumulation von Unterkomplexen an α -mono-galaktosylierten und α -sialysierten N-Glykosylierungen wurde bei untersuchten Patienten dokumentiert. Zusätzlich wurden für die hochglykosylierten Proteine ICAM-1 (*intercellular cell adhesion molecule 1*) und LAMP-2 (*Lysosome-associated membrane protein 2*) gezeigt, dass sie sowohl in *COH1*-RNAi-Experimenten als auch in Patienten-Monozyten ein geringeres Molekulargewicht aufweisen als in Kontrollen. Diese Beobachtung kann durch einen geringeren Besatz mit Oligosacchariden erklärt werden. Ein Funktionsverlust von COH1 scheint also mit einer Hypoglykosylierung von Proteinen einherzugehen (116).

1.9 Zielstellung

Das pathogene Potential der Cohen-Syndrom-assoziierten *COH1*-nsSNV ist ungeklärt. Eine Einteilung der nsSNV gemäß des ACMG-Leitfadens zur Charakterisierung von Sequenzvariationen ist bisher nicht erfolgt. Ziel dieser Arbeit ist es, *in silico und in vitro* die Auswirkungen der nsSNV zu beurteilen.

2 Material und Methoden

2.1 Material

Chemikalien und Lösungen wurden, sofern nicht gesondert aufgeführt, bei Sigma-Aldrich (München), Roth (Karlsruhe) oder Merck (Darmstadt) in der höchsten Reinheitsstufe bezogen.

2.1.1 Vektoren

2.1.1.1 Ausgangsvektoren

Für die transiente Expression von rekombinantem Protein in Säugerzellen kamen in dieser Arbeit folgende Vektorsysteme zum Einsatz:

pcDNA3.1/V5-His(TOPO) (Invitrogen) ist ein für eukaryote Zellen geeignetes Expressionsplasmid. Es enthält einen CMV-Promotor, ein C-terminales V5 Epitop und einen C-terminalen His6-Tag. Dieses Klonierungssystem besitzt darüber hinaus eine Topoisomerasefunktion zur Ligase-unabhängigen Klonierung. Für Selektionszwecke beinhaltet es das Resistenzgen gegen das Antibiotikum Ampicillin. Der Vektor wurde benutzt um das wildtyp *COH1* zu klonieren; durch Einbringen des wildtyp Stop-Codons entsteht ein Expressionsplasmid ohne *Tag* (s.a. Abb. 2.1 A).

pCMV-myc (BD Clontech) ist ein für eukaryote Zellen geeignetes Expressionsplasmid. Es enthält einen CMV-Promotor und eine Multiple-Klonierungsstelle (MCS), durch die das Gen der Wahl mit einem N-terminalen myc-Tag fusioniert werden kann. Die Selektion erfolgt über ein Ampicillin-Resistenzgen (s.a. Abb. 2.1 B).

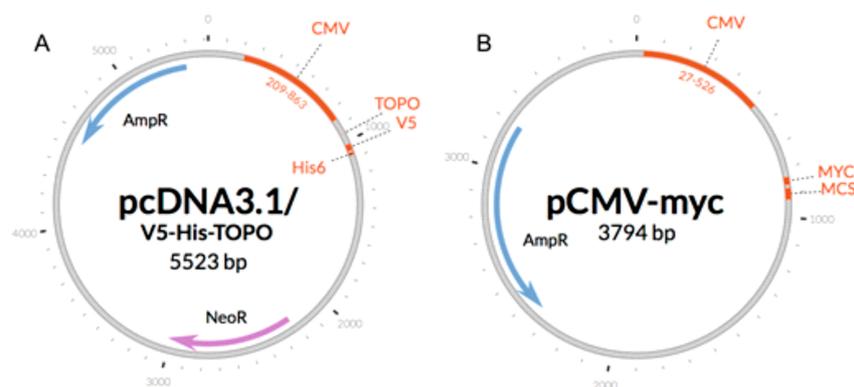


Abbildung 2.1 Schematische Darstellung der verwendeten Vektorsysteme: A) *pcDNA3.1/V5-His-TOPO* und B) *pCMV-myc*. AmpR: Ampicillin-Resistenzgen, NeoR: Neomycin-Resistenzgen, NeoR: Neomycin/Kanamycin-Resistenzgen, CMV: humaner Zytomegalievirus-Promotor, MCS: *multiple cloning site*, MYC: myc-Epitop, TOPO: TOPO-TA-*cloning site*, V5: V5-Epitop, His6: Polyhistidin-Tag.

2.1.1.2 Expressionsvektoren

In Tabelle 2.1 ist die Bezeichnung und die Eigenschaften aller COH1 Vektoren, die in dieser Arbeit hergestellt und verwendet wurden, zusammengefasst. Für die verschiedenen COH1-SNV wurde ebenfalls ein entsprechender pCMV-myc_hCOH1-mut Vektoren hergestellt, diese sind nicht gesondert aufgeführt, da sie für weitere Anwendungen in dieser Arbeit nicht genutzt wurden.

Tabelle 2.1 In dieser Studie angewandte bzw. hergestellte Expressionsvektoren.

Vektor	Eigenschaften	Hersteller
pcDNA3.1_hCOH1-wt	CMV-Promotor, Neor, Ampr	Seifert et al., 2011
pcDNA3.1_hCOH1-mut_Ala590Thr	CMV-Promotor, Neor, Ampr	eigene Herstellung
pcDNA3.1_hCOH1-mut_Ser824Ala	CMV-Promotor, Neor, Ampr	eigene Herstellung
pcDNA3.1_hCOH1-mut_Ile1611Asn	CMV-Promotor, Neor, Ampr	eigene Herstellung
pcDNA3.1_hCOH1-mut_Leu2168Arg	CMV-Promotor, Neor, Ampr	eigene Herstellung
pcDNA3.1_hCOH1-mut_Tyr2316Cys	CMV-Promotor, Neor, Ampr	eigene Herstellung
pcDNA3.1_hCOH1-mut_Gly2620Asp+Asn2968Ser	CMV-Promotor, Neor, Ampr	eigene Herstellung
pcDNA3.1_hCOH1-mut_Gly2704Arg	CMV-Promotor, Neor, Ampr	eigene Herstellung
pcDNA3.1_hCOH1-mut_Ser2748Leu	CMV-Promotor, Neor, Ampr	eigene Herstellung
pcDNA3.1_hCOH1-mut_Ile2795Thr	CMV-Promotor, Neor, Ampr	eigene Herstellung
pcDNA3.1_hCOH1-mut_Asn2968Ser	CMV-Promotor, Neor, Ampr	eigene Herstellung

Neor: Neomycinresistenz, Ampr: Ampicillinresistenz

2.1.2 Primer

Tabelle 2.2 Auflistung der Klonierungsprimer. Rote Markierung entspricht dem Basenaustausch.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5' → 3')	Firma
Ala590Thr_F	GATTTTCGTTTGGATAGCAGTACCGTGCATAG	Eurofins Genomics
Ala590Thr_R	TTTTCAAAATCCTATGCACCGTACTGCTATCC	Eurofins Genomics
Ser824Ala_F	CATCTTGAAATGTCAGCTCTCCCGAGTGAT	Eurofins Genomics
Ser824Ala_R	TCAAAGCTTCAATCACTGCGGCAGAGCTGACA	Eurofins Genomics
Thr1289Ser_F	GCTGACATTGGGACTACTAGTGAGGGAGATTCTATACAA	Eurofins Genomics
Thr1289Ser_R	TTGTATAGAATCTCCCTCCTAGTAGTCCCAATGTCAGC	Eurofins Genomics
Ile1611Asn_F	TAGATCTGCAGTCCATCAATAATGGTACTGCA	Eurofins Genomics
Ile1611Asn_R	TGATGCCACTGTGCAGTACCAATATTGATGGA	Eurofins Genomics
Leu2168Arg_F	TCAGTATAAACGATTTTCTCCGTAAAACAAGT	Eurofins Genomics
Leu2168Arg_R	CTTTCTTTGAGACTTGTTTTACGGAGAAAATC	Eurofins Genomics
Tyr2316Cys_F	CAGGGATGATGTTATGGAGATGTCCAGAACCT	Eurofins Genomics
Tyr2316Cys_R	GTGAGTACTCTAGGTTCTGGACATCTCCATAA	Eurofins Genomics
Gly2620Asp_F	CAGGAGACACTGCGGTTTGACCAGGTGGATACTGATGAA	Eurofins Genomics
Gly2620Asp_R	TTCATCAGTATCCACCTGGTCAAACCGCAGTGTCTCCTG	Eurofins Genomics
Ala2691Thr_F	ACATCCATCACCAACCTCACACAAGCCTGGCCCCGAAC	Eurofins Genomics
Ala2691Thr_R	GTTCCGGGCCAGGCTTGTGGTGGAGGTTGGTGGATGATGT	Eurofins Genomics
Gly2704Arg_F	CAAAAACAGATTATCATCTGTAGAAGACAGAT	Eurofins Genomics
Gly2704Arg_R	AACTACAGATGATCTGTCTTCTACAGATGATA	Eurofins Genomics
Ser2748Leu_F	CAGCCAAACAGAAATTGCCTTGTACATACTA	Eurofins Genomics
Ser2748Leu_R	TCATTGTTTCTAGTATGTACAAGGCAATTT	Eurofins Genomics
Ile2795Thr_F	TGCCATCTTCAAACAGTTCCAATATTATGTC	Eurofins Genomics
Ile2795Thr_R	ACTGTGCACCAGACATAAATAGTGGAACTGTT	Eurofins Genomics
Asn2968Ser_F	TGCCCTGGGCCCTGCTTATCAGTGAATCCAAA	Eurofins Genomics

Asn2968Ser_R	CAGAGGTCCCATTGGATTCACTGATAAGCAG	Eurofins Genomics
Ser3303Arg_F	GAAGTAACTGAGTGGCGTGTATGCCATTGACATCAAC	Eurofins Genomics
Ser3303Arg_R	GTTGATGTCAATGGCATCACGCCACTCAGTTGTTACTTC	Eurofins Genomics
Ala3691Thr_F	ACATCCATCACCAACCTCACACAAGCCTGGCCCGGAAC	Eurofins Genomics
Ala3691Thr_R	GTTCCGGGCCAGGCTTGTGGGAGGTTGGTATGGATGT	Eurofins Genomics
Val759Leu_F	TACTGCTTACCTGTACCACTTATTCCCTCTTTCAGCACT	Eurofins Genomics
Val759Leu_R	AGTGCTGAAAGAGGGAATAAGTGGTACAGGTAAGCAGTA	Eurofins Genomics
Ser1834Leu_F	TGTATGGCCTTATCCAAATTGAAATCACAGAAGCAGAAG	Eurofins Genomics
Ser1834Leu_R	CTTCTGTTCTTGTGATTTCAATTTGGATAAGGCCATACA	Eurofins Genomics
Gly3407Arg_F	GGAGCTGGTCCCCTCCCTCGGGAAGAGCCTGTGGCTGCG	Eurofins Genomics
Gly3407Arg_R	CGCAGCCACAGGCTCTTCCCAGGGAGGGGACCAGCTCC	Eurofins Genomics

Tabelle 2.3 Liste der für die Sequenzierung verwendeten Primer.

Bezeichnung	Oligonukleotidsequenz (5' → 3')	Firma
hCOH1_ex02F	CCGTCGATCTACAGCTTTC	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex07F	GAAGGCGAAATAGAGGACCTTAC	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex08F	CACAGCAAGATGAGGAGCAG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex08R	CTGCTCCTCATCTTGTGTG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex10R	AAGGGCCTCAACTGTAGTTCC	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex13F	GATAGCAGTGCGGTGCATAG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex14R	AGAAGAGCCACCTCTTCAGG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex16F	AGGCAGGACTGACGTCTTTG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex16R	CAGCATGTGGGAGTTTCAG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex19F	TAGCACCAAGTGGCTCAATG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex19R	CAGAAGGACCCTGAAGCAAG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex24F	GCTTTTCTTGGACGATCAG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex24R	AGTGGAGGTGCAACCCATAG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex25F	TATAGGCACAGCTCCTCCAG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex26F	GATGCAGTGGGTGCTTCC	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex28bF	TTGGCAGTCAGGACATTTTG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex28bR	AAATGTCCTGACTGCCAACC	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex29F	CATCCCGCAATTTACCTTTG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex29R	ATCCATGCTGCTGATGAGTG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex30R	CATGGCAACAGAGCCAATC	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex31F	AGCCCTTGAGTGGAATATGG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex32F	GCGGCATCAAGAAAGGAGAG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex32R	TGCTCCAGTTATTCGGACAG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex34F	TTATTGTGTCACGCTTCC	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex34R	CTTCCACTCGCTGCTTTCTG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex35F	CCTGAAGCCCTTGATTATTGC	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex38R	GATGACATTTGAGGCACTGG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex39F	TGCCAGGGATGATGTTATG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex39R	CATCACCAAGGTCTGCTGTG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex41R	TGCTTTGAGAACCAGACTCAC	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex43F	TGGTCTTCAGCCATTTGTG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex44R	GCCCCAACCTTCAATACAGA	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex45F	TCGTTACAGATTACATTGGTC	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex45R	CGAAGGCAATTTCTGTTTGG	Biotex Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex48F	GTACACCCTGGAGGCACAGT	Biotex Berlin Buch GmbH

hCOH1_ex49R	TTGACAGCTTCACTCGCATT	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex50F	TGGTGAAGTTGTGACACTGG	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex52F	ATGAAATCCAGCTCCCTTCC	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex52R	AGCCCAGCATGATCTGTTTC	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex53R	TCACTCCGAGGTGTTCTTGA	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex56F	CTGGTCACTCCACACACCTC	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex56R	CTGGCTGGATCACCAGTTTC	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex58/59R	ATACCAGCAATTGCACCAAG	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex58F	TCTCACTGGATGAGGAGCAC	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex59F	GATCAGCCGATGCAGAACTT	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex59R	CCAGTCTGTGACACCAGCTC	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex61F	CAAGAGTGGCCTGTGATGTG	Biotez Berlin Buch GmbH
hCOH1_ex62R	ACCACAGGGCATGGTATTTG	Biotez Berlin Buch GmbH
CMV_F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	Invitrogen
BGH_R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	Invitrogen

2.1.3 Lösungen, Puffer und Medien

Alle Lösungen wurden, wenn nicht anders angegeben, mit doppelt-destilliertem H₂O (ddH₂O) hergestellt.

Tabelle 2.4 Übersicht der verwendeten Lösungen, Puffer und Medien nach Anwendungsbereich.

Bezeichnung	Menge bzw. Konzentration	Substanz
Agarosegelelektrophorese		
50x TRIS-Acetat-EDTA (TAE)	242 g 10 ml 57,1 ml ad 1l	Tris 0,5 M EDTA (pH 8,0) Eisessig ddH ₂ O
Agarosegel	1,5% (w/v) in	Agarose 1x TAE
Ladepuffer	-	DNA gel loading dye (6x) (Life Technologies)
DNA Farbstoff	-	GelRed (10.000x) (Biotium)
SDS-PAGE		
5x Lämmli-Puffer	2% (w/v) 0,01% (w/v) 62,5 mM 5% (v/v) 25% (v/v)	SDS Bromphenol blau Tris-HCL (pH 6,8) Mercaptoethanol Glycerol
Ponceau Rot	20 g/l 50 ml/l	Ponceau S Eisessig
Blockmilch	1x 0,1% (v/v) 5% (w/v)	TBS NP-40 Magermilchpulver
Elektrophoresepuffer 10x	250 mM 2 M 1% (w/v)	Tris Glycin SDS
Transferpuffer 10x	250 mM 2 M	Tris Glycin

Transferpuffer 1x	200 ml 400 ml ad 1,4 l	10x Transferpuffer Methanol ddH ₂ O
TBS 10x	1,37 M 27 mM 250 mM pH 7,4 ad 1l	NaCl KCl Tris HCl ddH ₂ O
Waschpuffer 1x	1x 10% (v/v)	TBS NP-40
Polyacrylamidgel	3-8%, 1.0 mm	NuPAGE® Novex® Tris-Acetate Gel (Invitrogen)
Immunofluoreszenz		
PFA	3% (w/v) in	Paraformaldehyd (Merck) 1x PBS
1% BSA/1xPBS	1% (w/v) in	Bovines Serumalbumin (ICN Biomedicals) 1x PBS
PBS 10x	80 g/l 2 g/l 26,8 g/l 2,4 g/l pH 7,4	NaCl KCl Na ₂ HPO ₄ *7H ₂ O KH ₂ PO ₄ HCl
Medien		
LB-Agar	5 g/l 10 g/l 10 g/l 15 g/l	Hefeextrakt Trypton NaCl Agar
LB-Medium	5 g/l 10 g/l 10 g/l	Hefeextrakt Trypton NaCl
HeLa-, NIH3T3-, C12C2-,	500 ml 5% (v/v) 1% (v/v)	DMEM (Gibco) FCS 200 mM Glutamine Lösung (Lonza)
Hek293-, MC3T3-Medium	500 ml 5% (v/v) 1% (v/v)	MEM Alpha Eagle (Lonza) FCS 200 mM Glutamine Lösung (Lonza)

2.1.4 Enzyme

Die in Tabelle 2.5 aufgeführten Enzyme umfassen DNA-Polymerase für PCR-Reaktionen, Restriktionsendonukleasen für analytische und präparative Anwendungen und eine DNA-Ligase zur Esterbindung von DNA-Strängen.

Tabelle 2.5 Übersicht der verwendeten Enzyme und zugehörigen Puffer.

Substanz	Hersteller	Puffer
5x HOT FIREPol® EvaGreen® Mix	Solis Biodyne	-
DpnI	NEB Inc.	10x NEB Puffer 2
HindIII	Fermentas GmbH	10x Puffer R
InviTaq	Invitrogen	5x NH ₄ Reaktion Buffer with MgCl ₂
Phusion	NEB Inc.	10x HF Puffer
T4-Ligase	NEB Inc.	10x Ligase Puffer

2.1.5 Transfektionsagenzien

Tabelle 2.6 Übersicht der genutzten Transfektionsagenzien und kombinierte Medien bzw. Lösungen

Agenz	Hersteller	Puffer (Hersteller)
INTERFERin	Polyplus-transfection	Opti-MEM (ThermoFisher)
jetPEI	Polyplus-transfection	NaCl 0,9% (eigene Herstellung)

2.1.6 Antikörper

Die aufgeführten Antikörper fanden sequentiell im Proteinnachweis auf Westernblots und in der Immunofluoreszenz Anwendung. Die entsprechenden Konzentrationen der Antikörper zur optimalen Epitop-Bindung und Visualisierung wurden in Einzelversuchen bestimmt (Tab. 2.7 und 2.8).

Tabelle 2.7 Zusammenstellung der verwendeten Primärantikörper.

Bezeichnung	Antigen (Fab)	Herkunft (Fc)	Konzentration		Hersteller
			WB/IF		
m α GM130	GM130	Maus	-	1/500	BD Transduction Lab.
rb α COH1	COH1	Kaninchen	1/1000	1/50	Seifert et al., 2011(3)
rb α RAB6 (C-19)	RAB6	Kaninchen	-	1/500	Santa Cruz
m α LAMP1 (H4A3)	LAMP1	Maus	-	1/500	DSHB
m α EEA1	EEA1	Maus	-	1/250	BD Transduction Lab.
m α Clathrin	Clathrin	Maus	-	1/500	BD Transduction Lab.
m α Calnexin	Calnexin	Maus	-	1/250	Santa Cruz

WB: Westernblot, IF: Immunofluoreszenz, Fab: fragment antigen binding, Fc: fragment crystallisable

Tabelle 2.8 Zusammenstellung der verwendeten Sekundärantikörper.

Bezeichnung	Antigen (Fab)	Herkunft (Fc)	Konjugat	Konzentration		Hersteller
				WB/IF		
dk α m Cyt-3	Fc Maus	Esel	Cy3	-	1/250	Dianova GmbH
dk α rb Cyt-2	Fc Kaninchen	Esel	Cy2	-	1/250	Dianova GmbH
HRP α m	Fc Maus	Ziege	HRP	1/3000	-	DAKO GmbH
HRP α rb	Fc Kaninchen	Schwein	HRP	1/3000	-	DAKO GmbH

WB: Westernblot, IF: Immunofluoreszenz, Fab: fragment antigen binding, Fc: fragment crystallisable

2.1.7 siRNAs

Tabelle 2.9 Zusammenstellung der Zielsequenzen der verwendeten siRNAs.

Bezeichnung (siRNA ID)	Bezeichnung (Produktnummer)	cDNA Zielsequenz (5'-3')	Spezies	Hersteller
scramble	Silencer negative control siRNA#1	k.A.	-	Ambion
#25721	COH1 Silencer pre-designed siRNA	caGGAAGTGAATACCATTct	Hs, Rt, Ms	Ambion
#s233217	Vps13b Silencer select pre-designed	caGAGTTGGTCTCATATTGGAtt	Ms	Ambion
#s233218	Vps13b Silencer select pre-designed	ttGACTTAGAGTCATTAGAGAtt	Ms, Rt	Ambion
#s233219	Vps13b Silencer select pre-designed	aaGCAGGACCCATATTTACCAtt	Ms	Ambion

Hs: Mensch, Ms: Maus, Rt: Ratte

2.1.8 Kulturen

2.1.8.1 Bakterien

TOP10 (E.coli), Invitrogen

2.1.8.2 Zellkulturen

HeLa ist eine permanente Zelllinie mit epithelialem Wachstumscharakter, die ursprünglich aus humanem Zervixkarzinomgewebe gewonnen wurde (117).

Hek293 ist eine permanente Zelllinie, die durch Transformation mit DNA-Teilstücken des menschlichen Adenovirus 5 aus menschlichen embryonalen Nierenzellen (*human embryonic kidney cells*) gewonnen wurde (118).

NIH3T3 ist eine aus embryonalen Fibroblasten der Maus spontan immortalisierte Zelllinie (119).

MC3T3 ist eine permanente Zelllinie aus spontan immortalisierten murinen Osteoblasten-Vorläuferzellen (120).

B16F1 ist eine permanente Zelllinie, die aus murinem Melanomgewebe kultiviert wurde (121).

C2C12 ist eine permanente Zelllinie aus spontan immortalisierten murinen Myoblasten (122).

2.1.9 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 2.10 Auflistung verwendeter Verbrauchsmaterialien.

Bezeichnung	Hersteller
Ampicillin	Sigma-Aldrich
cOplete EDTA-free	Sigma-Aldrich
Dimethylsulfoxid (DMSO)	NEB Inc.
ECL	GE Healthcare
Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit Two	Stratec Molecular
Kanamycin	Sigma-Aldrich
NucleoBond Xtra Midi EF	Macherey Nagel
Ultrazentrifugenröhrchen	Beckman Coulter

Whatman-Papier (Gel Blotting Paper GB005)	Whatman
---	---------

2.1.10 Geräte

Tabelle 2.11 Übersicht genutzter Geräte.

Bezeichnung	Bezeichnung/Größe, Hersteller
Brutschrank Zellkultur	Hera Cell 150, Heraeus
Elektrophoresegerät (Agarose-Gelelektrophose)	Pharmacia LKB GPS 200/400, Amersham Pharmacia
Elektrophoresegerät (SDS-PAGE)	Bio-Rad Power Pac 2.1, Bio-Rad Labs GmbH
Filmentwickler	Agfa Curix 60, PMA Bode
Heizblock	Thermomixer comfort Eppendorf 1,5ml 90W, Eppendorf AG
Leica Fluoreszenzmikroskop	Leica DMRB
LSM 5 Exciter	Carl Zeiss MicroImaging GmbH
NanoPhotometer	Implen GmbH
PCR Cycler	PCR-Cycler PTC-220 DNA Engine Dyad™ Peltier Thermal Cycler, MJ Research Inc.
pH-Meter	Knick 766 Calimatic, Knick
Real-time Cycler	7900 Fast, Applied Biosystems
Roller-Rad	A. Hartenstein GmbH
Rotor Ultrazentrifuge	TLA 110, Beckman Coulter
Schwenktisch	Biometra GmbH
steriler Arbeitsplatz Zellkultur	Hera Safe HS 12/2, Heraeus
Tischzentrifuge	Micro 200R Typ 2405, Hettich Zentrifugen
Ultrazentrifuge	Optima MAX-XP, Beckman Coulter
Waage	BP210S, Sartorius

2.2 Molekulargenetische Methoden

2.2.1 Polymerasekettenreaktion

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein Verfahren zur enzymatischen *in vitro*-Amplifikation von DNA-Sequenzmolekülen, im Weiteren auch als Matrize bezeichnet.

Grundsätzlich werden in zyklischen Denaturierungs-, Annäherungs- und Elongationsschritten sequenzhomologe Kopien einer Matrize erzeugt. Die Denaturierung erfolgt bei 98 °C unter Zugabe von Dimethylsulfoxid (DMSO). DMSO inhibiert die Ausbildung von Sekundärstrukturen insbesondere GC-reicher Domänen und somit die Reassoziaton der DNA-Stränge. Bei 55-61 °C lagern sich die Oligonukleotidprimer der Matrize an. Bei 72 °C werden die Primer durch thermostabile Polymerasen unter Bindung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) entsprechend der Matrizensequenz elongiert. Aufgrund unterschiedlicher Anforderungen in dieser Arbeit waren verschiedene Polymerasen und Zykluslängen notwendig.

Die PCR wurde zum Nachweis der erfolgreichen Ligation bzw. Transformation in gewachsenen Kolonien in der Kolonie-PCR (s. 2.2.2 *Kolonie-PCR*) und zum Einbringen von Punktmutationen (s. 2.2.3 *Mutagenese-PCR*) genutzt. Alle PCRs wurden auf dem DNA Engine DYAD - Peltier Thermal Cycler (MJ Research) ausgeführt.

2.2.2 Kolonie-PCR

Für die Kolonie-PCR wurden die auf Agar-Platten gewachsenen Kolonien einer Klonierung mit einer sterilen Pipettenspitze aufgepickt und in 5 µl HPLC-H₂O resuspendiert. Enthalten die Mikroorganismen das transformierte Plasmid, dient es in der folgenden PCR als DNA-Matrize. Zwei plasmid- und insertspezifische Primerpaare deckten die Ligationen ab, also den Übergang von Insert zu Vektor ab. In Tabellen 2.12 und 2.13 sind die verwendeten Substanzen und das PCR-Temperaturprofil aufgeführt.

Tabelle 2.12 Einfacher Reaktionsansatz für die Kolonie-PCR.

Substanz	Menge
HPLC-H ₂ O	5,5 µl
10x Invitex buffer	1,5 µl
dNTPs (10 mM)	0,15 µl
Taq DNA Polymerase (5U/µl)	0,15 µl
DMSO	0,75 µl
Kolonie-Suspension	5,0 µl
Primer F (10 pmol/µl)	0,75 µl
Primer R (10 pmol/µl)	0,75 µl
Σ	15 µl

Tabelle 2.13 Zyklisches Temperaturprofil für die Kolonie-PCR.

Temperatur	Zeit	Zyklus
95 °C	3 min	
95 °C	30 s	x 3
61 °C	45 s	
72 °C	1:30 min	
95 °C	30 s	x 3
59 °C	45 s	
72 °C	1:30 min	
95 °C	30 s	x 3
57 °C	45 s	
72 °C	1:30 min	
95 °C	30 s	x 37
55 °C	45 s	
72 °C	1:30 min	
72 °C	10 min	
4 °C	-	

2.2.3 Mutagenese-PCR

Die in dieser Arbeit untersuchten nsSNV führen im translatierten Protein zum Austausch einer Aminosäure. Demnach war die Veränderung nur im entsprechenden kodierenden Basentriplett

notwendig. Als Matrize für eine Mutagenese-PCR wurde ein COH1-Wildtyp-Expressionsvektor verwendet (123). Die mutagenen Primer enthalten (s. Tabelle 2.2) neben der Wildtyp-Sequenz die gewünschten *COH1*-SNV. Ausgangssubstrate waren der pcDNA3.1_hCOH1-wt-Vektor und die Primer. Nach der Denaturierung des Vektor-Doppelstranges ermöglichte der homologe Abschnitt des Primers, trotz veränderter Base, die korrekte Hybridisierung an den Wildtypstrang. In der Elongationsphase konnte nun die Phusion-Polymerase den jeweils komplementären Strang von den Primern ausgehend synthetisieren. Im Verlauf wurde somit der gesamte Vektor mit den in den Primern vorliegenden Varianten synthetisiert. Die besonderen Anforderungen dieses Experimentes bedurften einiger Modifikationen der üblichen PCR-Protokolle. Aufgrund der Größe der DNA-Matrize von ca. 16000 bp wurde die Elongationszeit bei einer Syntheserate von ~1 min pro kb auf 18 min verlängert. Zur Optimierung der Primerbindung wurde die Anlagerungstemperatur auf 55 °C gesenkt. Die Verwendung einer *proof reading* Phusion-Polymerase verhindert den bei Taq-Polymerase üblichen 3'-Deoxyadenosin-Überhang, der zu einer Leserasterverschiebung führen würde. Die Selektion der neu synthetisierten Vektoren von den Wildtyp-Vektoren erfolgte später mithilfe von einer Restriktionsendonuklease DpnI, die ausschließlich methylierte und hemimethylierte DNA spaltet (Abb. 2.2 und Abschnitt 2.2.6). In Tabellen 2.14 und 2.15 sind die verwendeten Substanzen und das PCR-Temperaturprofil aufgeführt.

Tabelle 2.14 Einfacher Reaktionsansatz für die Mutagenese-PCR.

Substanz	Menge
HPLC-H ₂ O	12,0 µl
5x Phusion HF buffer	4,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,8 µl
Phusion DNA Polymerase (2 U/µl)	0,2 µl
Plasmid (20 ng)	1,0 µl
Primer F (10 pmol/µl)	1,0 µl
Primer R (10 pmol/µl)	1,0 µl
Σ	20 µl

Tabelle 2.15 Zyklisches Temperaturprofil für die Mutagenese-PCR.

Temperatur	Zeit	Zyklus
98 °C	30 s	
98 °C	10 s	x 15
55 °C	60 s	
72 °C	18 min	
72 °C	60 min	
4 °C	-	

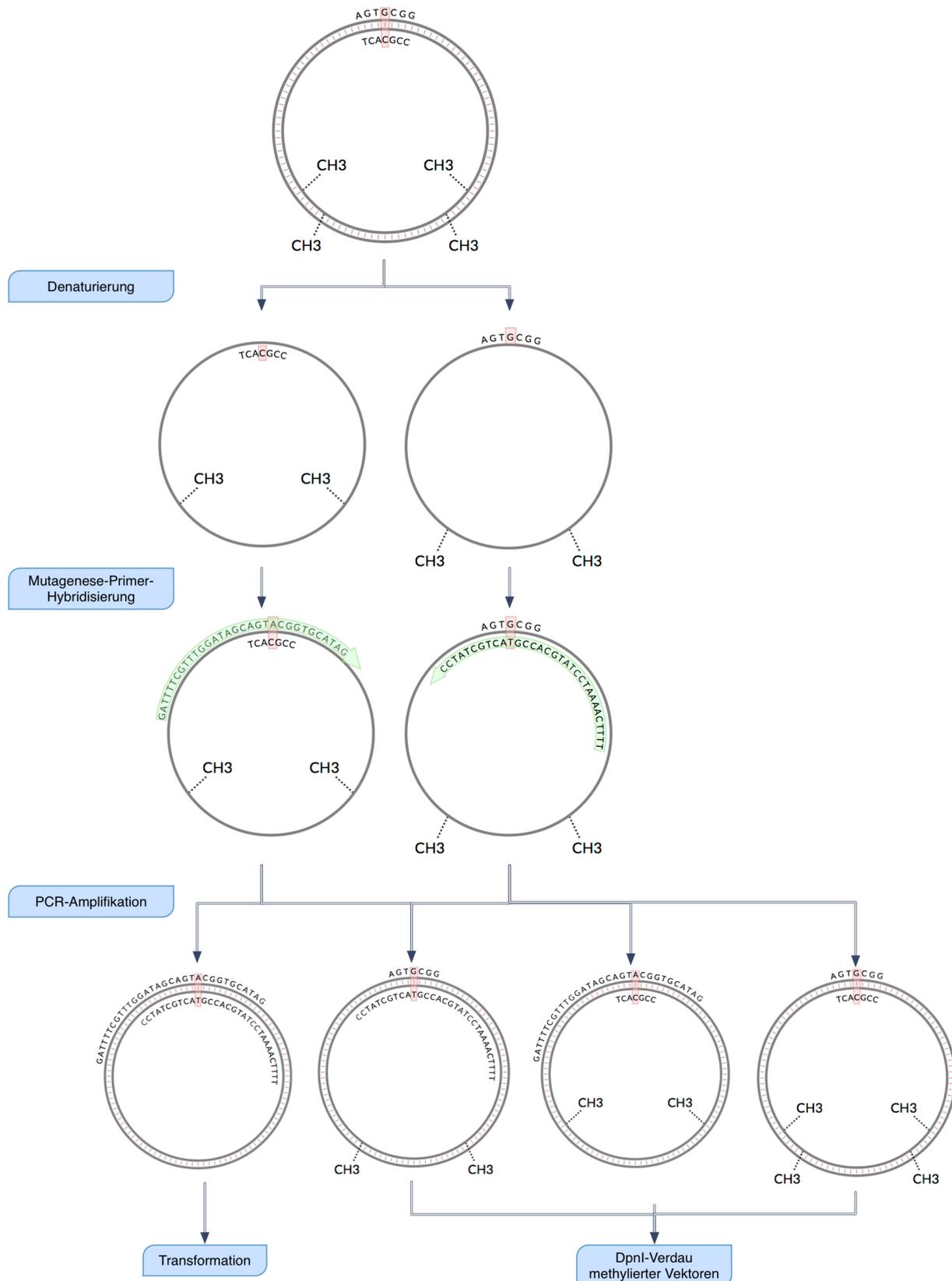


Abbildung 2.2 Schematische Darstellung der Mutagenese-PCR am Beispiel der SNV c.1768G>A. Matrizensequenz schematisch, Primer in originaler Länge und Sequenz. Details s. Text. CH3: Methylgruppen, grüner Pfeil: Polymeraserichtung, rote Markierung: SNV-Lokus

2.2.4 Relative Quantitative-PCR

Die relative Quantitative-PCR (qPCR) ist eine Methode zur quantitativen Analyse doppelsträngiger DNA-Moleküle. Während der PCR-Zyklen interkaliert ein Reporter-Farbstoff mit der DNA. Die externe Anregung dieser Moleküle ermöglicht die optische Erfassung des Substrates. Die Fluoreszenzintensität verhält sich dabei annähernd proportional zur DNA-Menge. Der Prozess erfolgt in Echtzeit, das heißt parallel zur Amplifikation, und wird daher auch als *Real Time-PCR* bezeichnet. Eine korrekte Quantifizierung ist nur in der kurzen exponentiellen Phase, nicht in der späteren Plateauphase der PCR möglich. Hier wurde der C_T -Wert (*cycle threshold*) ermittelt, bei dem die Fluoreszenz erstmals exponentiell über den Hintergrund ansteigt. Anstatt des klassischen SYBR Green DNA-Farbstoffes wurde EvaGreen verwendet, der mit der PCR-Reaktion weniger interferiert (124) (Tab. 2.15). Die Reaktionen und Analysen wurden mit dem Fast Real-Time PCR 7500 System (Applied Biosystems) durchgeführt und mit SDS2.1 Software mittels der $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Methode ausgewertet (125). Im Anschluss wurde zur Spezifitätskontrolle des PCR-Produktes die Schmelzkurve aufgenommen und ausgewertet (Tab. 2.16).

Tabelle 2.16 Einfacher Reaktionsansatz für die Mutagenese-PCR.

Substanz	Menge
cDNA (1:50)	10 µl
5x HotFirePol EvaGreen HRM Mix	2,0 µl
Primer F (5 µmol)	1,0 µl
Primer R (5 µmol)	1,0 µl
HPLC-H ₂ O	6 µl
Σ	20 µl

Tabelle 2.17 Zyklisches Temperaturprofil für die qPCR und Schmelzkurve (hellgrau unterlegt).

Temperatur	Zeit	Zyklus
50 °C	2 min	1x
95 °C	10 min	1x
95 °C	15 s	40x
60 °C	1 min	
95 °C	15 s	
60 °C	1 min	1x
95 °C	15 s	

2.2.5 Agarosegelelektrophorese

Bei der Gelelektrophorese werden DNA-Moleküle in einem Agarosegel nach ihrer Molekülgröße aufgetrennt. Die Proben wurden mit Ladebuffer und Zugabe des Interkalans GelRed (VWR International GmbH) versetzt, in hinreichend große Taschen des Agarosegels gefüllt und in 1x TAE bei 95V aufgetrennt. Je nach Molekülgröße variierte die Elektrophoresezeit von 30 bis 60 min. Die Zugabe von dem DNA-Standard Gene Ruler™ (DNA Ladder Mix, Fermen-

tas) ermöglichte die Größenbestimmung der Moleküle. Die UV-Visualisierung der DNA-Banden erfolgte durch Betrachtung in dem MultiImage-System von Alpha Innotech Corporation (Cell Biosciences, USA).

2.2.6 Restriktionsverdau zur Selektion und Kontrolle

Im Restriktionsverdau hydrolysieren Restriktionsendonukleasen Phosphodiester spezifischer DNA-Sequenzen.

Im Rahmen der Mutagenese-PCR wurde die Restriktionsendonuklease *DpnI* zum Verdau der Ausgangsvektoren eingesetzt. Die *E. coli*-Methytransferase *Dam* methyliert den Adenin-Rest der der Sequenz 5'-GATC-3' an neu synthetisierten Vektoren. Also wurden nur die *Template*-Vektoren der Mutagenese-PCR, die aus *E. coli*-Kulturen gewonnen wurden, methyliert und abgebaut.

Weiterhin kam das Verfahren bei der Kontrolle neu klonierter Vektoren zur Anwendung. Nach Isolation der Plasmide aus Bakterienkolonien wurde eine Spaltung mit der Restriktionsendonuklease HindIII bei 37°C durchgeführt. Für alle Anwendungen wurden 0,5-2 µg DNA mit 0,5 U Enzym und entsprechendem 1x Puffer für mindestens 2h bis über Nacht bei 37 °C verdaut. Anschließend wurden die Produkte mittels Agarosegelelektrophorese visualisiert.

2.2.7 Ligation

Die freien 3'- und 5'-Enden der in der Mutagenese-PCR gewonnenen Produkte wurden mit Hilfe von T4-Ligasen kovalent verbunden und so die Ringstruktur des Vektors hergestellt. Die aus T4-Phagen gewonnene Ligase katalysierte bei ATP-Verbrauch die Bindung des freien 3'-Hydroxyl- mit dem 5'-Phosphatende unter Bildung eines Phosphodiesters. 20 µl PCR-Produkt wurden mit 0,5 µl T4-Ligase (5U/µl) und 5 µl 5x Ligase Puffer versetzt. Um eine möglichst hohe Rate von intramolekulären Ligationen zur Plasmidbildung zu erreichen, wurde der Ligationansatz bei 14 °C über Nacht inkubiert.

2.2.8 Transformation

Als Transformation wird die Einführung des Expressionsvektors in Mikroorganismen bezeichnet, die die Fähigkeit besitzen neben dem eigenen Erbgut auch die Plasmid-DNA zu replizieren. Für die Transformation von Plasmiden in *Escherichia coli*-Bakterien (*E. coli*) wurden kompetente TOP10-Zellen (Invitrogen) verwendet.

90 µl Zellen wurden mit den Plasmidlösungen für 30 min auf Eis inkubiert, anschließend für 30 s auf 42°C erhitzt. Die weitere Inkubation erfolgte zunächst in 300 µl Antibiotika-freiem LB-Medium (1h, 300 rpm) und wurde im Fall der pcDNA3.1- und pCMV-myc-Derivate auf Ampicillin-LB-Agar (100 mg/l) und der pEGFP-N1-Konstrukte auf Kanamyin-LB-Agar (100

µl/mg) fortgesetzt. Die Agarplatten wurden 24 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 4°C gelagert.

2.2.9 Analytische und Präparative Extraktion von Plasmid-DNA aus Bakterien

Die Extraktion von Plasmid-DNA aus den E.coli-Kulturen wird als Plasmidpräparation bezeichnet. Je nach präpariertem Volumen wird in eine Mini bzw. analytische- und Midi bzw. präparative-Extraktion unterschieden. Für beide Anwendungen wurden die Kulturen zunächst bei 37 °C und 225 rpm 24 h lang in flüssigem LB Medium mit Ampicillin kultiviert, anschließend bei 4 °C für 30 min und 10.000 g pelletiert. Die analytische Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte mithilfe des Invisorb® Spin Plasmid Mini Kit Two (STRATEC Biochemical AG). Die präparative Extraktion der Plasmid-DNA erfolgte mithilfe des NucleoBond Xtra Midi EF (Macherey-Nagel, Deutschland) nach Herstellerangaben. Die aufgereinigten Plasmide wurden in HPLC-H₂O gelöst und bei -20 °C gelagert.

2.2.10 Isolierung zellulärer RNA

Die Isolation von RNA aus Zellen ermöglicht die Bewertung der aktuellen Transkriptionsaktivität. In dieser Arbeit spielte diese Analyse eine wichtige Rolle zur Evaluation der siRNA-Effizienz nach transienter Transfektion.

Aufgrund der hohen Sensibilität der RNA gegenüber aktiven RNAsen wurde im Verlauf der Extraktion stets mit RNase-freien Geräten und Substanzen gearbeitet.

Die Zellen wurden in 500 µl Isol-RNA Lysis Reagent (5 Prime) aufgenommen und nach Herstellerangaben 5 min bei 22 °C inkubiert. Hier kam es zur Zellyse bei gleichzeitiger Inaktivierung der RNase-Aktivität. Durch die Zugabe von 100 µl Chloroform kam es nach 2 min Inkubation bei Raumtemperatur und Zentrifugation (16.000 xg, 10 min) zur Phasentrennung. Die RNA-haltige wässrige Phase wurde vorsichtig abgenommen und anschließend in Isopropanol präzipitiert. Die gewonnene RNA wurde zweimal mit 75% EtOH und einmalig mit 100% EtOH gereinigt. Schließlich wurde die RNA in DEPC-H₂O aufgenommen und resuspendiert. Der Erfolg der RNA-Isolation wurde mittels Agarosegelelektrophorese visualisiert und dokumentiert. Die RNA wurde bis zur weiteren Analyse bei -80 °C gelagert.

2.2.11 cDNA-Synthese

Mittels des Enzyms Reverse-Transkriptase (RT) wurde aus RNA cDNA synthetisiert, die in PCR-Experimenten eingesetzt werden kann. Der Prozess wird als Reverse Transkription bezeichnet und durch das Enzym RT katalysiert. Ähnlich einer PCR, wurde hier RNA als Matrize genutzt. Die Bindung der RT verlangte einen Primer und die Elongation dNTPs. Zunächst wurden 1 µg RNA mit 0,4 µl *Random Hexamer*-Primern, bestehend aus 6 zufälligen Nukleotiden,

in einem Volumen von 12 μl mit DEPC- H_2O für 5 min bei 70 °C denaturiert und anschließend auf Eis gekühlt. Die RT-Reaktion wurde auf 20 μl mit 200 U M-MLV RT (Promega), 0,5 mM dNTP, 5 U RNase-Inhibitor, gelöst in 1x M-MLV Reaktionspuffer, aufgefüllt und anschließend 5 min bei 25 °C, 120 min bei 42 °C und 10 min bei 70 °C inkubiert. Die Produkte wurden bei -20 °C gelagert.

2.2.12 Verifizierung der COH1-Konstrukte

Die Verifizierung der Plasmidsequenz wurde durch die Martin Meixner GmbH mittels Sanger-Sequenzierung durchgeführt. Nach dem Prinzip der Kettenabbruchsynthese wurden durch bekannte Primer flankierte Abschnitte der Plasmide in einer PCR amplifiziert. Die Zugabe von fluoreszenzmarkierten Didesoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) zum Reaktionsansatz führt dabei zum zufälligen Abbruch der Kettensynthese. In einer folgenden Gelelektrophorese kann nach Fragmentlänge und unterschiedlicher Fluoreszenz zwischen Position und Base unterschieden werden (126).

2.2.13 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die DNA-Konzentrationsbestimmung erfolgte nach dem photometrischen Prinzip (Lambert-Beersches Gesetz). Das in dieser Arbeit verwendete Nanophotometer (Implen, Deutschland) wurde nach Herstellerangaben verwendet.

2.3 Zellbiologische Methoden

2.3.1 Zellkultur

In dieser Arbeit wurden für verschiedene zellbiologische und proteinbiochemische Methoden folgende Zellkulturen kultiviert: Hek293-Zellen (humane embryonale Nierenzellen, ATCC), HeLa (humane Zervixkarzinomzellen, ATCC) und NIH3T3 (spontan immortalisierte embryonale Mausfibroblasten, ATCC). HeLa- und NIH3T3-Zellen wurden in DMEM, 5% FCS, 1% Glutamin und Hek293-Zellen in Alpha-MEM, 5%FCS, 1% Glutamin. Die Kultivierung erfolgte grundsätzlich bei 37 °C, 5% CO_2 . Bei einer Konfluenz von 50-75% wurden die Zellen zur Transfektion verwendet.

2.3.2 Transiente Transfektion

2.3.2.1 DNA-Vektoren

Die Einbringung der DNA-Vektoren in die Zielzellen erfolgte nach Komplexierung der Vektoren mit dem kationischen Polymer jetPEI. JetPEI (Polyplus-transfection) ist ein Polyethyleniminderivat zur transienten *in vitro* Transfektion. Die Plasmidmenge pro Zellkultur-Schalen

(3,5 cm Ø) betrug 1,5 µg. Der Plasmid-jetPEI-Ansatz wurde 15 sec geschüttelt und anschließend bei Raumtemperatur 30 min inkubiert. Nach dem Wechseln des Zellkulturmediums wurde die Transfektionsmischung gleichmäßig tröpfchenweise (100 µl pro Schale) auf die Zellkultur gegeben und anschließend bei 37 °C, 5% CO₂ 24 h inkubiert.

2.3.2.2 RNA-Interferenz (RNAi)

Mithilfe der RNA-Interferenz wurden in dieser Arbeit *in vitro* die Expression gezielter Gene inhibiert. Dabei wurden spezifische siRNA (*small interfering RNA*), 19-23 bp lange RNA-Doppelstrangmoleküle, in HeLa-Zellen transfiziert, die intrazellulär *RNA-induced silencing complexes* (RISC) bilden und eine spezifische Ziel-mRNA binden und spalten. Somit kommt es zu einer reduzierten Translation der entsprechenden mRNA.

Als Transfektionsagens wurde in dieser Arbeit INTERFERin (Polyplus-Transfection) verwendet. Eine 50 µM siRNA-Lösung wurde in OptiMEM (ThermoFisher) zu einem Zielvolumen von 100 µl auf 2 µM verdünnt und anschließend mit 2 µl INTERFERin nach Herstellerangaben 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Kulturmedium der Zellen wurde bei einer Konfluenz von 50-65% entfernt und der Transfektionsmischung tröpfchenweise hinzugegeben und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde 1 ml Medium hinzugegeben. Der Transfektionsschritt wurde 12 h nach der ersten Transfektion wiederholt und 72 h nach der ersten Transfektion wurden die Zellen für RNA-Analysen in Trizol aufgenommen oder für Immunfärbungen fixiert.

2.4 Histologisch-morphologische Methoden

2.4.1 Immunofluoreszenz

Die Immunofluoreszenz (IF) diente der intrazellulären Proteinvisualisierung. Dabei bindet zunächst ein Primärantikörper ein spezifisches Epitop und ein fluoreszierender Sekundärantikörper das Fc-Fragment des Primärantikörpers. Bei Anregung mit entsprechender Wellenlänge wird ein vom Sekundärantikörper abhängiges Licht emittiert, das mikroskopisch detektiert werden kann.

Für die IF wurden Zellen auf Deckgläsern ausgesät. Nach Kultivierung und erfolgter Behandlung (z.B. Transfektion von Plasmid-DNA oder siRNA) wurden die Zellen zunächst auf den Deckgläsern mit 3% Paraformaldehyd (PFA) in 1x PBS für 10 min bei 4 °C fixiert. 3-maliges Spülen mit 1x PBS entfernte Reste des PFA. Die Permeabilisierung der Zellmembran für den Nachweis intrazellulärer Proteine erfolgte mithilfe von 0,5% Triton X-100 in 1% BSA/1x PBS über 10 min bei Raumtemperatur. Es folgte die erste Inkubation mit in 1% BSA/1x PBS ver-

dünntem Primärantikörper über Nacht bei 4 °C in feuchter und dunkler Umgebung. Die Konzentrationen der Antikörper sind in Tabelle 2.7 zusammengefasst. Nach 3-maligem Waschen mit 1x PBS (je 5 min), wurde der Sekundärantikörper, ebenfalls in 1% BSA/1x PBS verdünnt (s. Tabelle 2.7), über eine Stunde inkubiert. Im ersten der vier letzten Waschschritte mit 1x PBS wurde zusätzlich die DNA mithilfe von 4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI, Sigma, Deutschland) angefärbt.

Die Deckgläser wurden schließlich mit Fluoromount-G (SouthernBiotech, AL, USA) auf einem Objektträger befestigt. Die Objektträger wurden getrocknet und bis zur mikroskopischen Dokumentation und Auswertung bei 4°C gelagert.

2.4.2 Konfokalmikroskopie

Die Dokumentation der IF wurde an dem Konfokal-Laserscanmikroskop (LSM 5 EXCITER, Zeiss) mit Multilasersystem (Dioden-Laser, 405 nm; Ar- Laser, 488 nm; HeNe-Laser, 543 nm und HeNe-Laser, 633 nm) durchgeführt. Anschließend wurde die Auswertung der IF mithilfe von Plug-Ins im ImageJ Programm durchgeführt.

2.4.3 Golgi-Fragmentanalyse mit ImageJ

Die in der Konfokalmikroskopie gewonnenen Bilder wurden zur Bestimmung des Ausmaßes der Golgifragmentierung mit dem Bildanalyseprogramm ImageJ (NIH, USA) beurteilt. Zu diesem Zweck wurde für das Programm ein eigens programmiertes Makro verwendet (s. Anhang A3). Das Makro zählt die Anzahl und Fläche der fluoreszierenden Areale in einem definierten Bereich des Bildes.

2.5 Proteinbiochemische Methoden

2.5.1 Membranpräparation

Für die Membranpräparation wurden zunächst Hek293-Zellen auf Petrischalen mit 90 mm Innendurchmesser kultiviert. Bei einer Konfluenz von 75% wurde das Medium gewechselt und die Transfektion mit 6 µg Plasmid pro Platte mithilfe des Transfektionsagens jetPEI (Polyplus Transfection) nach Herstellerangaben durchgeführt. Nach 48-stündiger Inkubationszeit wurden die Zellen in 5 ml 1x PBS aufgenommen und 5 min bei 500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 1 ml HPLC-H₂O versetzt mit Proteinaseinhibitoren (1x *complete* ohne EDTA) aufgenommen. Anschließend wurden die Zellen durch einmaliges Einfrieren und Auftauen und anschließendes 5-maliges Ziehen durch eine 26-G Kanüle mittels Scherkräften aufgeschlossen. Es folgte eine 10 min Zentrifugation bei 5.000 rpm der Proben bei 4 °C zur Trennung der Zellkerne von den übrigen Zellbestandteilen. Der Überstand wurde

entnommen und nach exaktem Trieren in einer Ultrazentrifuge Optima MAX-XP (Beckmann Coulter, Krefeld) für 1h bei 100.000 xg zentrifugiert. Der Überstand wurde vollständig in ein neues Reaktionsgefäß überführt und das Pellet in 150 µl HPLC-H₂O mit Proteinaseinhibitoren resuspendiert. Der Überstand wurde schließlich mithilfe von Amicon Ultra 0,5 mL-Säulen (10 min, 13.000 rpm) auf 100 µl aufkonzentriert.

Die Proben wurden mit 50 µl Lämmli-Puffer versetzt und bei -80°C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.5.2 SDS-PAGE/Westernblot

Das SDS-PAGE/Westernblotting (SDS-PAGE/WB) diente der Trennung und Visualisierung von Proteinen einer Proteinsuspension nach Größe.

Zunächst erfolgte die Trennung des Proteingemisches nach dem SDS-PAGE (Sodium Dodecyl Sulfate-Poly-Acrylamide Gel Electrophoresis)-Verfahren. Durch das Versetzen der Proben mit Lämmli-Puffer wurden die Proteine durch die Komplexbildung mit SDS negativ geladen und durch die Zugabe von β -Mercaptoethanol reduziert. Die Inkubation der Proben für 10 min bei 95 °C unterstützte die weitere Denaturierung der Proteine in monomere und gestreckte Polypeptidketten. Die Auftrennung der negativ geladenen Proteinproben erfolgte dann in einem 3-8% Gradientengel in einem geeigneten Elektrophoresepuffer bei 120 V. Vergleichbar zu der Gelelektrophorese der DNA wurden dabei die Proteine nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt. SDS sorgte durch Bindung an Proteine für ein konstantes Ladungs-Masse-Verhältnis und verhinderte Proteinkomplexe durch Denaturierung. Ein geeigneter Proteinmarker (MW Marker, Bio-Rad; HiMark™ Pre-Stained Protein Standard, Life Technologies) diente als Maßstab für Molekulargewichtsbestimmung. Im folgenden Western Blotting wurden die Proteine bei 35 V gekühlt über Nacht im Transferpuffer aus dem Gel auf eine Trägermembran (Nitrocellulose) übertragen. Zur visuellen Kontrolle des Transfers in Form von unspezifischen Proteinbanden wurde eine Ponceau-Rot-Färbung durchgeführt. Sowohl Primär- als auch Sekundärantikörper wurden gemäß Tabelle 2.6 und 2.7 in Blockmilch verdünnt. Die Primärantikörperverdünnung wurde bei 4 °C unter ständiger Rotation über Nacht inkubiert. Anschließend wurde die Membran 3 mal 5 min mit Waschpuffer (0,1% Triton X-100 in 1x TBS) gewaschen. Nach Zugabe der Sekundärantikörperverdünnung wurde bei Raumtemperatur unter ständiger Rotation eine Stunde lang inkubiert. Nach der Inkubation des Sekundärantikörpers wurden mit einer weiteren 3 mal 5-minütigen Waschreihe mit dem Waschpuffer die nicht-gebundenen Sekundärantikörper von der Membran entfernt. Nach dem letzten Waschen wurde die Membran 15 min bei 4 °C mit ECL-Lösung (*electrochemiluminescence*, Western Blotting Luminol, Santa Cruz Biotechnology) nach Herstellerangaben behandelt. Aufgrund der Reaktion mit der HRP

(horseradish peroxidase, Meerrettichperoxidase) des sekundären Antikörpers kam es zur Chemilumineszenz an den Bindungsstellen, die zur Belichtung eines Röntgenfilmes (Agfa-Gevaert N.V., Belgien) führte. Die Entwicklung der Röntgenfilme erfolgte mithilfe des Filmentwicklers Curix 60 (Agfa-Gevaert N.V., Belgien) und die fertigen Filme wurden zur weiteren Auswertung und Dokumentation eingescannt.

2.6 Prädiktionsalgorithmen

Die in dieser Arbeit verwendeten Algorithmen dienen der Vorhersage möglicher funktioneller Auswirkungen auf ein Protein durch eine definierte Veränderung der Aminosäure- bzw. der cDNA-Sequenz.

2.6.1 Grantham-Substitutionsmatrix

R. Grantham publizierte 1974 eine Funktion zur Berechnung der physikalisch-chemischer Differenz zweier Aminosäure (127, 128). Der Berechnung der Differenz D liegen die molekulare Zusammensetzung der Seitenkette der Aminosäure, die Polarität und das Volumen zugrunde. Kommt es zum Austausch zweier Aminosäure, so sind ausgehend von dieser Differenz Folgen für die Struktur-Funktionsbeziehung des Proteins zu vermuten. D -Werte über 100 sprechen dabei grob für einen alterierenden Effekt, D -Werte unter 100 dagegen.

2.6.2 PROVEAN

Die Software PROVEAN (Protein Variation Effect Analyzer) kann Voraussagen über eine Funktionsveränderung eines Proteins nach einem Aminosäureaustausch berechnen (129). Herzstück der Methode ist die Berechnung des Delta-Scores (*delta alignment score*). Dabei werden zunächst homologe Sequenzen mittels BLAST (*Basic Local Alignment Search Tool*, P(130)) ermittelt und in *Clustern* gesammelt. Für jeden dieser *Cluster* wird mithilfe der Differenz der homologen Sequenzen je ein Delta-Score errechnet, der in Kombination der verschiedenen *Cluster*-Scores den PROVEAN-Score bildet. In Abhängigkeit von einem Grenzwert (z.B. -2,5) unterscheidet der PROVEAN-Score zwischen schädliche ($< -2,5$) oder neutrale ($> -2,5$) Effekte.

2.6.3 PolyPhen-2

PolyPhen-2 ist eine Software zur Prädiktion proteinfunktioneller Veränderungen durch nsSNPs (*nonsynonymous single nucleotide polymorphism*), also *missense*-Varianten. Neben 8 sequenzbasierten Methoden integriert PolyPhen-2 auch die Strukturdaten eines Proteins und vergleicht die Eigenschaften des Wildtyp-Allels mit dem möglicherweise pathogenen Allel.

Polyphen-2 unterscheidet abhängig von den zugrundeliegenden Datensätzen in einen *HumDiv* und einen *HumVar* Prädiktionwert. *HumDiv* basiert auf den in der UniProtKB-Datenbank eingetragenen bekannten pathogenen Allelen und homologen Proteinen. *HumVar* kombiniert alle pathogenen Mutationen aus der UniProtKB-Datenbank mit nicht-pathogenen nsSNPs. *HumVar* eignet sich nach Autorenangabe eher bei Erkrankungen, die den mendelschen Gesetzen folgen und eine deutliche Ausprägung haben. *HumDiv* hingegen ist für seltene Allele mit möglicherweise komplexem Phänotyp und genomweiter Assoziation (131).

2.6.4 MutationTaster

MutationTaster ist eine Software zur Bewertung eines krankheitsauslösenden Potentials einer DNA-Sequenzveränderung (132). Der Algorithmus integriert Informationen über die Sequenzkonservierung, mögliche Spleißstellenvarianten, Alteration von Proteineigenschaften und mRNA-Menge. In Abhängigkeit von der Art der Veränderung stehen drei Prädiktionmethoden zur Verfügung: *without_aae* bei stillen oder intronischen Mutationen, *simple_aae* bei einfachen Aminosäureveränderung (z.B. *missense*-Varianten) und *complex_aae* bei komplexen Veränderungen der Aminosäuresequenz (z.B. *frameshift*-Varianten).

2.6.5 SIFT

SIFT (*Sorting Intolerant From Tolerant*) klassifiziert Aminosäuresubstitutionen basierend auf Sequenzkonservierung mit Rücksicht auf den Konservierungsgrad und die chemischen Eigenschaften der Seitenkette. Liegen verwandte Proteine oder Proteinfamilien vor, werden diese zusätzlich in das *Alignment* eingeschlossen. Der Rückgabewert (*SIFT Score* 0-1,0) prognostiziert die Dignität einer Substitution ab einem Wert $< 0,05$ als pathogen (133).

2.6.6 MutPred2

MutPred2 ist eine sequenzbasierte Methode, die basierend auf dem SIFT-Algorithmus zusätzliche Vorhersagen zur Beteiligung möglicher Funktions- und Strukturdomänen macht (134, 135). Neben einem Hauptwert g (*general score*) werden je nach vermuteter Domäne Wahrscheinlichkeitswerte p spezifisch zu einer Eigenschaft ausgegeben. Als mögliche (*actionable*) Hypothesen gelten Kombinationen zwischen einem $g > 0,5$ und $p < 0,05$, sichere (*confident*) Hypothesen mit $g > 0,75$ und $p < 0,05$ und sehr sichere (*very confident*) Hypothesen mit $g > 0,75$ und $p < 0,01$.

2.6.7 SNPs&GO

Zur Diskriminierung zwischen benignen und pathogenen Varianten kombiniert SNPs&GO in der Analyse von SNV klassische Sequenzalignments und –profile, zusätzlich Informationen

aus der GO (*Gene Ontology*)-Datenbank. In dieser bioinformatischen Datenbank werden Gene/Produkte klassifiziert und topographiert (136). Rückgabewerte sind Voraussagen über die Dignität als „neutral“ (*Neural*) oder „pathogen“ (*Disease*), gefolgt von einem Wahrscheinlichkeitswert P (0-1), mit $P > 0,5$ als pathogen.

2.7 ACMG-Leitlinien zur Interpretation von Sequenzvariationen

Aufgrund der rapide ansteigenden Anzahl dokumentierter SNV in *GWAS*-Publikationen und aggregierenden Populationsdatenbanken (u.a. Exome Aggregation Consortium, Exome Variant Server: <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, 1000 Genomes Project: <http://www.1000genomes.org>) bedarf es einheitlicher Kriterien zur Interpretation dieser Sequenzvariationen. In einer aktuellen Publikation stellt das *American College of Medical Genetics* (ACMG) und die *Association for Molecular Pathology* einen komplexen Kriterienkatalog und Leitfaden zur Unterscheidung zwischen pathogenen und benignen SNV vor (72). Mit abnehmender Güte wird bei pathogenen SNV Kriterien nach *very strong*, *strong*, *moderate* und *supporting* unterschieden. Neutrale SNV werden mithilfe von Kriterien bewertet, die nach *stand-alone*, *strong* und *supporting* differenziert werden. Die für diese Arbeit relevanten Kriterien sind in Tabelle 4.1 zusammengefasst.

Kombinationen von Kriterien unterschiedlicher Güte in logischen Regeln ermöglichen in dem Leitfaden weiterhin die abschließende Beurteilung der SNV als „pathogen“, „wahrscheinlich pathogen“, „benigne“, „wahrscheinlich benigne“ sowie „unklare Signifikanz“. Die für diese Arbeit relevanten Regeln sind in Tabelle 4.2 zusammengefasst.

Tabelle 2.18 Auswahl der diese Arbeit betreffenden Regeln zur Bewertung von SNV. Übersetzt nach den *ACMG Standards and Guidelines 2015* (72). *für diese Arbeit nicht relevant.

	Güte	Bezeichnung	Beschreibung
pathogenic	Very strong	-*	bekanntes krankheitsverursachendes Gen, dass wiederholt klinisch und wissenschaftlich bestätigt wurde
	Strong	PS3	in vitro/vivo Studien mit Hinweisen auf Funktionsveränderung/-verlust
	Moderate	PM2	ohne Nachweis in Kontrollen oder sehr niedrige Frequenz in Populationsdatenbanken
	Supporting	PP1	Kosegregation mit multiplen betroffenen Familienmitgliedern
PP3		in silico-Verfahren (multiple) mit Hinweisen auf Pathogenität (Algorithmen)	
benigne	Stand-alone	-*	Allelfrequenz ist >5% im Exom-Sequenzierungsprojekt, 1000 Genom-Projekt oder Exom-Aggregations-Konsortium
	Strong	BS1	hohe Allelfrequenz
		BS3	in vitro/vivo Studien ohne Hinweise auf Funktionsveränderung/-verlust
	Supporting	BP1	nsSNV bei Erkrankung mit häufiger NMD/LoF-Pathogenese
BP4		in silico-Verfahren (multiple) ohne Hinweise auf Pathogenität (Algorithmen)	

Tabelle 2.19 Auswahl der diese Arbeit betreffenden Regeln zur Bewertung von SNV. Übersetzung angelehnt an die *ACMG Standards and Guidelines 2015 (72)*.

Kriterienkombination	
pathogen	_*
wahrscheinlich pathogen	1 PS und 1 PM
benigne	≥ 2 BS
wahrscheinlich benigne	1 BS und 1 BP
unklare Signifikanz	widersprüchliche Kriterien

*existent, für diese Arbeit nicht relevant

2.8 Richtlinien

Bei allen Arbeiten zu dem Promotionsvorhaben wurde darauf geachtet, dass die Grundsätze der Charité – Universitätsmedizin Berlin zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis eingehalten wurden.

3 Ergebnisse

3.1 Missense-Varianten in COH1

Seit der Erstbeschreibung 2003 wurden für *COH1* mehr als 1000 SNV, die zu einem Aminosäureaustausch führen, beschrieben. Der Großteil der Alterationen wurde im Rahmen von Genomsequenzierungen dokumentiert, ohne dass ein klinisches Korrelat im Sinne eines Cohen-Syndroms vorlag. Die *Genome Aggregation Database* (gnomAD) listet aktuell (Stand: 07/2018) 1226 seltene (Allelfrequenz AF < 0,001) nsSNV für *COH1* auf. In der Literatur wurden bislang 9 *COH1-missense*-Varianten in Assoziation mit dem Cohen-Syndrom publiziert. Darüber hinaus sind 4 weitere *COH1-missense*-Varianten bei Patienten mit Autismus, aber ohne bekanntem Cohen-Syndrom beschrieben worden (Tab. 3.1).

In dieser Arbeit wurden diese 13 *missense*-Varianten hinsichtlich ihres pathogenen Potentials näher untersucht. Beispielhaft wurden zur Negativkontrolle 3 bekannte, nicht mit Cohen-Syndrom-assoziierte SNV (C1-C3) untersucht. Nach aktuellen ClinVar-Daten sind diese als benigne bewertet und weisen eine für Polymorphismen typisch hohe Allelfrequenz auf (Tab. 3.5).

Tabelle 3.1 Übersicht bekannter *missense*-Varianten in *COH1* mit Assoziation zu genetischen Erkrankungen. Unter der Trennlinie bekannte *missense*-Varianten in *COH1*, die in keiner Assoziation mit genetisch-verursachten Erkrankungen stehen (C1-3). * liegt *compound*-heterozygot vor.

Exon	cDNA-Variante	Protein-Variante	Assoziierte Erkrankungen	Erstbeschreibung
13	c.1768G>A	p.Ala590Thr	Cohen-Syndrom	Katzaki et al. 2007
17	c.2470T>G	p.Ser824Ala	Autismus	Yu et al. 2013
27	c.3866C>G	p.Thr1289Ser	Cohen-Syndrom	Rivera-Brugués et al. 2011
31	c.4832T>A	p.Ile1611Asn	Cohen-Syndrom	El Chehadeh et al. 2010
37	c.6503T>G	p.Leu2168Arg	Cohen-Syndrom	Kolehmainen et al. 2003
39	c.6947A>G	p.Tyr2316Cys	Cohen-Syndrom	Hennies et al. 2004
43	c.7859G>A	p.Gly2620Asp	Cohen-Syndrom	Mochida et al. 2004
45	c.8110G>A	p.Gly2704Arg	Autismus	Yu et al. 2013
45	c.8243C>T	p.Ser2748Leu	Cohen-Syndrom	Seifert et al.2006
46	c.8384T>C	p.Ile2795Thr	Cohen-Syndrom	Falk et al.2004
49	c.8903A>G	p.Asn2968Ser	Cohen-Syndrom	Kolehmainen et al. 2004
54	c.9907A>C	p.Ser3303Arg*	Autismus/Cohen-Syndrome	Yu et al. 2013
58	c.11071G>A	p.Ala3691Thr*	Autismus/Cohen-Syndrome	Yu et al. 2013
16(C1)	c.2275G>C	p.Val759Leu	keine Manifestation bekannt	GnomAD-Browser
34(C2)	c.5501C>T	p.Ser1834Leu	keine Manifestation bekannt	GnomAD-Browser
56(C3)	c.10219G>C	p.Gly3407Arg	keine Manifestation bekannt	GnomAD-Browser

3.2 Zusammenfassung der beschriebenen Phänotypen von Patienten mit *missense*-Varianten in *COH1*

Der folgende Abschnitt soll einen Überblick über den Phänotyp der Cohen-Syndrom Patienten mit *COH1-missense*-Varianten geben. Zusätzlich wurden die Sequenzierungsmethoden, die in

den jeweiligen Studien zur Detektion und Verifikation der SNV angewendet wurden, in Tabelle 3.2 zusammengefasst.

3.2.1 Ala590Thr

Die nsSNV c.1786G>A (Exon 13, p.Ala590Thr) wurde heterozygot bei einer 24-jährigen italienischen Patientin mit nicht-konsanguinen Eltern gefunden (6). Auf dem maternalen Allel wurde in der vorliegenden Studie keine weitere pathogene Veränderung beschrieben. Die klinische Ausprägung des Cohen-Syndroms zeigte sich nur mäßig. Die frühkindliche Entwicklung war leicht verzögert. Es lag eine moderate mentale Retardierung bei gutem Sozialverhalten vor. Die faziale Dysmorphie war laut Autoren mild ausgeprägt (Abbildung 3.1 A). Weder zur Geburt noch später wurde eine Mikrozephalie dokumentiert. Die Patientin war nicht myop und wies zum Zeitpunkt der Erfassung keine Zeichen einer Retinopathie auf; der okuläre Phänotyp war nicht ausgeprägt. Die Hände und Füße bzw. Finger und Zehen waren schmal und lang mit orthopädischen Veränderungen der Füße (Pes cavum, Hallux valgus), jedoch ohne laxe Gelenke. Es lag keine Laryngomalazie vor. Es bestand eine Neutropenie und stammbetontes Übergewicht. Phänotypisch ähnelte diese Patientin dem 1990 beschriebenen jüdischen Phänotypus (22) mit zusätzlicher Neutropenie.

Der Vater der Patientin war ebenfalls Träger der *missense*-Variant in Exon 13 von *COH1*. Die Autoren vermuteten nach Analysen mit dem *Predict Protein* Server eine Fehlfaltung aufgrund betroffener Disulfidbrücken (6).

3.2.2 Ser824Ala

Der männliche Patient mit der homozygot vorliegenden nsSNV c.2470T>A (Exon 17, p.Ser824Ala) zeigte einen unvollständigen Cohen-Syndrom-Phänotypus (7). Die Identifizierung der *missense*-Variante p.Ser824Ala in *COH1* erfolgte im Rahmen eines Genom-Screenings bei Patienten mit Autismus. Beobachtet wurde ein unvollständiger Dysmorphismus des Gesichtes und Hypermobilität der Gelenke. Nach der Hypothese der Autoren könnte es sich um eine hypomorphe Variante von *COH1* handeln: eine reduzierte Proteinaktivität könnte in erster Linie mit der Dysfunktion neuronaler Strukturen einhergehen, die primär die Ausprägung des Autismus und nur weniger weiterer somatischer Merkmale bedingen.

3.2.3 Thr1289Ser

Die Patientin ist die zweite Tochter eines nicht-konsanguinen kaukasisch-afrikanischen Paares. Sie trägt die nsSNV c.3866C>G (Exon 25, p.Thr1289Ser) zusätzlich zu einer 3-bp Insertion c.11752_11753insATG (Exon 62, p.Asp3917_Gly3918insAsp) auf dem paternalen Allel. Im

maternalen Allel wurde eine 315 kb-Deletion (chr8:100015029...100347846; c.1-2515del) gefunden, die sich von Exon 4 des benachbarten *OSR2*-Gens bis zu Exon 17 von *COH1* erstreckte. Beide Eltern und ein älteres Geschwisterkind zeigten keine Auffälligkeiten. Die Betroffene wurde in der 35. Woche geboren und wog 2450 g. Zudem wurde postnatal ein Vorhofscheidewanddefekt II° des Herzens und eine Pulmonarstenose bei Arrhythmie diagnostiziert. Bis zum zweiten Lebensjahr war die allgemeine Entwicklung verzögert. Mit 2,8 Jahren erreichte die Patientin normale Körpermaße. Sie hatte eine breite Nasenwurzel, abfallende Lidachsen, ein verkürztes Philtrum und eine dünne Oberlippe (Abb. 3.1 B). Ophthalmologisch und hämatologisch war sie zum Zeitpunkt der Untersuchung (2,8 Jahre) unauffällig (8).

3.2.4 Ile1611Asn

Die nsSNV c.4832T>A (Exon 31, p.Ile1611Asn) wurde bei einem marrokanischen Zwillingsspärchen konsanguiner Eltern beschrieben (9) und liegt homozygot vor. Die Kinder zeigten eine mentale Retardierung, die Cohen-Syndrom-typischen Veränderungen des Gesichts, der Hände und Füße. Zusätzlich wurde bereits früh eine Chorioretinitis mit einem Elektroretinogramm diagnostiziert. Es wurden keine Angaben zum Sozialverhalten gemacht.

3.2.5 Leu2168Arg

Die nsSNV c.6503T>G (Exon 37, p.Leu2168Arg) trug ein finnischer Patient bei klassisch-finnischem Phänotyp mit ausgeprägter okulärer Beteiligung, klassischer fazialer Dysmorphie, schmalen Händen und Füßen, laxen Gelenken sowie einer Neutropenie (25). Autismus schien aufgrund einer fröhlichen Natur und guter sozialer Interaktion eher unwahrscheinlich. Die *missense*-Variante lag *compound*-heterozygot mit einer 2-bp Deletion c.3348_3349delCT vor, die durch einen *frameshift* zu einem PTC führt (2). Diese *missense*-Variante war, laut Autoren, in 304 Kontrollen nicht zu finden, so dass sich einen seltenen Polymorphismus oder eine pathogene Mutation vermuten lässt (2).

3.2.6 Tyr2316Cys

Die nsSNV c.6947A>G (Exon 39, p.Tyr2316Cys) wurde 2004 bei einem 4-jährigen Mädchen gefunden und lag *compound*-heterozygot mit einer *nonsense*-Variante c.11240C->T (Exon 59, p.Gln3747X) vor (10). Phänotypisch wurden eine Entwicklungsverzögerung, Myopie, die typischen Gesichtsmerkmale und eine Hypermobilität der Gelenke beobachtet (Abb. 3.1 C). Zur Geburt war die Patientin normozephal und entwickelte erst in den ersten Lebensjahren eine, für das Cohen-Syndrom typische postnatale Mikrozephalie. Zum Zeitpunkt der humangenetischen Untersuchung wies die Patientin keine Neutropenie oder Retinopathie auf. Da die Retinopathie auch im finnischen Phänotypus ein zeitlich progredientes Symptom ist, schließen die Autoren

nicht aus, dass es aufgrund des jungen Alters der Patientin im Verlauf zur Ausprägung kommen kann (25). Angaben zur sozialen Interaktion bzw. einer möglichen autistischen Ausprägung wurden nicht gemacht.

3.2.7 Gly2620Asp

Die nsSNV c.7859G>A (Exon 43, p.Gly2620Asp) wurde homozygot bei zwei Brüdern (5 und 8 Jahre) und einem Mädchen (10 Jahre) konsanguiner Eltern aus dem Oman dokumentiert (11). Weitere Geschwister gibt es nicht. Alle drei Geschwister teilen die für das Cohen-Syndrom typischen Gesichtsmerkmale, eine Myopie und eine Mikrozephalie. Das 10-jährige Mädchen hatte bereits ophthalmologische Zeichen einer RP entwickelt und zeigte im MRT ein vergrößertes Corpus callosum. Auch hier halten die Autoren eine Ausbildung der Retinopathie bei den bis dato nicht-Betroffenen für möglich. Eine Neutropenie lag zum Zeitpunkt der Untersuchung bei keinem der Patienten vor. Nicht erfasst wurde der zeitliche Entwicklungsverlauf und ein psychisch/kognitiver Befund.

3.2.8 Gly2704Arg

Der männliche Patient aus dem Autismus-Screenings (7) mit der nsSNV c.8110G>A (Exon 45, p.Gly2704Arg), war zum Zeitpunkt der Sequenzierung nicht mit Cohen-Syndrom diagnostiziert. Eine klinisch-morphologische Evaluation zeigte jedoch Cohen-typische Veränderungen des Haaransatzes, ein verkürztes Philtrum, prominente Schneidezähne und schmale Hände und Füße. Die *missense*-Variante p.Gly2704Arg lag *compound*-heterozygot mit einer *nonsense* Variante c.2889G>A (Exon 20, p.Trp963X) des anderen Allels vor, die bereits bei finnischen Patientin beschrieben wurde (14).

3.2.9 Ser2748Leu

Die nsSNV c.8243C>T (Exon 45, p.Ser2748Leu) wurde in zwei türkischen Familien gefunden. Teile beider Familien waren konsanguin. In der ersten Familie sind beide Töchter (5 und 8 Jahre) betroffen (12). Beide wiesen die typischen Gesichtsmerkmale, eine Myopie und schmale Hände und Füße auf (Abb. 2.1 D). Die letzte Funduskopie wurde im 4. Lebensjahr durchgeführt, so dass eine später manifestierte RP nicht auszuschließen ist. Die 5-Jährige zeigte zusätzlich eine Mikrozephalie, keine Sprachentwicklung und eine unilaterale Ptosis; die 8-Jährige keine Mikrozephalie, jedoch einen Minderwuchs und stammbetonte Adipositas.

Der 2,5 Jahre alte männliche Patient der zweiten Familie wurde mit Gesichtsdysmorphie, Mikrozephalie, eine sprachlichen Entwicklungsstörung und schmalen Händen und Füßen beschrieben. In allen drei Fällen wurden keine Angaben zur sozialen Interaktion oder Autismus gemacht.

3.2.10 Ile2795Thr

Die nsSNV c.8385C>T (Exon 46, p.Ile2795Thr) wurde bei acht Mitgliedern aus zwei großen Familien der *Amish*-Glaubensgemeinschaft im US-amerikanischen Ohio dokumentiert (13). Zusätzlich lag eine Insertion c.9183_9184insT (Exon 50, p.Lys3086AsnfsX20) vor, die zu einer Leserasterverschiebung mit PTC führt. Die zwei männlichen und 6 weiblichen Betroffenen waren im Alter von 4-16 Jahren und klinisch nicht mit dem Cohen-Syndrom diagnostiziert. Zu gemeinsamen Merkmalen gehören eine frühe RP und Myopie, eine Entwicklungsverzögerung, mentale Retardierung, Mikrozephalie, eine Überstreckbarkeit der Gelenke und neben schmalen Händen und Füßen auch die typische Gesichtsdysmorphie. Bei 6 der 8 Patienten wurde ein fröhlicher Habitus beschrieben. 4 der 8 Patienten zeigten stereotype Bewegungsmuster, einem diagnostischem Kriterium bei Autismus (137). Ein spezifisches Autismus-Assessment lag nicht vor. Blutuntersuchungen konnten aus ethischen Gründen nur bei einem der Betroffenen durchgeführt werden. In der Blutzytologie zeigte sich eine Neutropenie.

3.2.11 Asn2968Ser

Die nsSNV c.8903A>G (Exon 49, p.Asn2968Ser) lag homozygot vor und wurde bei einem belgischen Zwillingsspaar sequenziert (14). Zu den beobachteten Merkmalen zählen eine Entwicklungsverzögerung, Mikrozephalie, Gesichtsveränderungen, stammbetontes Übergewicht, Hypermobilität der Gelenke, eine RP, Myopie und eine Neutropenie. Des Weiteren wurde für beide Betroffene eine Autismus-untypische lebhaft soziale Interaktionsbereitschaft dokumentiert.

3.2.12 Ser3303Arg und Ala3691Thr

Beide nsSNV c.9907A>C (Exon 54, p.Ser3303Arg) und c.11071G>A (Exon 58, p.Ala3691Thr) wurden *compound* heterozygot bei einem männlichen Patienten mit Autismus sequenziert. Dysmorphien des Gesichtes und der Extremitäten ähneln den Cohen-Syndrom-typischen Veränderungen. Zusätzlich beschrieben die Autoren einen auffälligen Haaransatz und einem normozephalen Kopfumfang(7).

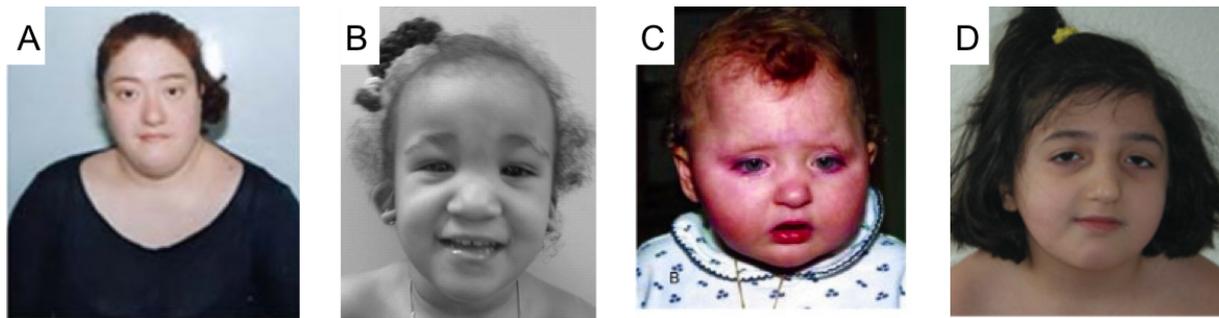


Abbildung 3.1 Aus Literatur verfügbare faziale Phänotypen von Patienten mit COH1-SNV. (A) 24-jährige Patientin mit c.1786G>A-SNV, Bild aus (6). (B) 4-jährige Patientin mit c.3866C>G-SNV, Bild aus (8). (C) 2-jährige Patientin mit c.6947A>G-SNV, Bild aus (10). (D) 5-jährige Patientin mit c.8243C>T-SNV, Bild aus (12).

Tabelle 3.2 Übersicht der in den Studien verwendeten DNA-Sequenzierungsmethoden.

SNV	Sequenzierungsmethode	Quelle
c.1768G>A	DHPLC + Sanger-Sequenzierung (BigDye Terminator, AB)	Katzaki et al. 2007
c.2470T>G	Paired-end NGS (HiSeq, Illumina) + Sanger-Sequenzierung	Yu et al. 2013
c.3866C>G	Whole genome array (Infinium Human550, Illumina) + Sanger-Sequenzierung (BigDye Terminator, AB)	Rivera-Brugués et al. 2011
c.4832T>A	Sanger-Sequenzierung (BigDye Terminator, AB)	El Chehadeh et al. 2010
c.6503T>G	Sanger-Sequenzierung (BigDye Terminator, AB) + SSCP	Kolehmainen et al. 2003
c.6947A>G	Sanger-Sequenzierung (BigDye Terminator, AB)	Hennies et al. 2004
c.7859G>A	Sanger-Sequenzierung (BigDye Terminator, AB)	Mochida et al. 2004
c.8110G>A	Paired-end NGS (Illumina HiSeq) + Sanger-Sequenzierung	Yu et al. 2013
c.8243C>T	Sanger-Sequenzierung (BigDye Terminator, AB)	Seifert et al. 2006
c.8384T>C	Sanger-Sequenzierung (BigDye Terminator, AB) + SSCP	Falk et al. 2004
c.8903A>G	Sanger-Sequenzierung (BigDye Terminator, AB) + SSCP	Kolehmainen et al. 2004
c.9907A>C	Paired-end NGS (Illumina HiSeq) + Sanger-Sequenzierung	Yu et al. 2013
c.11071G>A	Paired-end NGS (Illumina HiSeq) + Sanger-Sequenzierung	Yu et al. 2013

DHPLC: denaturing high-performance liquid chromatography; SSCP: single stranded conformation polymorphism; NGS: next generation sequencing

3.3 Phänotypischer Vergleich der Patienten mit COH1-SNV

Um einen Vergleich der *missense*-Variante hinsichtlich des assoziierten Phänotyps zu ermöglichen, wurden die diagnostischen Kriterien nach Kolehmainen et al. (14) modifiziert (Tab. 3.3). Kolehmainen et al. beschreiben streng den finnischen Phänotyp, die Ergänzungen um „Sonstige“ erfolgte mit Hinblick auf häufige Ausprägungen der übrigen Kohorten (Tab. 3.4).

Tabelle 3.3 Diagnostische Kriterien des Cohen-Syndrom Phänotypus. Modifiziert nach Kolehmainen et al. 2004.

Diagnostisches Kriterium	Phänotypische Einzelkriterien
I. Faziale Dysmorphie	kurzes Philtrum
	Lidmorphologie
	tiefer Haaransatz
II. Okuläre Beteiligung	Retinitis pigmentosa
	Myopie

III. Bewegungsapparat	schmale Hände/Füße
	laxe Gelenke
IV. Motorische und neurologische Besonderheiten	Hypotonie
	Mikrozephalie
V. Mentale Retardierung	
VI: Autismus	
VII. Neutropenie	
VIII. Sonstige	¹ Adipositas
	² Minderwuchs
	³ Laryngomalazie
	⁴ relativ vergrößertes Corpus Callosum

Tabelle 3.4 Übersicht und Vergleich der Phänotypen anhand der in Tabelle 3.3 aufgeführten Kriterien. Die Ausprägung aus Addition der vollständig ausgeprägten (+1) bzw. teilweise ausgeprägten Merkmale (+0,5) als relativer prozentualer Wert bei z.T. unvollständigen Literaturangaben.

SNV	Ala590Thr	Ser824Ala	Thr1289Ser	Ile1611Asn	Leu2168Arg	Tyr2316Cys	Gly2620Asp	Gly2704Arg	Ser2748Leu	Ile2795Thr	Asn2968Ser	Ser3303Arg	Ala3691Thr
Diagnostisches Kriterium													
Geschlecht	F	M	F	n.a.	M	F	F,F,M	n.a.	F	F,M	n.a.	M	
Alter (Jahren) bei Erfassung/Diagnostik	24	n.a.	2	n.a.	n.a.	2	10,8,5	n.a.	8	4,15	n.a.	n.a.	
I. Faziale Dymorphie	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	
II. Okuläre Beteiligung	∅	n.a.	∅	+	+	(+)	+	n.a.	(+)	+	+	n.a.	
III. Bewegungsapparat	+	+	∅	+	+	+	∅	+	+	+	+	+	
IV. Motorische und neurologische Besonderheiten	+	∅	n.a.	+	+	+	+	+	(+)	+	+	+	
V. Mentale Retardierung	(+)	+	n.a.	+	+	(+)	n.a.	n.a.	+	+	+	n.a.	
VI: Autismus	∅	+	∅	∅	∅	∅	n.a.	+	n.a.	∅()	∅	+	
VII. Neutropenie	+	n.a.	∅	+	∅	∅	∅	n.a.	n.a.	(+)	+	n.a.	
VIII. Sonstige	∅	∅	∅	∅	+ ^{1,2}	+ ^{1,2}	+ ⁴	∅	+ ^{1,2}	∅	+ ¹	∅	
Ausprägung	4/8 50%	3/6 50%	1/6 17%	6/8 75%	6/8 75%	5/8 63%	4/6 67%	4/5 80%	4/8 50%	5/8 63%	7/8 88%	4/5 80%	

+: ausgeprägt, (+) teilweise ausgeprägt, ∅: nicht ausgeprägt, n.a.: keine Angabe; Summe: 0-33% (geringe Ausprägung), 34-66% (mittlere Ausprägung), 67-100% (deutliche Ausprägung). Hochgestellte Zahlen in Bezug auf Tab. 3.3 – Sonstige)

3.4 *In silico* Analyse zur Bewertung des Krankheitspotentials der COH1- *missense*-Varianten

3.4.1 Häufigkeit der COH1 *missense*-Varianten in der GnomAD-Datenbank

Die GnomAD aggregiert *Whole-Genome-Sequencing* (WGS)-Daten aus unterschiedlichen Studien und stellt mit aktuell rund 123136 Exom- und 15496 *whole-genome*-Datensätzen (Stand:

07/2018) die größte Genom-Datenbank ihrer Art dar. Die Datenbank erlaubt eine Unterscheidung der Allelfrequenz nach ethnischer Herkunft und Population. Tabelle 3.5 gibt eine Übersicht über die Häufigkeit der COH1-SNV in den in der Datenbank erfassten Allele. Weiterhin wurden in Tabelle 22 zusätzliche Polymorphismen an den Loci für die COH1-*missense*-Varianten zusammengefasst.

Tabelle 3.5 Zusammenstellung der *GnomAD*-Daten zur Allelverteilung der COH1-SNV. Stand: 07/2018.

Proteinveränderung (ENST00000357162)	Allel-Anzahl mit SNV	Allel-Anzahl gesamt	Anzahl der Homozygoten	Allel-Frequenz	Population	Allel-Anzahl mit SNV	Allel-Anzahl gesamt	Anzahl der Homozygoten	Allel-Frequenz
p.Ala590Thr	122	121404	0	0.001005	Europa (exkl. Finnland)	102	66738	0	0.001528
					Ostasien	0	8654	0	0
					Andere	1	908	0	0.001101
					Afrika	2	10406	0	0.0001922
					Lateinamerika	9	11574	0	0.0007776
					Südasien	8	16510	0	0.0004846
Finland	0	6614	0	0					
p.Ser824Ala	24	121350	1	0.0001978	Europa (exkl. Finnland)	23	66710	1	0.0003448
					Ostasien	0	8654	0	0
					Andere	0	908	0	0
					Afrika	1	10392	0	9,62E-02
					Lateinamerika	0	11566	0	0
					Südasien	0	16506	0	0
Finland	0	6614	0	0					
p.Thr1289Ser	61	119986	0	0.0005084	Europa (exkl. Finnland)	1	65962	0	1,52E-02
					Ostasien	0	8514	0	0
					Andere	1	896	0	0.001116
					Afrika	57	10328	0	0.005519
					Lateinamerika	1	11316	0	8,84E-02
					Südasien	1	16408	0	6,10E-02
Finland	0	6562	0	0					
p.Ile1611Asn	-	-	-	-		-	-	-	-
p.Leu2168Arg	-	-	-	-		-	-	-	-
p.Tyr2316Cys	1	121268	0	8,25E-03	Europa (exkl. Finnland)	1	66664	0	1.5e-05
					Ostasien	0	8626	0	0
					Andere	0	906	0	0
					Afrika	0	10396	0	0
					Lateinamerika	0	11560	0	0
					Südasien	0	16510	0	0
Finland	0	6606	0	0					
p.Gly2620Asp	-	-	-	-		-	-	-	-
p.Gly2704Arg	1	120730	0	8,28E-03	Europa (exkl. Finnland)	1	66572	0	0,01502
					Ostasien	0	8580	0	0
					Andere	0	902	0	0
					Afrika	0	10032	0	0
					Lateinamerika	0	11544	0	0
					Südasien	0	16498	0	0
Finland	0	6602	0	0					
p.Ser2748Leu	-	-	-	-		-	-	-	-
p.Ile2795Thr	-	-	-	-		-	-	-	-
p.Asn2968Ser	394	121316	0	0.003248	Europa (exkl. Finnland)	328	66716	0	0.004916
					Ostasien	0	8636	0	0
					Andere	2	908	0	0.002203
					Afrika	11	10396	0	0.001058
					Lateinamerika	37	11540	0	0.003206
					Südasien	11	16510	0	0.0006663
Finland	5	6610	0	0.0007564					
p.Ser3303Arg	-	-	-	-		-	-	-	-
p.Ala3691Thr	195	47584	1	0.004098	Europa (exkl. Finnland)	171	25360	1	0.006743
					Ostasien	0	3628	0	0
					Andere	2	342	0	0.005848
					Afrika	7	5040	0	0.001389
					Lateinamerika	6	2502	0	0.002398
					Südasien	8	9506	0	0.0008416
Finland	1	1206	0	0.0008292					

p.Val759Leu (C1)	195	121210	59	0.008085	Europa (exkl. Finnland)	6	66666	0	9e-05
					Ostasien	2	8648	0	0.0002313
					Andere	3	906	0	0.003311
					Afrika	8	10398	0	0.0007694
					Lateinamerika	960	11500	59	0.08348
					Südasiens	1	16494	0	6.063e-05
					Finnland	0	6598	0	0
p.Ser1834Leu (C2)	856	121066	37	0.007071	Lateinamerika	823	11484	37	0.07166
					Andere	2	908	0	0.002203
					Ostasien	8	8612	0	0.0009289
					Afrika	7	10360	0	0.0006757
					Südasiens	6	16502	0	0.0003636
					Europa (exkl. Finnland)	10	66590	0	0.0001502
					Finnland	0	6610	0	0
p.Gly3407Arg (C3)	14935	121392	988	0.123	Lateinamerika	1666	11576	140	0.1439
					Andere	128	908	10	0.141
					Ostasien	8705	66726	570	0.1305
					Afrika	1012	8654	62	0.1169
					Südasiens	1171	10404	60	0.1126
					Europa (exkl. Finnland)	1614	16512	109	0.09775
					Finnland	639	6612	37	0.09664

Tabelle 3.6 Zusammenstellung der *GnomAD*-Daten zu zusätzlichen Sequenzvariationen an den in dieser Studie analysierten COH1-SNV-Loci. Stand: 07/2018.

Aminosäureposition	Varianten	Allel-Frequenz
590	p.Ala590Val (c.1769C>T)	10 ⁻⁵
824	p.Ser824Phe (c.2470C>T)	10 ⁻⁴
1289	p.Thr1289Ala (c.3865A>G)	10 ⁻⁴
1611	-	-
2186	-	-
2316	p.Tyr2316Tyr (c.6948T>C)	10 ⁻⁶
2620	-	-
2704	-	-
2748	p.Ser2748Ser (c.8244G>A)	10 ⁻⁴
2795	-	-
2968	-	-
3303	-	-
3691	-	-
759 (C1)	-	-
1834 (C2)	p.Ser1834Ala (c.5500T>G)	10 ⁻⁶
3407 (C3)	p.Gly2307Arg (c.10219G>A)	10 ⁻⁶

3.4.2 Beurteilung der *missense*-Varianten in COH1 anhand von Prädiktionsalgorithmen

Die Charakterisierung der COH1-*missense*-Varianten erfolgte mit Hilfe von etablierten Prädiktionsalgorithmen (138). Die drei Negativkontrollen (p.Val759Leu, p.Ser1834Leu, p.Gly3407Arg) wurden von allen Algorithmen, bis auf den Grantham-Score, als Polymorphismen identifiziert. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3.7 zusammengefasst.

3.1.1.1 Grantham-Matrix

Die Grantham-Matrix bietet eine grobe Einschätzung möglicher funktionsalterierender Effekte eines Basenaustausches basierend auf den Seitenketteneigenschaften (Polarität, Volumen) der

veränderten Aminosäure. Es gilt: je höher der Wert desto größer die physiko-chemische Differenz und damit eine mögliche Funktionsveränderung. Für die *missense*-Veränderungen zeigt sich, dass 7 der 13 *missense*-Varianten Werte <100 haben, wobei die Aminosäureveränderung Asn2968Ser mit 46 die geringste physiko-chemische Differenz nach Grantham aufweist. Dagegen unterscheiden sich zwei der *missense*-Varianten (p.Ile1611Asn und p.Tyr2316Cys) mit Werten >150 äußerst stark von ihrer Ursprungsamino-säure.

3.1.1.2 PROVEAN

Der PROVEAN-Delta-Prädiktionwert basiert auf einer komplexen Analyse homologer Sequenzabschnitte. Mit einem Grenzwert von -2,5 wurde zwischen neutraler (*neutral*) und schädigender (*deleterious*) Veränderung unterschieden. Die vier *missense*-Varianten p.Ser824Ala (Score: -0,520), p.Ala590Thr (Score: -0,692), p.Thr1289Ser (Score: -0,827) und p.Ile2795Thr (Score: -1,678) wurden mit absteigendem Prädiktionwert als neutral klassifiziert. Die übrigen Substitutionen liegen mit Werten > 3,1 jenseits des Grenzwertes und gelten als schädigend.

3.1.1.3 SIFT

Der SIFT-Score differenziert in neutrale, grenzwertige (*borderline*) und schädigende SNV. In Konkordanz mit dem PROVEAN-Algorithmus klassifiziert SIFT ebenfalls alle Substitutionen, bis auf p.Ser824Ala, p.Ala590Thr, p.Thr1289Ser und p.Ile2795Thr als schädigend. p.Ala590Thr (Score: 0,195) und p.Ile2795Thr (Score: 0,120) werden als grenzwertig beschrieben, p.Ser824Ala (Score: 0,303) und p.Thr1289Ser (Score: 0,416) als neutral.

3.1.1.4 PolyPhen-2

Nach dem PolyPhen-2-Algorithmus wurde mit p.Ser824Ala nur eine Substitution als neutral bewertet. Drei weitere (p.Ala590Thr, p.Leu2168Arg, p.Ile2795Thr) gelten als möglicherweise schädigend.

3.1.1.5 MutPred2

Der MutPred2-Algorithmus prognostiziert für die Substitutionen p.Ala590Thr, p.Ser824Ala, p.Ile2795Thr und p.Asn2968Ser keinen pathogenen Effekt auf die Proteinfunktion. Alle weiteren Substitutionen liegen oberhalb des Grenzwertes von 0,5.

3.1.1.6 SNPs&GO

Die Prädiktion von SNPs&GO unterscheidet sich stark nach den verwendeten Algorithmen. Nach SNPs&GO - PhD-SNP sind p.Ala590Thr, p.Ser824Ala, p.Thr1289Ser und p.Ala3691Thr neutral. Nach SNPs&GO - SNPs&GO wurden nur zwei Substitutionen (p.Tyr2316Cys und p.Gly2704Arg) als pathogen eingestuft. Alle anderen gelten als neutral.

3.1.1.7 Mutationtaster

Der Rückgabewert nach dem Mutationtaster ist binär (Polymorphismus/krankheitsverursachend). Der angegebene Wert entspricht dem Bayes-Klassifikator p , also der Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit der Vorhersage (sichere Prädiktion: $p=1$). Neben den Kontrollen wird nur die Substitution p.Ser824Ala als neutral erkannt.

Tabelle 3.7 Zusammenstellung der Ergebnisse der Prädiktionsalgorithmen

COH1-SNV (ENST00000357162)	Grantham Score	PROVEAN Score	SIFT Score	Polyphen-2	MutPred2 Probability	SNPs&GO – PhD-SNP	SNPs&GO – SNPs&GO	Mutationtaster Probability
p.Ala590Thr	58	-0,692	0,195	0,908	0.312	0,22	0,05	0,998618499
p.Ser824Ala	99	-0,52	0,303	0,136	0.159	0,244	0,062	0,99999999726
p.Thr1289Ser	58	-0,827	0,416	0,997	0.789	0,162	0,03	0,999952948
p.Ile1611Asn	194	-4,377	0,002	0,999	0.891	0,839	0,377	0,999993993
p.Leu2168Ar	102	-3,35	0,003	0,93	0.937	0,793	0,307	0,966354919
p.Tyr2316Cys	194	-7,706	0	1	0.877	0,85	0,511	0,966354919
p.Gly2620As	94	-6,089	0	1	0.609	0,851	0,45	0,999999997
p.Gly2704Ar	125	-6,956	0	1	0.871	0,931	0,764	0,999999986
p.Ser2748Leu	145	-3,667	0,002	0,999	0.898	0,698	0,136	0,999999504
p.Ile2795Thr	89	-1,678	0,12	0,501	0.344	0,608	0,163	0,991215748
p.Asn2968Ser	46	-4,611	0	0,997	0.216	0,635	0,215	0,999998306
p.Ser3303Arg	110	-3,178	0,001	0,993	0.643	0,718	0,174	0,999998166
p.Ala3691Thr	58	-3,289	0	1	0.761	0,087	0,008	0,999999997
p.Val759Leu*	32	-0,346		0,001	0,307	0,482	0,114	0,99494074875
p.Ser1834Leu	145	-0,742		0,001	0,206	0,168	0,023	0,99999999998
Gly3407Arg*	125	-0,126		0,001	0,298	0,319	0,073	0,99999999859

*Polymorphismus-Kontrollen, Dignität nach Färbung. grün: neutral; gelb: wahrscheinlich neutral; orange: wahrscheinlich pathogen; rot: pathogen

3.4.3 Analyse der Konservierung der *missense*-Varianten in COH1

Mithilfe der Software BioEdit (Ibis Therapeutics, Carlsbad, CA) wurden cDNA-Sequenzen von humanen und 17 weiteren Spezies analysiert und auf die Konservierung der assoziierten Sequenzareale untersucht. Hier zeigt sich, dass die betreffende Aminosäure in über 12 von 17 Organismen hochkonserviert ist, zudem dass die angrenzenden Sequenzabschnitte in allen Fällen homolog sind. Konservierte Sequenzen können aufgrund evolutionärer Persistenz ein Hinweis auf bio-funktionelle Relevanz sein. (s. *ConservationPlot*, Anhang A1)

3.4.4 Analyse der COH1 *missense*-Varianten hinsichtlich ihrer Nähe zu bekannten Proteinmotiven

Kausal für eine funktionelle Alteration durch eine *missense*-Variante können Beteiligungen funktioneller oder struktureller Proteinmotive oder -domänen sein. Da aktuell keine bekannten Sequenzabschnitte dieser Art für COH1/VPS13B bekannt sind, wurde mithilfe von Datenbanken (ExPASy, NCBI Conserved Domain Search) im humanen COH1/VPS13, der VPS13-Familie und Vps13 nach homologen Aminosäuresequenzabschnitten zu bekannten Proteinmotiven und -domänen gesucht.

3.5 Herstellung von Expressionsvektoren mit COH1-SNV

Um subzelluläre Lokalisation von COH1 nach *missense*-Varianten beurteilen zu können, wurden COH1-Konstrukte kloniert, die die Überexpression von COH1-SNV in Säugerzellen ermöglichen (COH1-mut).

3.5.1 Mutagenese-PCR der Expressionsvektoren

Als PCR-Matrize lag die kodierende humane COH1-Wildtyp-Sequenz (NM_152564) in einem pcDNA3.1-Vektor vor (pcDNA3.1_hCOH1-wt, COH1-wt). Ausgehend von diesem Konstrukt wurden mit Hilfe der Mutageneseprimer die veränderten Basen in die Sequenz eingebracht (s. Kapitel 2.2.1.2). Es entstand ein 17654 bp langes lineares Amplifikat (COH1 12131 bp, pcDNA3.1 5523 bp), welches zum Nachweis und zur weiteren Präparation auf ein Agarosegel aufgetragen wurde. In Abbildung 3.2 A ist beispielhaft die gelelektrophoretische Trennung des Produkts pcDNA3.1_hCOH1-mut_Ala590Thr (COH1mutAla590Thr) dargestellt.

Es folgte die Extraktion aus dem Agarosegel mit anschließender Ligation der Amplifikate zum ringförmigen Vektor. Diese wurden in TOP10-E.coli-Kulturen transformiert, die Plasmide wiederum aus den herangewachsenen Kulturen präpariert und für die weitere Analyse aufgereinigt. Zur ersten Kontrolle erfolgte ein Restriktionsverdau mit der Endonuklease HindIII. Die Restriktionsendonuklease spaltet das Plasmid in 6 Fragmente unterschiedlicher Länge, die mit Hilfe einer weiteren Agarosegelelektrophorese visualisiert wurden. Abbildung 3.2 B zeigt beispielhaft das unverdaute und verdaute Plasmid pcDNA3.1_hCOH1-mut_Ala590Thr. Da dieser Verdau nicht spezifisch für die eingefügte Veränderung ist, wurde zur Kontrolle eine Sanger-Sequenzierung der Plasmide durchgeführt. Damit wurde sowohl die Korrektheit der restlichen Plasmidsequenz als auch die Präsenz des Nukleotidaustauschs nachgewiesen. Für die Anwendung der Plasmide in Folgeversuchen, wurden die fertigen pcDNA3.1_hCOH1-mut Vektoren in höherer Konzentration präparativ aufgereinigt.

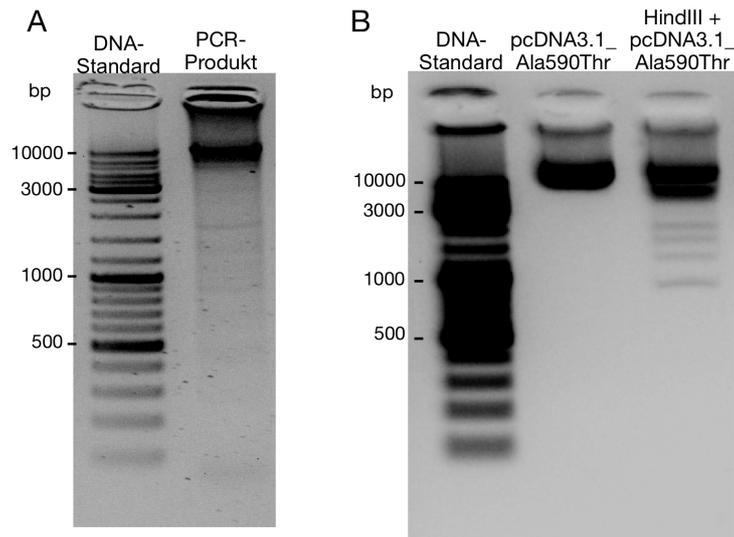


Abbildung 3.2 Darstellung eines Mutagenese-PCR-Amplifikats im präparativen Agarose-Gel (A); Darstellung des aufgereinigten Vektors und des HindIII-Restriktionsverdaus im analytischen Agarose-Gel (B); hier für pcDNA3.1_hCOH1-mut_Ala590Thr. DNA-Standard: GeneRuler DNA Ladder Mix. Visualisierung in 1,5% Agarose-Gel unter Zusatz von GelRed im MultiImage-System Alpha Innotech.

3.6 Etablierung einer murinen Zellkultur zur Transfektion der COH1- mut und Beurteilung der GA-Morphologie

Neben der bereits für COH1-Experimente etablierten Hela-Zellkultur wurde im Rahmen dieser Arbeit zudem eine murine Zellkultur etabliert. Anforderungen an die verwendete Zelllinie waren zum einen eine kompakte native GA-Struktur und zum anderen eine hohe Transfektionsrate in RNAi- und Überexpressionsexperimenten. Die untersuchten murinen Zelllinien waren B16F1, C2C12, MC3T3 und NIH3T3. Zur Darstellung der nativen GA-Struktur wurde eine Immunfluoreszenz-Ko-Färbung mit dem Golgi-Transportprotein RAB6 und dem Golgi-Matrixprotein GM130 durchgeführt. Hier zeigte sich für die MC3T3- und NIH3T3-Zellen eine kompakte, gut diskriminierbare GA-Struktur (s. Abbildung 3.3).

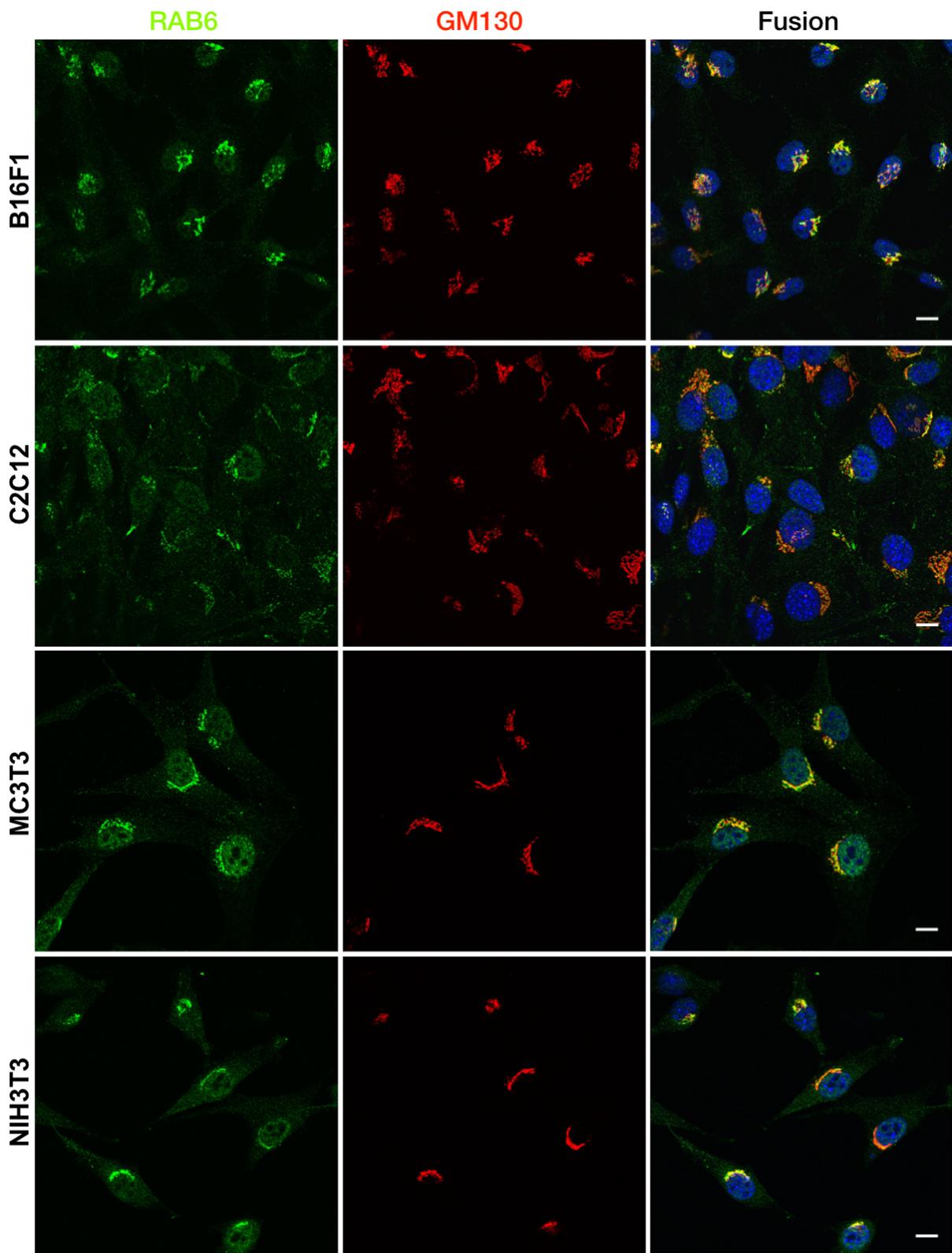


Abbildung 3.3 Immunofluoreszenz-Darstellung der nativen GA-Morphologie in unterschiedlichen Zelllinien. Kolokalisation von RAB6 (grün) und GM130 (rot) nach entsprechender Antikörpermarkierung. Kompakte, klar differenzierbare GA-Struktur insbesondere in MC3T3- und NIH3T3-Zellen. Konfokalmikroskopische Darstellung. Zellkernfärbung (blau) mit DAPI. Maßstabsbalken 10 μm .

3.7 Studien zur Lokalisation der COH1-Mutanten

Zur Darstellung der intrazellulären Lokalisation von COH1-Mutanten wurden Überexpressionsexperimente an HeLa-Zellen durchgeführt. Neben einer Negativkontrolle und pcDNA3.1_hCOH1-wt wurden alle vorhandenen pcDNA3.1_hCOH1-mut Vektoren transfiziert. Die Zellen wurden nach 24 Stunden fixiert und mittels Immunfluoreszenz markiert. Die Überexpression von pcDNA3.1_hCOH1-wt zeigte im Vergleich zur nichttransfizierten Negativkontrolle eine deutliche Signalverstärkung bei gleicher Belichtung. Die perinukleäre Anreicherung von COH1-wt konnte durch Kolo­kalisierung mit GM130 und TGN64 bestätigt werden (Abb. 3.4).

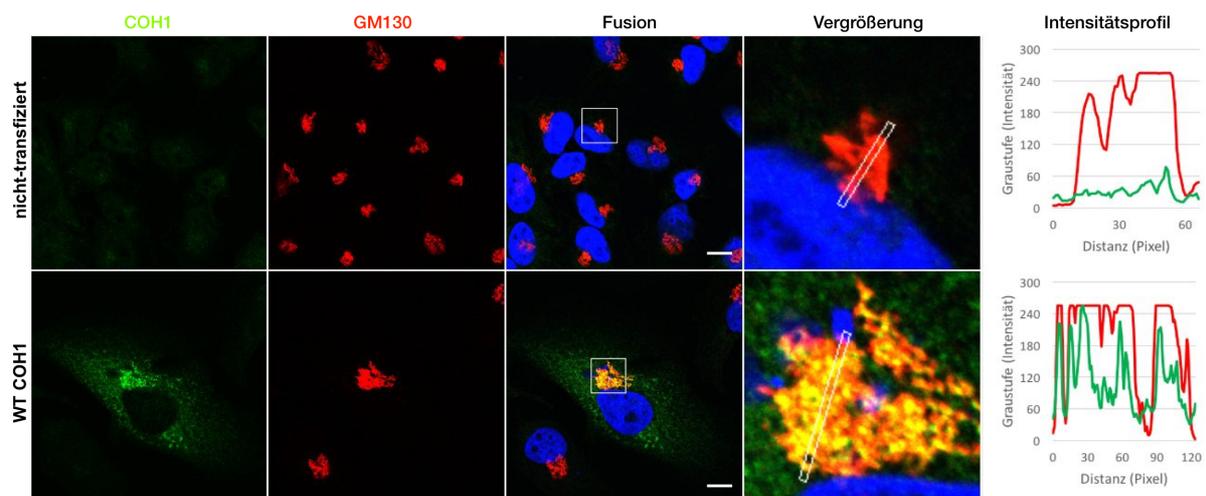


Abbildung 3.4 Lokalisation des pcDNA3.1_hCOH1-wt und der nicht-transfizierten Kontrolle in HeLa-Zellen. Kolo­kalisierung von COH1 (grün) und GM130 (rot) nach Immunfluoreszenz-Antikörpermarkierung und konfokaler Mikroskopie. In der nicht-transfizierten Kontrolle schwaches intrinsisches COH1-Signal. In der Überexpression von COH1-wt deutliches, z.T. vesikuläres zytosolisches Signal in Kolo­kalisierung mit GM130. Zellkernfärbung (blau) mit DAPI, Maßstabsbalken in Fusion entsprechen 10 μm , weißer Kasten in Fusion entspricht Vergrößerung, weiße Markierung in Vergrößerung entspricht Verlauf des Intensitätsprofils.

Die pcDNA3.1_hCOH1-mut Vektoren zeigten ein heterogenes Lokalisationsverhalten. Die COH1-mut Substitutionen Ala590Thr, Ser824Ala und Asn2968Ser zeigten eine mit dem COH1-wt vergleichbare perinukleäre Kolo­kalisierung mit dem GM130 (Abb. 3.6). Dagegen kolo­kalisieren COH1-mut Thr1289Ser, Ile1611Asn, Leu2168Arg, Tyr2316Cys, Gly2620Asp, Gly2704Arg, Ser2748Leu und Ile2795Thr nicht mit GM130 und lagen in vesikulären Aggregaten diffus im gesamten Zytoplasma verteilt vor (Abb. 3.5).

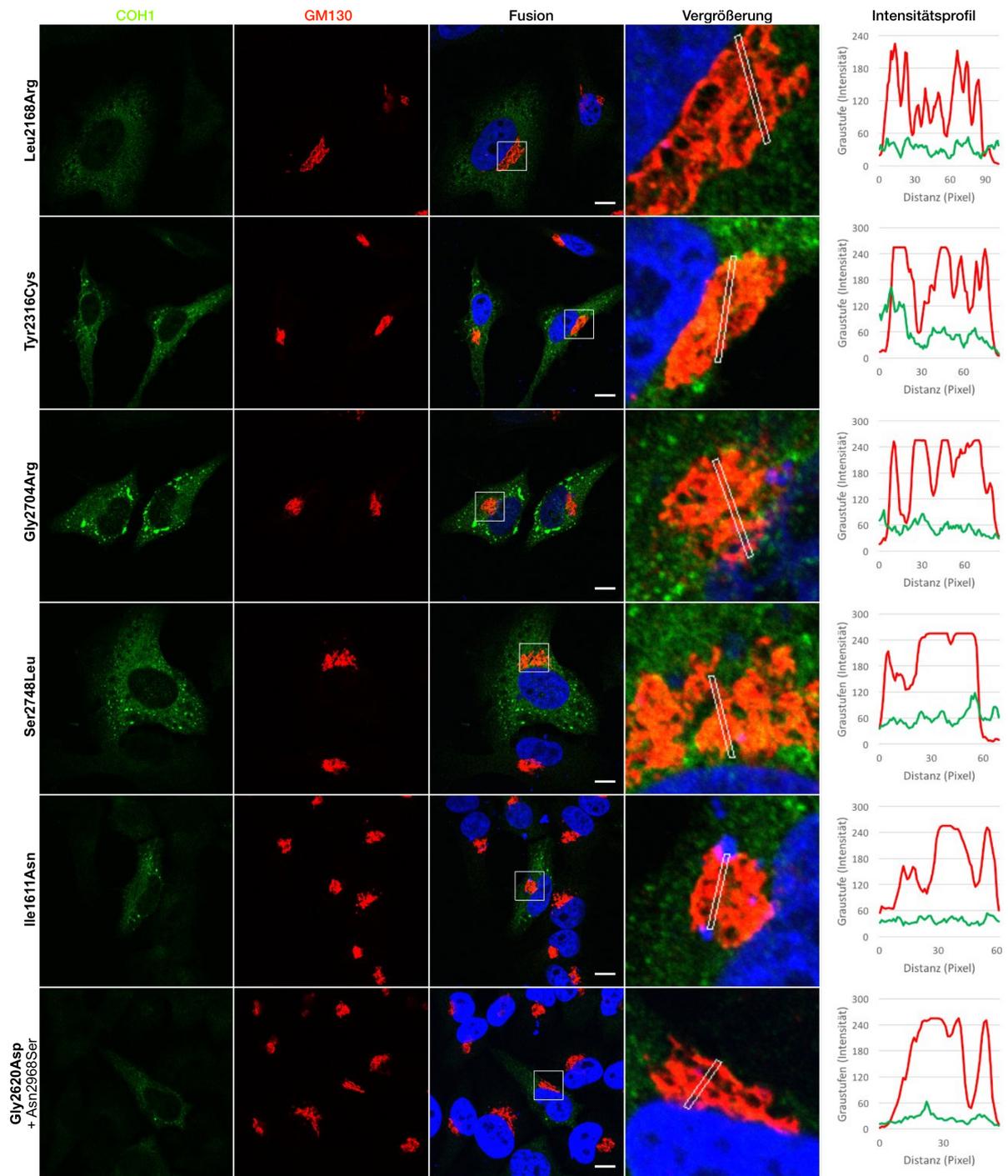


Abbildung 3.5 Lokalisation nach Überexpression von pcDNA3.1_hCOH1-mut Leu2168Arg, Tyr2316Cys, Gly2704Arg, Ser2748Leu und Ile1611Asn, Gly2620Asp+Asn2968Ser in HeLa-Zellen. Doppelmarkierung von COH1 (grün) und GM130 (rot). Morphologisch diffus-vesikuläre zytoplasmatische Verteilung von COH1-mut ohne Kolokalisation zu GM130. Zellkernfärbung mittels DAPI (blau), Maßstabsbalken in Fusion entsprechen 10 μm , weißer Kasten in Fusion entspricht Vergrößerung, weiße Markierung in Vergrößerung entspricht Verlauf des Intensitätsprofils.

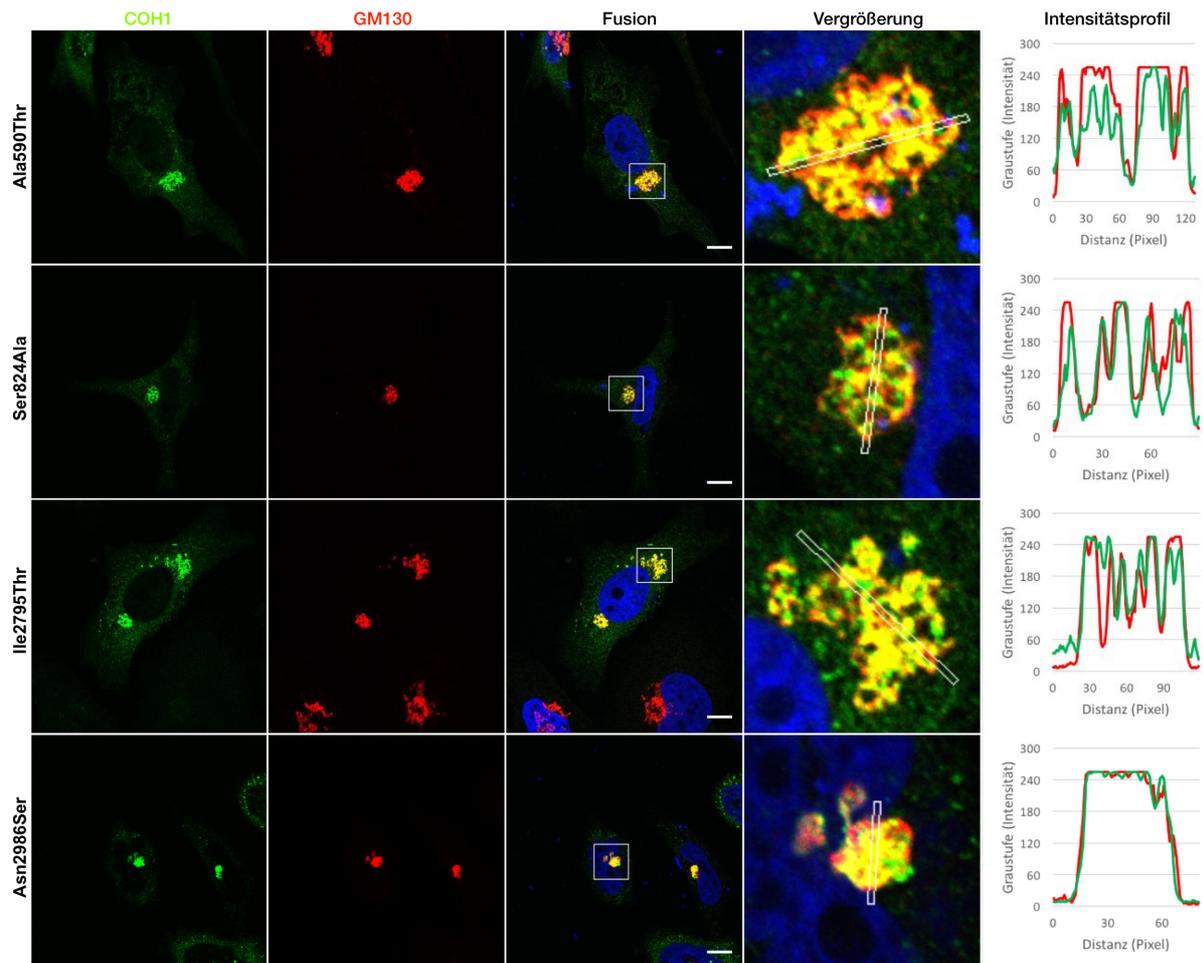


Abbildung 3.6 Lokalisation nach Überexpression von pcDNA3.1_hCOH1-mut Ala590Thr, Ser824Ala, Ile2795Thr, Asn2986Ser in HeLa-Zellen. Doppelmarkierung von COH1 (grün) und GM130 (rot). Morphologisch deutliche Kolo­kalisation von COH1-mut zu GM130. Zellkernfärbung mittels DAPI (blau), Maßstabsbalken in Fusion entsprechen 10 μ m, weißer Kasten in Fusion entspricht Vergrößerung, weiße Markierung in Vergrößerung entspricht Verlauf des Intensitätsprofils.

3.8 Studien zur Morphologie des GA bei COH1-siRNA-Knockdown

Zur Beurteilung der Golgi-Morphologie bei dysfunktionalem COH1 wurden siRNA-Experimente durchgeführt. Der RNA-Interferenz-Knockdown wurde in murinen NIH3T3-Zellen mit drei verschiedene siRNAs des murinen *Cohl* etabliert (siRNA s233217, siRNA s233218, siRNA s233219). Zusätzlich wurde eine bereits etablierte und publizierte siRNA des humanen *COH1* transfiziert (siRNA 25721), welche zu murinen *Cohl* eine 100% Sequenzhomologie aufweist (3). Die Transfektion der siRNA erfolgte bei einer Zellkonfluenz von 50-65% mithilfe des Transfektionsagens INTERFERin (Polyplus Transfection). Nach einer Inkubationszeit von 72h wurden die Zellen fixiert und aufbereitet (siehe auch Kap 2.3.3.1).

Zur Quantifizierung der RNA-Interferenz wurde die extrahierte RNA mittels qPCR analysiert. Hier zeigte sich eine signifikante Reduktion der *Cohl*-Expression im Vergleich zur Kontrolle auf $\leq 30\%$ (siRNA25721 = $16\% \pm 0,4$; siRNA233217 = $25\% \pm 1$; siRNA233218 = $30\% \pm 1$; siRNA233219 = $29\% \pm 4$).

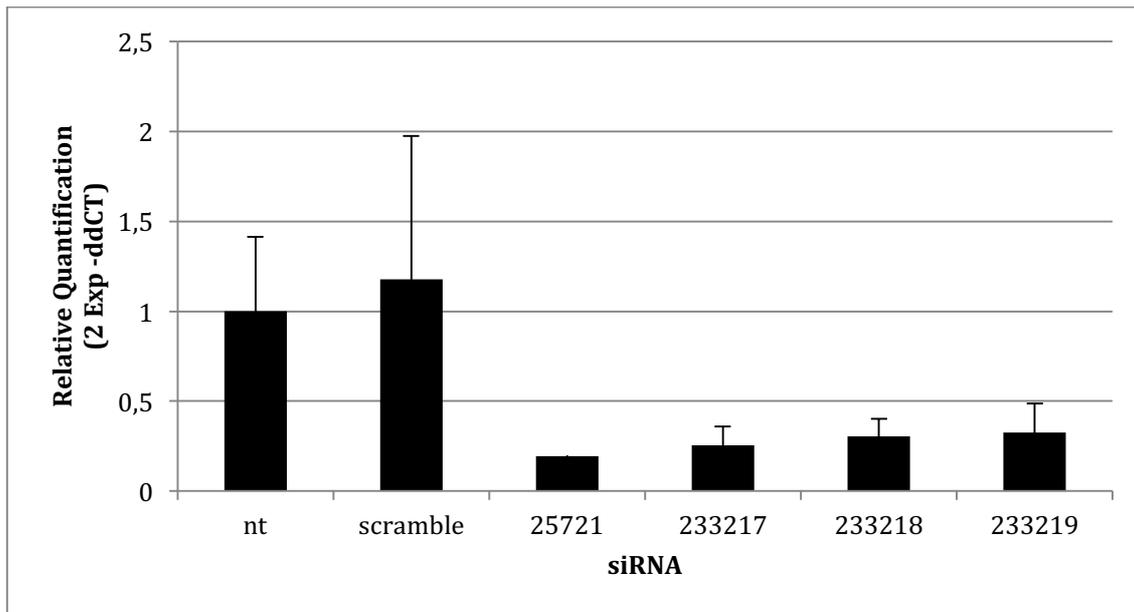


Abbildung 3.7 Relative Quantifizierung der mRNA-Expression von *Coh1* in NIH3T3-Zellen nach RNAi-vermitteltem *knockdown*. qPCR-Analyse der COH1-mRNA-Expression nach COH1-siRNA-Behandlung und Kontrolle. n=6.

Die Immunfluoreszenz-Markierung des GA der transfizierten NIH3T3-Zellen erfolgte jeweils mit RAB6- und GM130-Antikörpern. RAB6 ist ein kleine GTPase, die an der Exozytose von Vesikeln vom TGN zur Zellmembran via zytoskelettaler Filamente beteiligt ist (139). RAB6 dient in diesem Experiment der Darstellung des TGN. GM130 ist ein cis-Golgi-Matrix-Protein mit strukturgebender Funktion des GA im Zellzyklus (98, 140). IF-Morphologisch zeigte sich für alle verwendeten siRNAs eine Fragmentierung des GA in multiple perinukleäre Vesikel. Dieses Ergebnis steht in Einklang mit der Literatur (3). Basierend auf den konfokalmikroskopischen Bildern wurden mithilfe eines eigens geschriebenen ImageJ-Makros (Anhang A3) die Anzahl der Golgi-Fragmente, deren durchschnittliche Größe und Fläche quantifiziert (Abb.3.8).

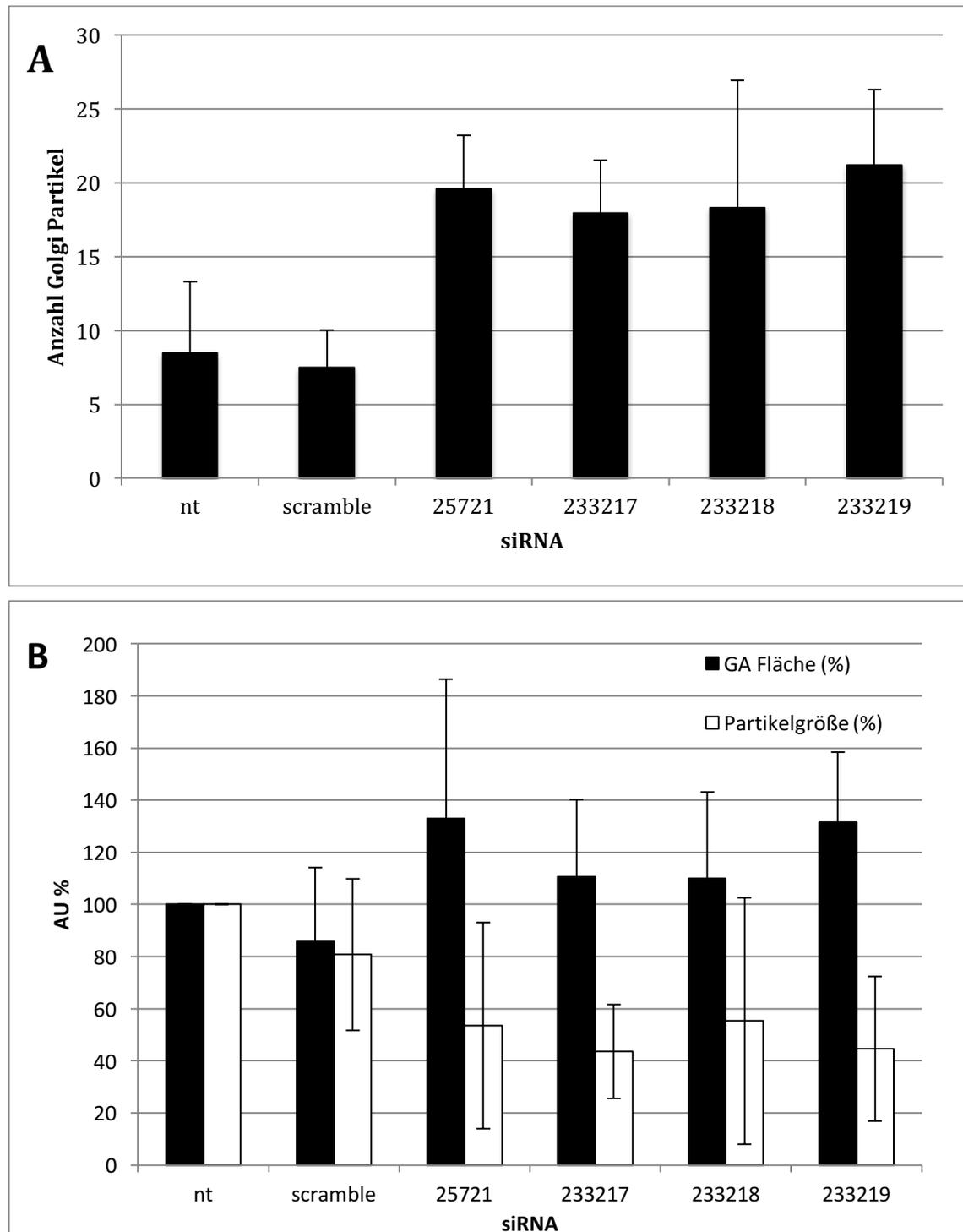
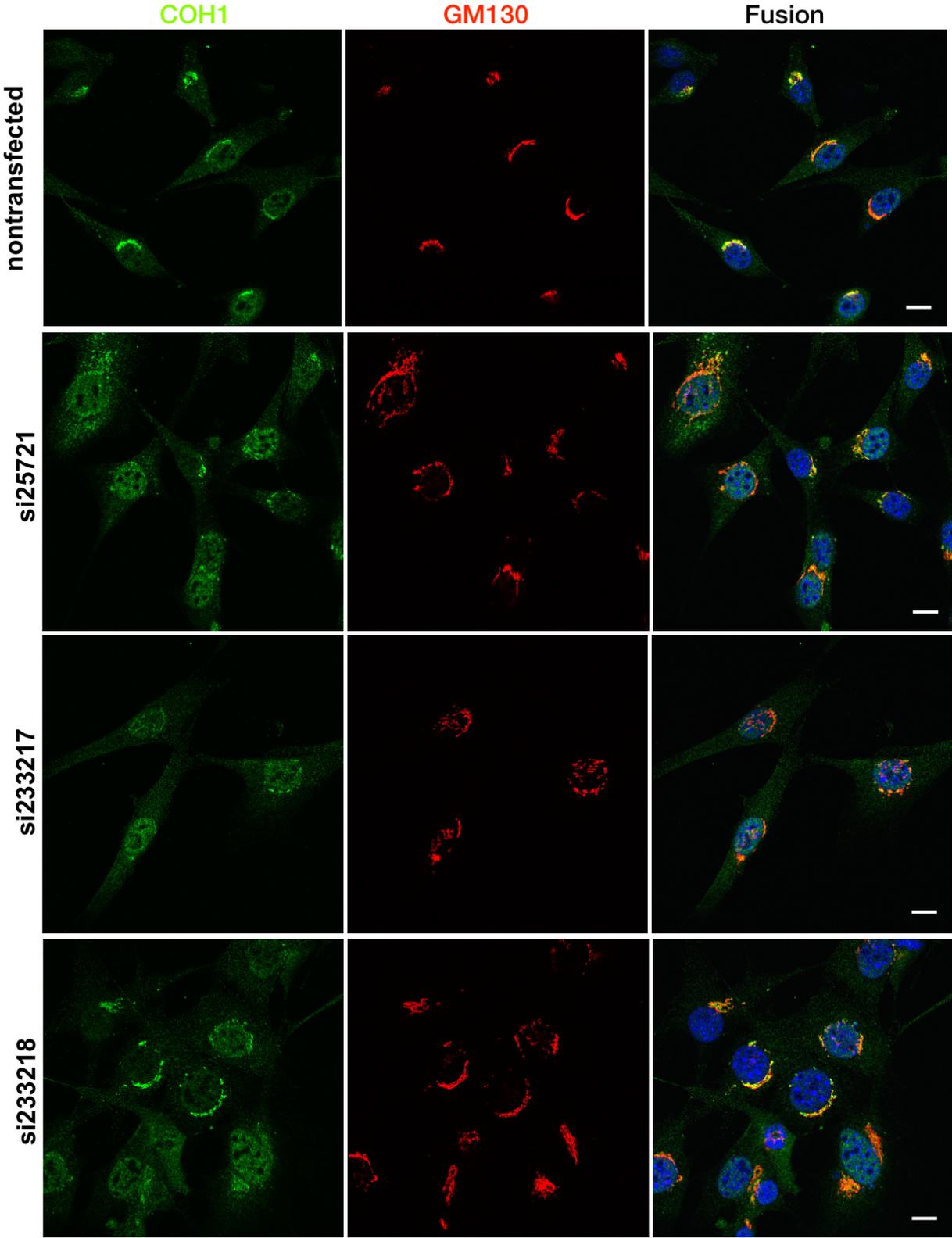


Abbildung 3.8 Analyse der GA-Morphologie unter *Coh1*-siRNA-knockdown-Behandlung in NIH3T3-Zellen. A Unter siRNA-Behandlung steigt die Anzahl der Golgi-Fragmente, B gleichzeitig steigt die Fläche relativ zur Kontrolle und die durchschnittliche Größe eines Fragmentes sinkt. Basierend auf IF-Bildern. Analyse mit ImageJ (Macro: Golgi). n=4 (4 unabhängige Versuche mindestens 30 pro siRNA Zellen).



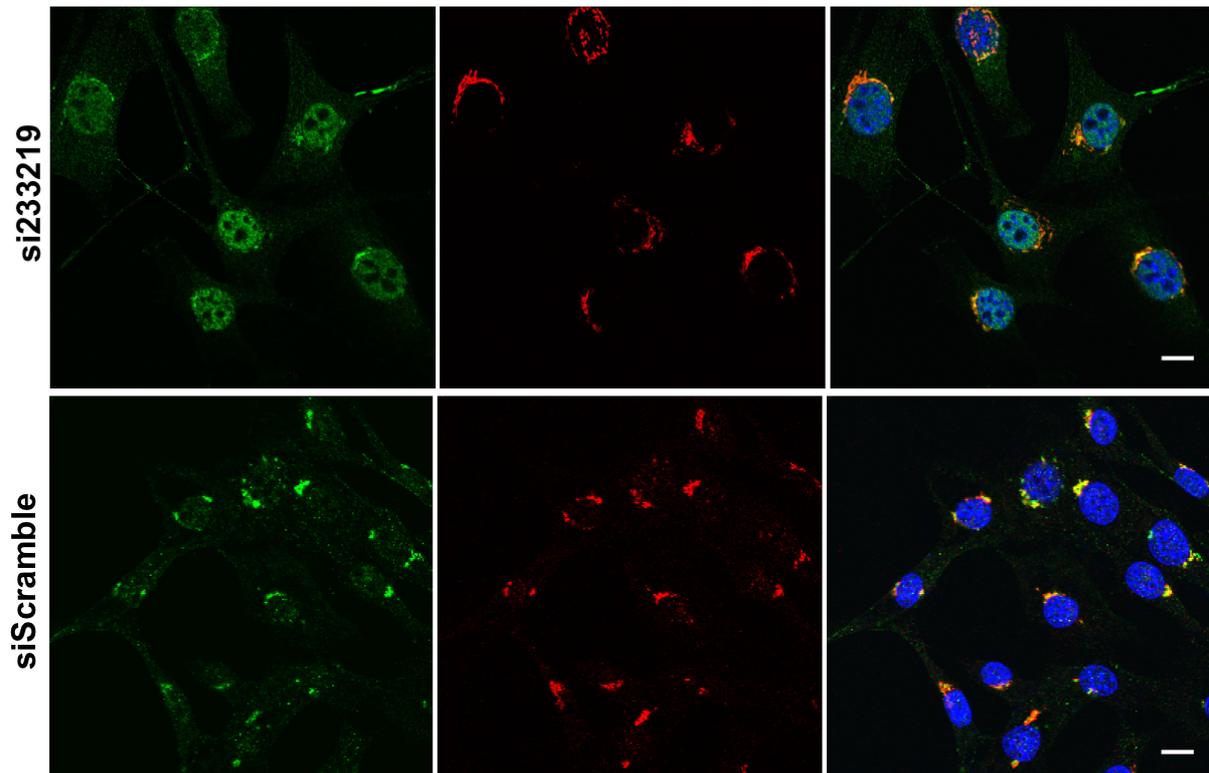


Abbildung 3.9 Immunofluoreszenz-Morphologie des GA in NIH3T3-Zellen nach RNAi. Kolokalisation von RAB6 (grün) und GM130 (rot) nach entsprechender Antikörpermarkierung. Konfokalmikroskopische Darstellung. Partielle Kolokalisation von RAB6 (TGN-Marker) und GM130 (CGN-Marker) am GA (gelb). Im Vergleich zu der Kontrolle und der siScramble führen alle verwendeten siRNAs zu einer morphologischen Fragmentierung des GA. Zellkernfärbung (blau) mit DAPI. Maßstabsbalken 10 μ m.

3.9 Studien zur Wiederherstellung der GA-Morphologie durch Transfektion von COH1-mut nach RNAi (*Rescue*)

Wie bereits in Kapitel 3.8 gezeigt, führt der siRNA-Knockdown von *Coh1* in NIH3T3 Zellen zu einer Fragmentierung des GA. Um die Frage der potentiellen Auswirkung der *missense*-Varianten auf COH1 zu klären, wurde das siRNA-Experiment um einen *rescue* ergänzt, indem nach erfolgtem RNAi eine Überexpression des pcDNA3.1_hCOH1-wt und der pcDNA3.1_hCOH1-mut durchgeführt wurde. Für den RNAi wurde die humane siRNA (si25721) gewählt, da die pcDNA3.1_hCOH1-Überexpression sowohl in NIH3T3 als auch in keiner anderen murinen Zelllinie zu einer stabilen hohen Transfektionsrate führte. In der nicht-transfizierten, aber mit siRNA behandelten Kontrolle zeigte sich die oben beschriebene fragmentierte Struktur des GA bei unspezifischem COH1-Signal (Abb. 3.10, oben). Nach Überexpression von pcDNA3.1_hCOH1-wt konnte die perinukleäre, kompakte Struktur des GA wiederhergestellt werden (Abb. 3.10, unten). Nach Überexpression von pcDNA3.1_hCOH1-mut Ala590Thr, Ser824Ala und Asn2968Ser war eine kompakte GA-Struktur mit Kolokalisation von COH1 und GM130 zu beobachten (Abb. 3.11). Die übrigen pcDNA3.1_hCOH1-mut zeigten diese Lokalisation nicht, und die Fragmentierung blieb bestehen (Abb. 3.12).

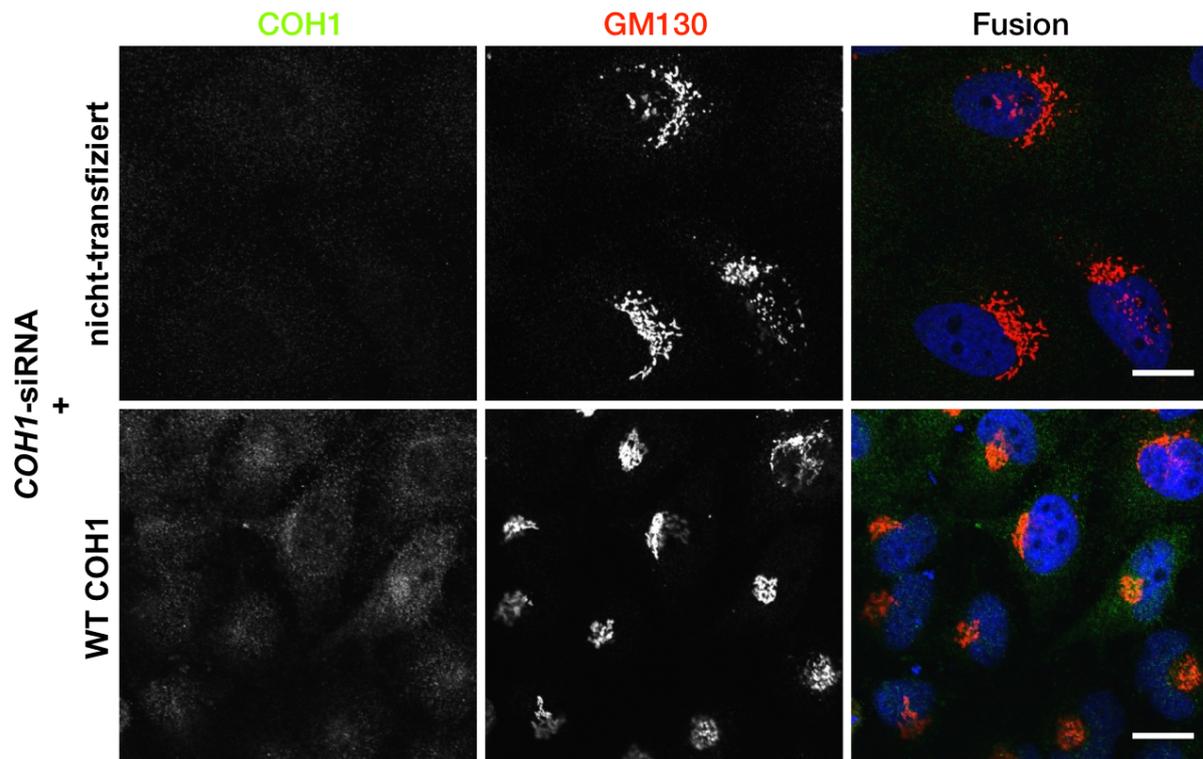
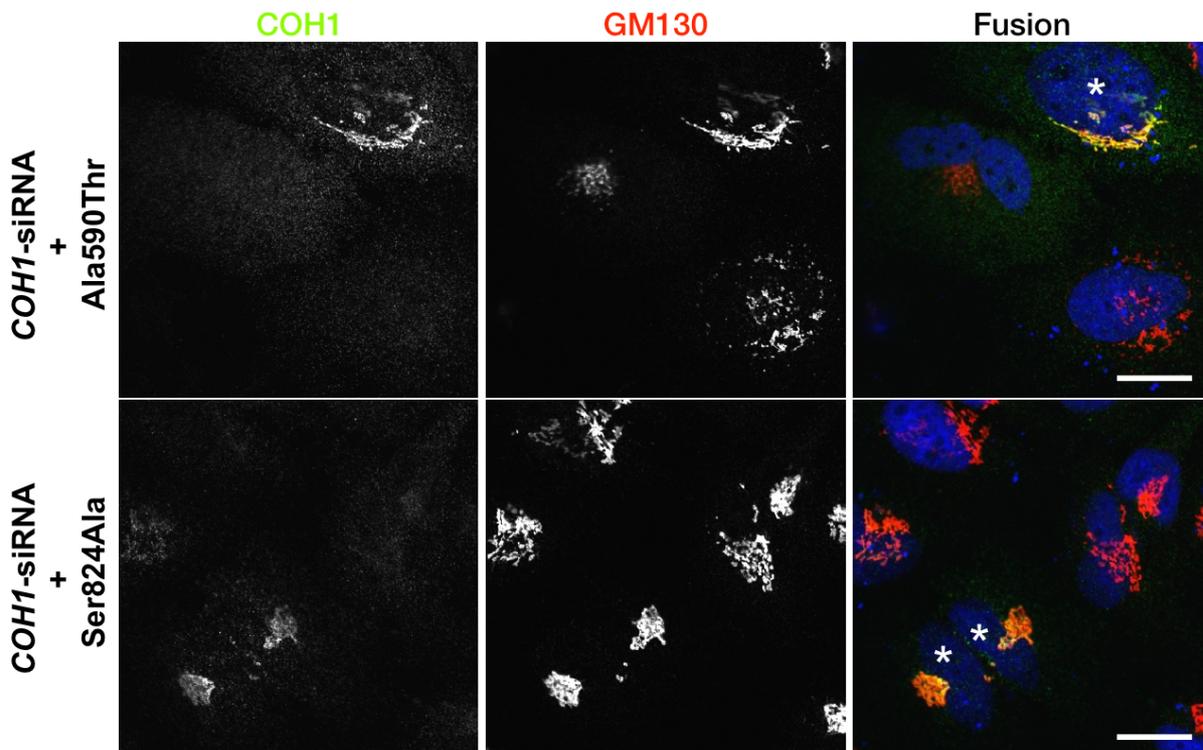


Abbildung 3.10 Immunofluoreszenz-Morphologie des GA in HeLa-Zellen Kontrollen. Kolokalisation von COH1 (grün) und GM130 (rot) nach entsprechender Antikörpermarkierung. Konfokalmikroskopische Darstellung. *Nicht-transfiziert* entspricht der alleinigen *COH1*-siRNA-Behandlung. Unspezifisches COH1-Signal, perinukleäre Fragmentierung des GA sichtbar im GM130-Signal. *COH1*-siRNA- mit anschließender pcDNA3.1_hCOH1-Transfektion. Hier zeigt sich eine partielle Kolokalisation von COH1 und GM130 (CGN-Marker) am GA (gelb). Der GA zeigt hier eine kompakte, nicht-fragmentierte Struktur. Zellkernfärbung (blau) mit DAPI. Maßstabsbalken 10 µm.



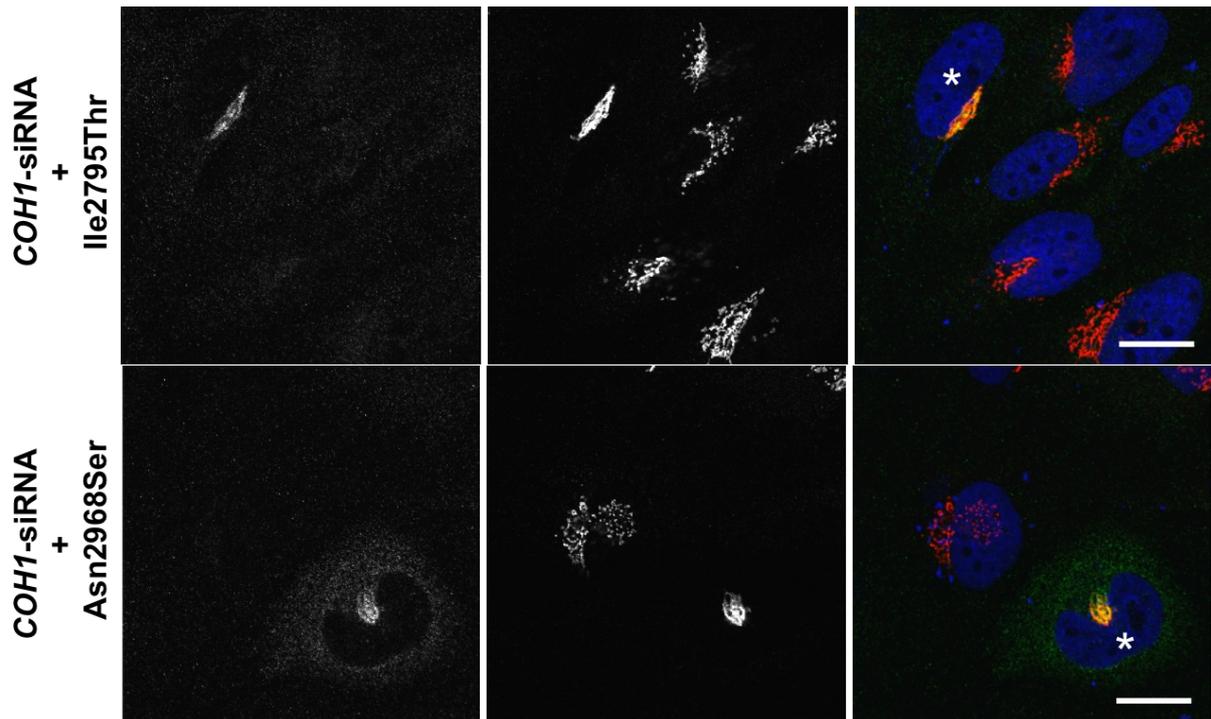
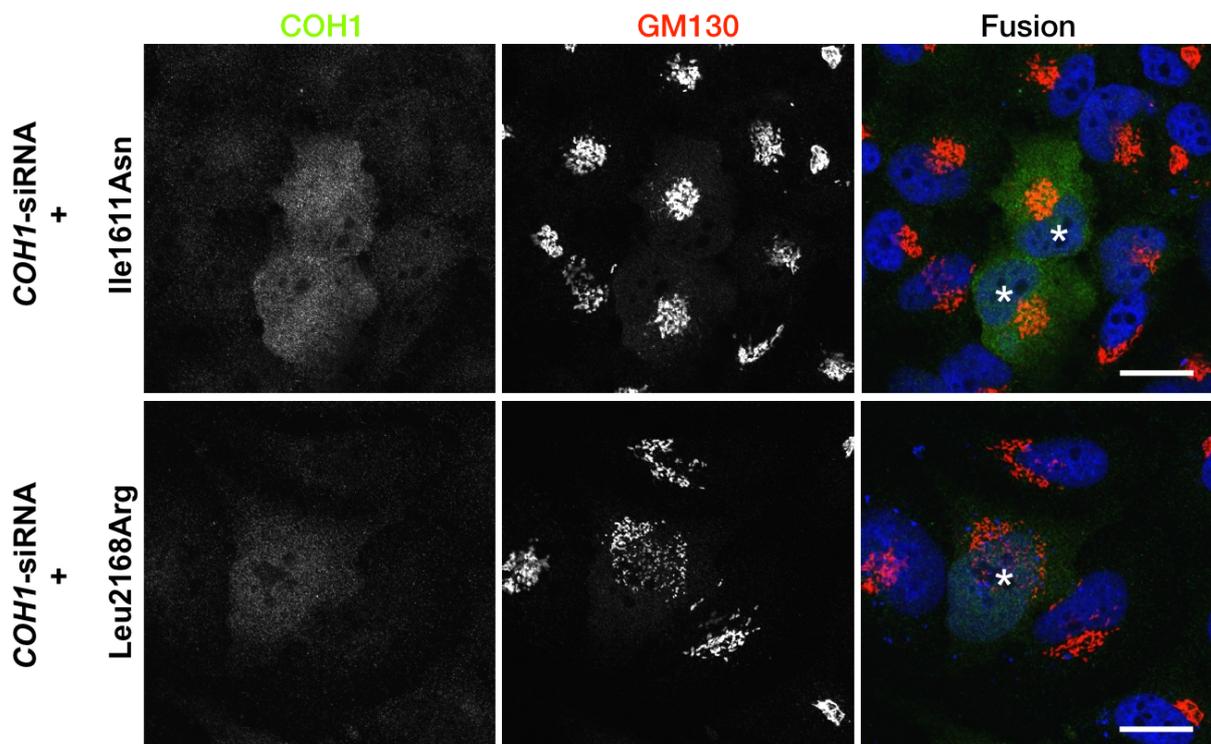


Abbildung 3.11 Immunofluoreszenz-Morphologie des GA in HeLa-Zellen nach Transfektion mit COH1-siRNA und pcDNA3.1_hCOH1-mut. Kolokalisation von COH1 (grün) und GM130 (rot) nach Antikörpermarkierung. Zellen mit erfolgter Überexpression des entsprechenden pcDNA3.1_hCOH1-mut Vektors (mit *-Markierung) weisen einen kompakten, nicht-fragmentierten GA auf. Benachbarte Zellen ohne spezifisches COH1-Signal, ergo nicht-transfiziert, zeigen GA-Fragmentierung. Konfokalmikroskopische Darstellung. Zellkernfärbung (blau) mit DAPI. Maßstabsbalken 10 μ m.



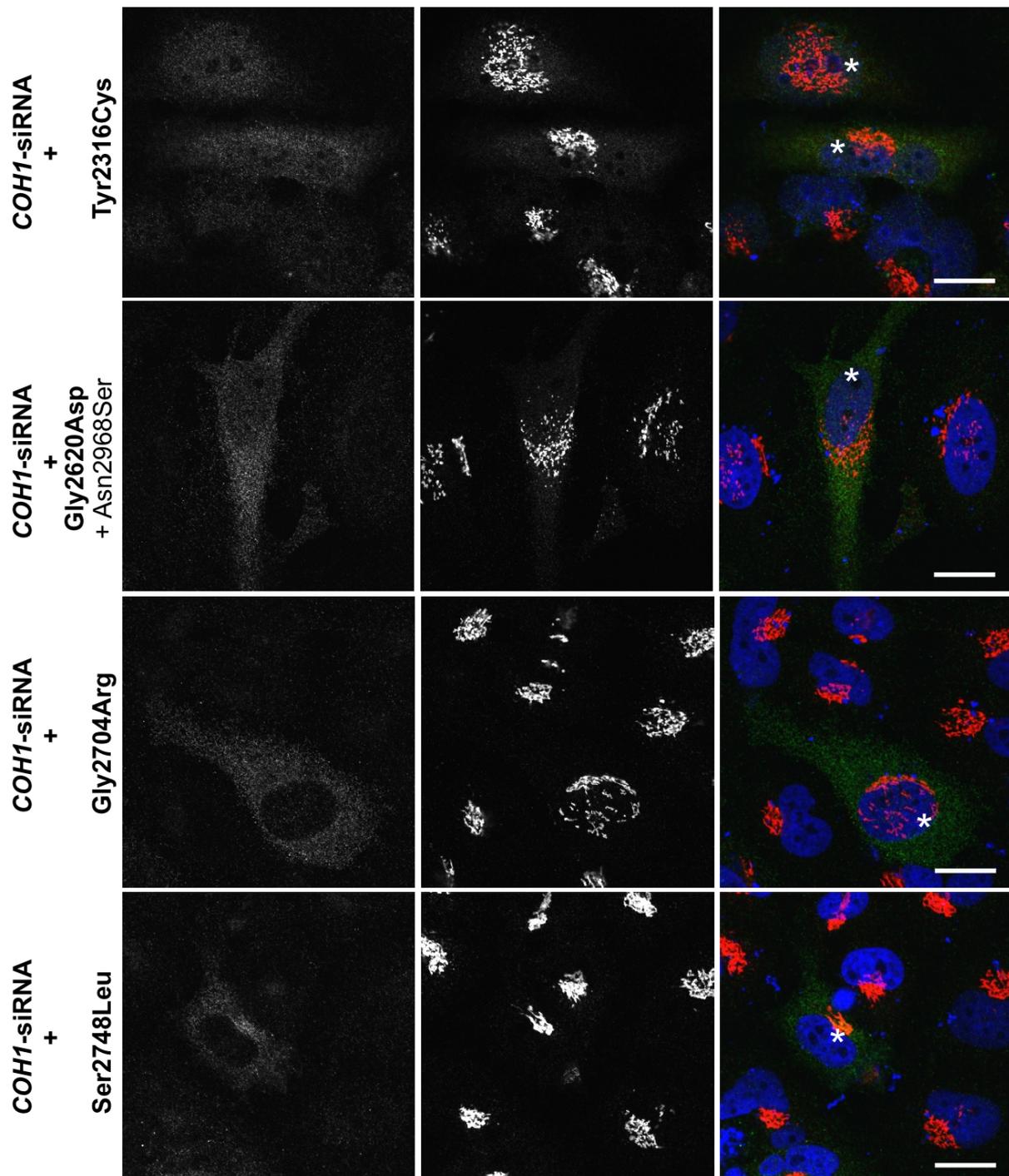


Abbildung 3.12 Immunofluoreszenz-Morphologie des GA in HeLa-Zellen nach Transfektion mit COH1-siRNA und pcDNA3.1_hCOH1-mut. Kolokalisation von COH1 (grün) und GM130 (rot) nach Antikörpermarkierung. Zellen mit erfolgreicher Überexpression des entsprechenden pcDNA3.1_hCOH1-mut Vektors (mit *-Markierung) weisen eine diffuse Verteilung des COH1-mut-Signales im Zytoplasma auf. Der GA stellt sich im Vergleich zu den benachbarten Zellen unverändert fragmentiert dar. Konfokalmikroskopische Darstellung. Zellkernfärbung (blau) mit DAPI. Maßstabsbalken 10 µm.

3.10 Studien zur Membranbindung der COH1-SNV

COH1 ist ein peripheres Membranprotein, das zwischen Zytoplasma und Lipidmembran verteilt ist (3). Werden die Zellmembrananteile mittels Ultrazentrifugation von der zytosolischen Fraktion getrennt, ist im Falle des endogenen COH1 und bei Überexpression eines COH1-wt Konstrukts

das Protein vornehmlich in der Membranfraktion, in geringeren Mengen jedoch auch in der zytosolischen Fraktion zu finden. Ob die *missense*-Varianten Auswirkungen auf die Fähigkeit zur Membranbindung haben, wurden mittels Überexpression der COH1-mut Konstrukte in Hek293-Zellen und anschließend Lipidmembranpräparation und Westernblotting geprüft (Tab. 3.8).

Es zeigte sich, dass sowohl der das COH1-wt Protein als auch die COH1-SNV p.Ala590Thr, p.Ser824Ala und p.Asn2968Ser in beiden Phase nahezu gleichverteilt waren. Die COH1-SNV Proteine p.Thr1289Ser, p.Ile1611Asn, p.Leu2168Arg, p.Tyr2316Cys, p.Gly2620Asp, p.Gly2704Arg, p.Ser2748Leu und p.Ile2795Thr fanden sich zu über 70% in der zytosolischen Phase. Für die COH1-mut p.Thr1289Ser gelang keine reproduzierbare Membranpräparation.

Tabelle 3.8 Zusammenstellung der Ergebnisse der Membranpräparation zur Verteilung von membrangebundenem und zytosolischem COH1. Farbkodierung: grün: Membranfraktion > 30%, gelb: Doppelmutante, rot: Membranfraktion < 30%

Konstrukt (pcDNA3.1_hCOH1)	Anteil in der Membran- Fraktion (%)	Anteil in der zytosolischen Fraktion (%)
wild type COH1	46,7	53,3
p.Ala590Thr	36,6	63,4
p.Ser824Ala	34,1	65,9
p.Ile1611Asn	22,5	77,5
p.Leu2168Arg	26,0	74,0
p.Tyr2316Cys	27,1	72,9
p.Gly2620Asp*	33,0	67,0
p.Gly2704Arg	25,5	74,5
p.Ser2748Leu	18,9	81,1
p.Ile2795Thr	20,1	79,9
p.Asn2968Ser	44,1	55,9

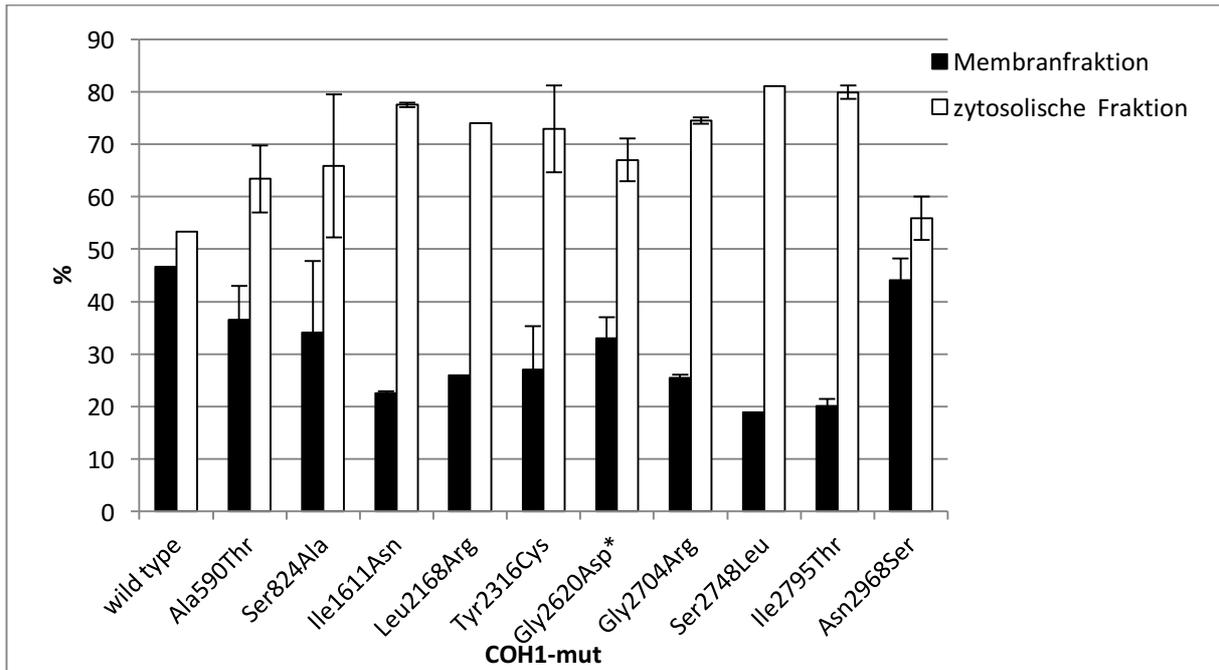


Tabelle 3.9 Analyse der Verteilung von COH1-wt und COH1-mut zwischen zytosolischer und Membranfraktion. Basierend auf Westernblot-Ergebnissen. Schwarze Balken repräsentieren die Membranfraktion, weiße Balken die zytosolische Fraktion.

4 Diskussion

Das Cohen-Syndrom ist eine genetische Erkrankung mit autosomal-rezessivem Erbgang und wird durch Varianten im Gen *COH1* verursacht (2). Einen Anhalt für andere Gene, die einen Einfluss auf die Ausbildung des Cohen-Syndroms haben, gibt es aktuell nicht. In der Mehrzahl wird die Erkrankung durch Einzelnukleotidaustausche, die zu sogenannten *nonsense*-Varianten führen, oder durch *frameshift*-Varianten infolge von kleineren Insertionen oder Deletionen hervorgerufen (4). Mit der Etablierung von *genomic imbalance (array-CGH, MLPA)*- sowie *next generation sequencing (whole and exome)*-Techniken konnte die Limitierung der Sanger-Sequenzierung auf kurze Sequenzabschnitte überwunden werden (141). Für Patienten mit Cohen-Syndrom konnten ab diesem Zeitpunkt vermehrt intragenische größere Deletionen und Insertionen nachgewiesen werden (5, 9). Für den Großteil der Cohen-Syndrom-assoziierten Veränderungen ist bekannt, dass die Expression verkürzter *COH1*-Proteine durch den Kontrollmechanismus *nonsense-mediated-mRNA-decay* (NMD) verhindert wird (3). Zusammen mit dem rezessiven Erbgang wird daher für Cohen-Syndrom ein *loss-of-function* des Proteins als Pathomechanismus vermutet. Aus Studien zu anderen genetischen Erkrankungen ist bekannt, dass neben den *loss-of-function*-Varianten auch *missense*-Varianten zum Vollbild einer Erkrankung führen können (142, 143). Zu den möglichen Auswirkungen von *missense*-Varianten zählen Veränderungen der Stabilität, der Funktion, der Lokalisation und der Proteininteraktion des resultierenden Proteins (71, 144). Bei Formen der geistigen Behinderung wurden beispielsweise in *CLIC2* *missense*-Varianten identifiziert, die die Stabilität des exprimierten Proteins erhöhen und somit dessen Exozytose verhindern (145).

Die in dieser Arbeit untersuchten nsSNV in *COH1* wurden bei auffälligen Patienten identifiziert, bei denen klinisch der Verdacht auf das Cohen-Syndrom geäußert wurde. Zudem fielen drei der nsSNV im Rahmen einer Autismus-GWAS auf (2, 6-12). Im Gegensatz zu den häufigeren *nonsense*- und *frameshift*-Varianten ist die Frage der Pathogenität für die *missense*-Varianten komplexer. Mögliche Effekte wären eine hypomorphe Dynamik (Haploinsuffizienz) mit reduzierter Expression, unveränderte Expression bei Funktionsverlust durch Beteiligung funktioneller Domänen oder proteolytische Degradierung des fehlerhaften Proteins (146). nsSNV mit alternierendem Effekt auf die Proteinfunktion können zudem wichtige Hinweise auf Proteindomänen und Interaktionsverhalten geben.

Die Identifikation pathogener nsSNV hat ebenso klinische Konsequenzen. Ist eine nsSNV als kausal für eine Erkrankung definiert, gilt dies häufig als beweisend für eine Diagnose mit Kon-

sequenzen in Therapie und humangenetischer Beratung. Gerade bei klinisch heterogenen Syndromen wie dem Cohen-Syndrom kann eine solche scheinbar gendiagnostisch gesicherte Diagnose bei irrtümlicher pathogener Bewertung der nsSNV zu einer entsprechend verzögerten korrekten Diagnosestellung führen. Unklare nsSNV sind demnach entweder als solche auszuweisen, oder nach standardisierten Kriterien zu beschreiben. Einen solchen Kriterienkatalog bieten die *ACMG-Standards and Guidelines* zur Interpretation von Sequenzvariationen (72).

4.1 Zusammenfassende Bewertung der Dignität der COH1-*missense*-Varianten

4.1.1 Ala590Thr

Die nsSNV c.1768G>A (p.Ala590Thr) liegt in Exon 13 (6). Die SNV liegt bei der Patientin heterozygot vor, klinisch zeigte sich ein mäßig ausgeprägter Phänotyp. Der Vater ist symptomloser Träger, die weitere Familienanamnese unauffällig. Gendiagnostisch erfasst wurde die COH1-*missense*-Variante mittels klassischer Sanger-Sequenzierung. Die MAF nach der GnomAD-Datenbank ist > 0,001. Zudem konnte eine andere SNV am gleichen Aminosäure-Locus mit einer MAF von 0,00001 erfasst werden. Beide Ergebnisse deuten auf eine erhöhte Variabilität des Locus hin. In 5 von 7 Prädiktionsalgorithmen wird die SNV als neutral eingestuft. *In vitro* zeigte sich in Überexpression sowie dem RNAi-*rescue*-Experiment eine wildtyp-ähnliche subzelluläre Lokalisation. Das Membranbindungsverhalten zeigte sich ebenfalls unauffällig. Für die Substitution Ala590Thr zeigte sich zusammenfassend ein mildes klinisches Bild mit benignen *in silico* und *in vitro* Befunden. Die Variante p.Ala590Thr kann laut meiner Untersuchung mit einem geringen pathologischen Potential bewertet werden. Dass die Variante eine bisher unbekannte protein-biochemische Veränderung hervorruft, kann nicht ausgeschlossen werden. Hier empfiehlt sich eine weitere genetische Diagnostik unter Einschluss des familiären Umfelds. Dabei sollte der Ausschluss Cohen-Syndrom-ähnlicher Syndrome erfolgen und Methoden zur Detektion von genomischen Ungleichgewichten (*array*-CGH, MLPA) bzw. großer genomischer Deletionen bzw. Insertionen (NGS) angewandt werden.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
BS1, BS3, BP1, BP4	Benigne (≥ 2 BS)

4.1.2 Ser824Ala

Die nsSNV c.2470T>G (p.Ser824Ala) liegt in Exon 17 (7). Die SNV liegt homozygot vor und wurde im Rahmen einer Autismus-*GWAS* mittels NGS detektiert und mit Sanger-Sequenzierung bestätigt. Das klinische Bild ist mit primär autistisch-mentaler Störung für das Cohen-Syndrome untypisch. Die MAF ist mit > 0,0001 erhöht, in einem der Fälle homozygot. An der gleichen Aminosäureposition konnten nach GnomAD-Daten zwei weitere SNV mit einer MAF

von 0,0001 und 0,00001 dokumentiert werden. Keiner der verwendeten Prädiktionsalgorithmen klassifizierte die Substitution als pathogen. Experimentell zeigten sich in Überexpression, *rescue* nach RNAi und Membranbindungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp-COH1 keine Auffälligkeiten. Die SNV p.Ser824Ala ist aktuell als benigne einzustufen. Dass die Variante eine bisher unbekannte protein-biochemische Veränderung hervorruft kann nicht ausgeschlossen. Die Autoren der initialen Studie diskutieren die Möglichkeit einer hypomorphen *COH1-missense*-Variante, die mit einer Funktionsminderung von COH1 und einem primär neurologisch ausgeprägtem Cohen-Syndrom einhergehen könnte. Experimentell konnte in dieser Arbeit keine funktionelle Alteration bestätigt werden. Die Hinterfragung der Diagnostik sowie weitere Experimente zu den Auswirkungen der *missense*-Variante auf die Neurogenese und -funktionalität sind notwendig, um eine klare Abgrenzung zu schaffen.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
BS1, BS3, BP1, BP4	Benigne (≥ 2 BS)

4.1.3 Thr1289Ser

Die nsSNV c.3866C>G (p.Thr1289Ser) liegt in Exon 17 (8). Die SNV liegt *compound*-heterozygot mit einer großen Deletion auf dem maternalem Chromosom und einer Insertion auf dem gleichen Allel vor. Die Detektion erfolgte mittels NGS und Sanger-Sequenzierung. Der klinische Phänotyp ist bei jungem Patientenalter eingeschränkt auswertbar. Die MAF nach GnomAD-Daten ist > 0,0005, zusätzlich ist in gleicher Aminosäureposition eine synonyme SNV mit einer MAF von 0,000001 dokumentiert. 5 der 7 Prädiktionsalgorithmen prognostizieren keinen pathogenen Effekt auf die Proteinfunktion. Derzeit ist eine funktionelle Charakterisierung der SNV nicht möglich, da die Mutagenese-PCR und anschließende Klonierung des entsprechenden Vektors bislang nicht erfolgreich durchgeführt werden konnten. Die Einstufung nach ACMG erfolgte ohne experimentelle Daten und kann für die *missense*-Variante p.Thr1289Ser derzeit als wahrscheinlich benigne festgehalten werden. Aufgrund der großen Deletion auf dem maternalen Allel kann von einer gesicherten Diagnose des Cohen-Syndroms ausgegangen werden. Für die humangenetische Beratung bei Kinderwunsch sollte bedacht werden, dass auf dem paternalem Allel die kausale Ursache für Cohen-Syndrom möglicherweise nicht identifiziert wurde.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
BS1, BP1, BP4	Wahrscheinlich benigne (1 BS und 1 BP)

4.1.4 Ile1611Asn

Die nsSNV c.4832T>A (p.Ile1611Asn) liegt in Exon 31 (9). Die homozygot vorliegende SNV wurde mittels Sanger-Sequenzierung bei zwei Geschwistern (Zwillinge) dokumentiert. Es lag

mit 6 von 8 bewerteten Merkmalen ein typischer Cohen-Syndrom-Phänotyp vor. Die SNV ist nicht in der GnomAD-Datenbank gelistet. 6 von 7 Prädiktionsalgorithmen bewerten die Substitution als pathogen. Experimentell zeigte sich in der Überexpression und im RNAi-*rescue* keine Kolokalisation am GA bzw. Rekonstituierung des GA. In der Membranpräparation zeigte sich eine deutlich reduzierte Membranbindungsfähigkeit von COH1 p.Ile1611Asn. Zusammenfassend deuten sowohl die *in silico* als auch die *in vitro*-Daten auf einen Funktionsverlust von COH1 hin. Die SNV ist als wahrscheinlich pathogene *missense*-Variante nach ACMG für das Cohen-Syndrom zu bewerten.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
PS3, PM2, PP1, PP3	Wahrscheinlich pathogen (1 PS und 1 PM)

4.1.5 Leu2168Arg

Die nsSNV c.6503T>G (p.Leu2168Arg) liegt in Exon 37 (2). Der Patient wies einen klassischen finnischen Cohen-Syndrom-Phänotyp auf. Nach Sanger-Sequenzierung zeigte sich im anderen Allel eine *frameshift*-Variante mit darauffolgendem PTC, so dass die SNV *compound*-heterozygot vorliegt. Laut Autoren war diese SNV nicht in 304 Kontrollindividuen zu finden. In der GnomAD-Datenbank ist diese Variante nicht gelistet. 5 von 7 Prädiktionsalgorithmen bewerten die Substitution als pathogen, ein Algorithmus als wahrscheinlich pathogen. Experimentell zeigte sich eine diffuse subzelluläre Morphologie ohne Lokalisation an den GA, ohne *rescue* nach RNAi und mit reduzierter Membranbindung. Zusammenfassend lässt sich die Substitution p.Leu2168Arg als wahrscheinlich pathogene *missense*-Variante in COH1 einstufen.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
PS3, PM2, PP3	Wahrscheinlich pathogen (1 PS und 1 PM)

4.1.6 Tyr2316Cys

Die nsSNV c.6947A>G (p.Tyr2316Cys) liegt in Exon 39 (10). Bei der betroffenen Patientin lag die SNV *compound*-heterozygot mit einem PTC im anderen Allel vor. Die Detektion beider Veränderungen erfolgte mit der Sanger-Sequenzierung. Der klinische Phänotyp ist bei jungem Patientenalter eingeschränkt auswertbar. Das Allel ist in der GnomAD-Datenbank einmalig dokumentiert. Für die Substitution p.Tyr2316Cys sagen alle 7 Prädiktionsalgorithmen einen schädigenden Effekt vorher. Zudem liegt der Substitution p.Tyr2316Cys mit einem Grantham-*score* von 194 eine große physiko-chemische Differenz zugrunde. In der Immunofluoreszenz zeigte sich in der Überexpression und dem RNAi-*rescue*-Experiment ein diffuses zytoplasmatisches Signal von COH1_p.Tyr2316 ohne Lokalisation an den GA. Die Membranbindung war reduziert. Angesichts der konsistenten Ergebnisse scheint es sich bei dieser SNV um eine pathogene *missense*-Variante zu handeln.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
PS3, PM2, PP3	Wahrscheinlich pathogen (1 PS und 1 PM)

4.1.7 Gly2620Asp

Die nsSNV c.7859G>A (p.Gly2620Asp) liegt in Exon 43 (11). Die homozygote SNV wurde bei 3 Geschwistern mit typischer Cohen-Syndrom-Dysmorphie mittels Sanger-Sequenzierung beschrieben. Die klinische Erfassung war unvollständig, so dass essentielle Merkmale (Bewegungsapparat, mentaler Status, Entwicklung) nicht beurteilt werden können. Die SNV ist in der GnomAD-Datenbank nicht dokumentiert. In 6 der 7 Prädiktionsalgorithmen gilt die Substitution als pathogen. Experimentell zeigte sich keine Lokalisation an den GA oder *rescue* nach COH1-RNAi in der Immunofluoreszenz. Die Membranbindung war reduziert. Zu den *in silico*- und *in vitro*-Hinweisen spricht auch die hohe familiäre Kosegregation für eine Pathogenität der SNV im Sinne einer pathogenen Variante.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
PS3, PM2, PP1, PP3	Wahrscheinlich pathogen (1 PS und 1 PM)

4.1.8 Gly2704Arg

Die nsSNV c.8110G>A (p.Gly2704Arg) liegt in Exon 45 (7). Die Erfassung der SNV erfolgte bei initial unbekannter Diagnose im Rahmen eines NGS-Autismus-Screenings. Das Allel lag heterozygot mit einer *nonsense*-Variante vor. Der Patient zeigte eine typische Dysmorphie und eine autistische Störung. Die weitere klinische Erfassung war unvollständig. In der GnomAD-Datenbank wurde die SNV für ein Allel annotiert. Alle 7 verwendeten Prädiktionsalgorithmen prognostizierten einen pathogenen Effekt der Substitution. In der Immunofluoreszenz zeigte sich bei Überexpression der COH1-Mutante keine Lokalisation an den GA und kein *rescue* nach RNAi. Die Membranbindung war vermindert. Zusammenfassend stellt sich die nsSNV *in silico* und *in vitro* als funktionsalternierende pathogene *missense*-Variante dar. Als Besonderheit zeigt sich hier die führende autistische Symptomatik. Gründe können, vergleichbar mit der Substitution p.Ser824Ala, eine erhaltene Restfunktionalität im Sinne einer hypomorphen *missense*-Variante sein, die einen primär neurogenetischen/-funktionellen Effekt vermitteln.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
PS3, PM2, PP1, PP3	Wahrscheinlich pathogen (1 PS und 1 PM)

4.1.9 Ser2748Leu

Die nsSNV c.8243C>T (p.Ser2748Leu) liegt in Exon 45 (12). Die SNV wurde bei drei Mitgliedern zweier teils konsanguiner Familien mit hoher Kosegregation mittels Sanger-Sequenzierung dokumentiert. Es zeigte sich eine mittlere Ausprägung des Phänotyps. Die SNV ist in der

GnomAD-Datenbank nicht erfasst. An gleicher Aminosäureposition wurde eine synonyme SNV mit einer AF von 0,0001 dokumentiert. In 6 von 7 Algorithmen gilt die Substitution als pathogen. Experimentell zeigte sich eine zum COH1-wt veränderte Lokalisation nach Überexpression und fehlende Restrukturierung des GA im RNAi-*rescue*-Experiment. Die Membranbindung zeigte sich reduziert. Für die Substitution p.Ser2748Leu zeigte sich ein konsistentes Bild der Klinik, des Vererbungsmusters, *in silico* und *in vitro*, das vereinbar mit einer pathogenen *missense*-Variante im Sinne des Cohen-Syndroms ist.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
PS3, PM2, PP1, PP3	Wahrscheinlich pathogen (1 PS und 1 PM)

4.1.10 Ile2795Thr

Die nsSNV c.8385C>T (p.Ile2795Thr) liegt in Exon 46 (13). Die SNV wurde bei 8 Mitgliedern zweier amischer Familien beschrieben. Der Nachweis erfolgte mittels Sanger-Sequenzierung, die im zweiten Allel eine *frameshift*-Variante mit PTC offenbarte. Die Betroffenen zeigten klinisch ausgeprägte Merkmale des Cohen-Syndroms. In der GnomAD-Datenbank ist das Allel nicht gelistet. Die Auswertung mit den Prädiktionsalgorithmen zeigte eine benigne Wertung nur von einem der Methoden (Mutpred2). Experimentell zeigten sich in Überexpression, *rescue* nach RNAi, und Membranbindungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp-COH1 keine Auffälligkeiten. Es besteht demnach für diese SNV eine Diskrepanz zwischen dem eindeutigen klinischen Phänotypus, ambivalentem *in silico*-Befund und einem unauffälligen experimentellen Bild. Ein möglicher Grund könnten hier mit klassischer Sanger-Sequenzierung nicht detektierbare zusätzliche Veränderungen in dem *COH1*-Allel sein; dagegen spricht eine hohe familiäre Kosegregation. Weiterhin ist es denkbar, dass es sich um andersartige Funktionsveränderungen von COH1 handelt, die mit den verwendeten Methoden nicht darstellbar sind.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
PP1, PP3, BS3, BP1	Unklare Signifikanz (widersprüchliche Kriterien)

4.1.11 Asn2968Ser

Die nsSNV c.8903A>G (p.Asn2968Ser) liegt in Exon 49 (14). Die SNV lag homozygot bei einem Zwillingspärchen mit ausgeprägtem Cohen-Phänotyp vor. Beide Betroffene erfüllten bis auf die autistische Störung alle 8 gewerteten Merkmale. In der GnomAD-Datenbank zeigte sich jedoch mit einer Allelfrequenz von > 0,003 eine Häufung der SNV mit europäischem Schwerpunkt, aber insgesamt internationaler Verteilung. Dieser Befund widerspräche dem Prinzip der negativen Selektion bei pathogenem Effekt der Veränderung. In der Prädiktion zeigte sich ein eindeutiges Bild mit pathogenem Effekt bei 5 von 7 Algorithmen. Experimentell zeigten sich

in Überexpression, *rescue* nach RNAi und Membranbindungsverhalten im Vergleich zum Wildtyp-COH1 keine Auffälligkeiten. Auch hier zeigte sich demnach eine Diskrepanz zwischen dem ausgeprägtem klinischen Bild und der molekularen Analyse. Insbesondere die hohe Allelfrequenz und die *in vitro*-Ergebnisse widersprechen einer starken Pathogenität der SNV. Denkbar wären auch in der Sanger-Methode nicht-detektierte zusätzliche Veränderungen in *COH1*. Für die humangenetische Beratung und bei weiterem Kinderwunsch wird eine fortführende genetische Diagnostik unter Einschluss des familiären Umfelds empfohlen. Dabei sollte der Ausschluss Cohen-Syndrom-ähnlicher Syndrome erfolgen und Methoden, die die Detektion von genomischen Ungleichgewichten (*array*-CGH, MLPA) bzw. numerischer Abberationen erlauben, angewandt werden.

Erfüllte ACMG-Kriterien	Beurteilung (Regel nach ACMG)
BS1, BS3, PP1, PP3	Unklare Signifikanz (widersprüchliche Kriterien) / Benigne (≥ 2 BS)

4.1.12 Ser3303Arg und Ala3691Thr

Die nsSNV c.9907A>C (Exon 54, p.Ser3303Arg) und c.11071G>A (Exon 58, p.Ala3691Thr) liegen *compound*-heterozygot bei einem Patienten vor (7). Der Phänotyp erscheint Cohen-Syndrom typisch, da 4 von 5 Merkmalen erfüllt sind. Zusätzlich lag eine autistische Störung vor. Die Erfassung erfolgte im Rahmen eines NGS-Autismus-Screenings. Die MAF in der GnomAD-Datenbank ist für p.Ala3691Thr > 0,0004. Die Variante p.Ser3303Arg ist nicht in der GnomAD-Datenbank erfasst. Prädiktiv wird Ser3303Arg mit 6/7 und Ala3691Thr mit 5/7 Algorithmen als pathogen eingestuft. Derzeit ist eine funktionelle Charakterisierung der SNV nicht möglich, da die Mutagenese-PCR und anschließende Klonierung der entsprechenden Vektoren bislang nicht erfolgreich durchgeführt werden konnte. Damit ergibt sich nach ACMG eine unklare Signifikanz.

Erfüllte ACMG-Kriterien		Beurteilung (Regel nach ACMG)
Ser3303Arg	PM2, PP3	Unklare Signifikanz (widersprüchliche Kriterien)
Ala3691Thr	BS1, PP3	

4.2 Literatur und *in silico* Analytik der COH1-missense-Varianten

Aufgrund strenger ethischer Vorschriften zur Gewinnung und Verwendung patientenspezifischen Materials zur Forschung standen für diese Arbeit keine Gewebeproben oder Zellkulturen

von Cohen-Syndrom-Patienten mit *missense*-Varianten zur Verfügung. Die in der Literatur dokumentierten nsSNV müssen als gegeben angenommen werden und entziehen sich weiterer genotypischer Charakterisierung.

8 der 13 nsSNV wurden ausschließlich mit der konventionellen Sanger-Sequenzierung detektiert. Gut dokumentiert sind die Schwächen der Sanger-Sequenzierungsmethode bei Exon-übergreifenden Veränderungen (147). Für die hier untersuchten SNV ist daher nicht vollständig auszuschließen, dass als kausale Ursache für die Ausprägung des Cohen-Syndroms nicht detektierte mittlere und große Deletionen, Insertionen, Inversionen oder große CNVs vorliegen (5, 74). Alle SNV, die in GWAS gefunden wurden, wurden mittels Sanger-Sequenzierung validiert, um das Risiko einer falsch-positiv-Detektion der NGS-Methoden zu minimieren (148).

4.3 Quantitative Bewertung

Zur quantitativen Analyse von SNV in Genen stehen Datenbanken zur Verfügung, die protein-kodierende Sequenzdaten von gesunden oder erkrankten Individuen aggregieren und vergleichend analysieren. Derartige Datenbanken sind z.B. die NHLBI Exome Sequencing Project (ESP), das 1000 Genome Project, Sequencing Initiative Suomi (SISu) und viele mehr.

Die bis dato umfassendste Datenbank ist GnomAD mit 123,136 Einträgen (Version r2.0.2, Veröffentlichungsdatum 03.10.2017) (149). Die Datenbank verwendet die HGVS-Nomenklatur zur Beschreibung der Sequenzvariationen. In GnomAD sind die Daten verschiedener Kontrollkohorten aggregiert. Diese Kontrollen im Alter von 20-40 Jahren wurden als „gesund“ bewertet. Unter diesen Individuen können sich Träger von Erberkrankungen mit späterer Manifestation befinden. Somit gilt für die Auswertung der Vorbehalt, dass es sich nicht um einen randomisierten Querschnitt einer Population oder phänotypisch unauffälliger Menschen handelt. Explizit ausgeschlossen wurden Daten von Verwandten und von Individuen mit schweren pädiatrischen Erkrankungen.

Für diese Arbeit wurden SNV mit *missense*-Varianten bei einer niedrigen MAF im *COHI*-Transkript ENST00000357162 ausgewählt. Aus initial 3057 gelisteten SNV wurden für *COHI* in der GnomAD-Datenbank 1226 *missense*-Varianten mit einer MAF < 0,001 gefunden. Die MAF ist evolutionstheoretisch und -empirisch ein wichtiger Marker. Gemäß der negativen Selektion monogenetischer Erkrankungen wird die Frequenz schädigender Allele einer Population reduziert. Eine hohe MAF spricht demnach gegen einen schädigenden Effekt. Eine niedrige MAF lässt jedoch im Umkehrschluss nicht unmittelbar auf eine genetische Erkrankung schließen, da auch stumme Spontanveränderungen möglich sind. Zusätzlich wurden zur Bewertung der genetischen Variabilität andere SNV erfasst, die die entsprechende Aminosäureposition be-

treffen. Dieser Analyse lag erneut die Annahme zugrunde, dass bei erhöhter Variabilität (erhöhter SNV-MAF) eine funktionelle Relevanz unwahrscheinlicher ist. Grundsätzlich sind nicht-synonyme (*missense*-) Punktvarianten mit einer höheren Wahrscheinlichkeit für eine Funktionsveränderung assoziiert (150).

4.4 Qualitative Analyse mittels Prädiktionsalgorithmen

Für das COH1-Protein sind aktuell nur Vorhersagen der primären und sekundären Proteinstruktur möglich. Es liegen keine tertiären oder quartären Strukturinformationen vor. Insbesondere Analysen zur Proteininstabilität, Wasserstoffbrückenbindung und Ladungsverteilung entziehen sich somit der Beurteilbarkeit. Zur *in silico*-Vorhersage der Aminosäureveränderungen wurden 7 verschiedene Prädiktionsalgorithmen verwendet. Gemeinsame Kriterien der Algorithmen sind der biochemische Effekt des Aminosäureaustauschs, der Konservierungsgrad des Sequenzabschnittes und der Ort der Sequenzveränderung. Letzteres ist erschwert durch aktuell noch nicht vorhandene Daten bezüglich der Sekundär- und Tertiärstrukturen bzw. funktionelle Domänen von COH1. Ausgabewerte der Algorithmen sind Prädiktionscores, denen grenzwertabhängig eine Eigenschaft (schädigend, moderat, neutral) zugeordnet wird. Die Verfahren unterscheiden sich in Nomenklatur (z.B. *deleterious* vs. *pathogen*, *benign* vs. *neutral*, etc.) und Differenzierung (teils in vier Stufen, teils binär). Basierend auf den Effekten bekannter *missense*-Varianten konnte eine Genauigkeit der verwendeten Algorithmen von 60-82% bestimmt werden (138). Grundsätzlich haben die Resultate von Prädiktionsalgorithmen stark putativen Charakter, so dass deren Evidenz nach dem ACMG-Richtlinien nur als *supporting* („unterstützend“) gewertet wird (72). Zudem können die Ergebnisse der Algorithmen nicht als vollständig unabhängig gelten, da sie teilweise auf ähnlicher oder sogar identischer methodischer und statistischer Grundlage basieren. Auffällig in dieser Arbeit war, dass nach SNPs&GO nur 2/13 SNV pathogen und nach Mutationtaster nur 1/13 SNV benigne waren. Beide Verfahren stehen damit in deutlichem Gegensatz zu den übrigen und lassen vermuten, dass aus methodischen Gründen deren Aussage für SNV in *COH1* eingeschränkt ist. Angesichts der steigenden Anzahl von NGS/GWAS-Daten mit assoziierten nsSNV sind jedoch validierte Prädiktionsalgorithmen im Rahmen der Selektion relevanter Veränderungen wichtig. In drei der COH1-SNV zeigte sich eine Diskrepanz zwischen der prädiktiven und experimentellen Bewertung (p.Ala590Thr, p.Ile2795Thr, p.Asn2968Ser). Algorithmen, die die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine berücksichtigen (z.B. nsSNPAnalyzer, ERIS, Clustal, ConSurf, I-Tasser, SuperPose, ClusPro), konnten mangels Informationen diesbezüglich für COH1 nicht verwendet werden.

4.5 Phänotypen der Patienten

Bis dato wurden 13 *COH1*-nsSNV bei Cohen-Syndrom-Patienten beschrieben. Mangels einheitlicher diagnostischer Kriterien sind die zusammengefassten Symptome aufgrund teils unvollständiger und unpräziser Diagnostik lückenhaft. Einige Merkmale sind zudem zeitabhängig, so dass ein einmaliges Assessment unzureichend ist. Dazu gehört die zyklische Neutropenie, die abhängig vom Blutentnahmezeitpunkt, mit einer singulären Abnahme nicht auszuschließen ist. Die Retinitis pigmentosa manifestiert sich erst im fortgeschrittenen Alter, so dass bei sehr jungen Patienten (<4 Jahre, s. p.Thr1289Ser, p.Tyr2316, p.Gly2620Asp, p.Ser2748Leu) der Fundusbefund unauffällig sein kann. In der amischen Kohorte waren aufgrund der religiös-kulturellen Disposition nicht alle Untersuchungen durchführbar (13). Drei der nsSNV in *COH1* wurden im Rahmen eines Autismus-Screenings sequenziert. Die Betroffenen waren zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht mit dem Cohen-Syndrom diagnostiziert. Das Leitsymptom dieser Studie, der Autismus, zählt nicht zu den essentiellen Kriterien des Cohen-Syndroms und ist nur bei einer Minderheit der Patienten ausgeprägt. So ist in der großen finnischen Cohen-Syndrom Kohorte kein einziger Fall beschrieben. Somit ist es möglich, dass es sich um isolierten Autismus oder ein Cohen-ähnliches Syndrom mit Autismus handelt.

4.6 Etablierung der Mutagenese-PCR und Klonierung der Expressionsvektoren

Mangels patientenspezifischer Zellkulturen mussten zur *in vitro*-Analytik Konstrukte hergestellt werden, die den veränderten kodierenden Abschnitten entsprechen. Die ubiquitär exprimierte Isoform des humanen *COH1*, NM_152564, ist mit einer Länge von 3997 AS (entsprechend 14019 bp der cDNA) deutlich größer als der Durchschnitt aller Proteine. Dieser beträgt nach der UniProtKB/TrEMBL-Datenbank aktuell 337 AS (Stand: 07/2018). Durch seine beträchtliche Größe stellt die funktionelle Charakterisierung von *COH1* mit molekulargenetischen und proteinbiochemischen Methoden eine besondere Herausforderung dar.

Aus vorangegangenen Experimenten lagen bereits *COH1*-wt Konstrukte vor, die als Ausgangsvektoren für die in dieser Arbeit erstellten *COH1*-SNV Konstrukte dienten. Initial wurde eine *overlap-PCR* angestrebt (151). Dazu wurde in einer ersten PCR ein SNV-tragendes *Insert* amplifiziert, dessen 3'- und 5'-Enden Vektor-komplementäre Sequenzen trugen. Nach Denaturierung der *Template*-Vektoren wurden diese mit den *Inserts* hybridisiert und erneut amplifiziert. Zur Optimierung der Methode wurden sowohl die Primer in Position und Länge als auch DNA-Polymerasen mit unterschiedlicher Synthese- und Korrekturaktivität variiert. Trotz initial vielversprechender Ergebnisse gelang es mit dieser Methode nicht, die gewünschten Expressionsvektoren zu erstellen.

Die alternative Plasmid-Mutagenese-Methode besteht aus nur einer PCR-Amplifikation (152). Die Primer tragen dabei die SNV, sind ansonsten zur Plasmid-Sequenz homolog und hybridisieren daher. Zur Extension wurde die Phusion-Polymerase verwendet, die über eine hohe 3'->5'-Exonukleaseaktivität und Korrekturlese-Funktion verfügt. Optimiert wurden zudem die PCR-Zyklusanzahl und Elongationszeit. Mit dieser Methode gelang es, 9 der COH1-SNV Konstrukte erfolgreich zu klonieren. In einem Fall konnten in der abschließenden Kontroll-Sequenzierung des Konstruktes zwei der SNV in einem Plasmid (p.Gly2620Asp und p.Asn2968Ser) nachgewiesen werden. Ein zufälliger Synthesefehler der Polymerase kann wegen der geringen Wahrscheinlichkeit am ehesten ausgeschlossen werden. Wahrscheinlicher scheint es zu einer Kontamination der PCR-Ansätze mit 2 weiteren Primer-Paaren in einer Reaktion und folgend zur Klonierung einer Doppelmutation gekommen zu sein. Da es im Verlauf nicht gelang, eine der in der Doppelmutante vorliegenden *SNV* singularär zu klonieren, wurde auch dieses Konstrukt experimentell ausgewertet. In der Überexpression und dem RNAi-Rescue der Doppelmutante p.Gly2620Asp+p.Asn2968Ser kam es weder zur GM130-Kolokalisation, noch zum GA-Rescue. Das spricht für einen pathogenen Effekt der SNV p.Gly2620Asp.

Drei der COH1-SNV Konstrukte konnten trotz mehrmaliger Primer- und Methodenvariation nicht kloniert werden.

4.7 Fragmentierung des Golgi-Apparates bei COH1-Defizienz

Die kompakte Zisternen-Struktur des Golgi-Apparates in tierischen Zellen wird durch GRASP- und Golgin-Strukturproteine vermittelt. Eine Auflösung dieser kompakten Struktur wird als Fragmentierung des Golgi-Apparates bezeichnet und erfolgt physiologisch bei der Mitose, Apoptose und grundsätzlich in pflanzlichen Zellen (153). Weiterhin scheint die Fragmentierung eine unspezifische Reaktion auf pharmakologischen und oxidativen Stress zu sein (154). Bei neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und der amyotrophen Lateralsklerose wurden bereits in frühen Stadien eine Fragmentierung der Golgi-Morphologie beschrieben (155, 156). *In vitro*-Experimente zeigten funktionelle Auswirkungen der Fragmentierung mit a) Nocodazol auf den anterograden Transport großer Proteine (157) und im b) GRASP-siRNA-*knockdown* auf die korrekte Glykosylierung, Sortierung und Verteilung der Proteine (158).

In Fibroblasten von Cohen-Syndrom-Patienten und nach COH1-RNAi-Experimenten konnte eine Fragmentierung des Golgi-Apparates gezeigt werden (3). Diese Ergebnisse konnten im Rahmen dieser Arbeit in Experimenten mit transientser *siRNA*-Transfektion bestätigt werden. Dabei wurden 4 unabhängige *siRNAs* in HeLa-, Hek293- und NIH3T3-Zellkulturen verwendet. Als negativ-Kontrollen wurde stets eine *nonsense scramble-siRNA* transfiziert und untransfi-

zierte Kultur untersucht. Der Effekt der RNAi wurde mittels RT-PCR quantifiziert. In der Auswertung zeigte sich ein deutlicher Unterschied der COH1-mRNA-Expression zwischen den verschiedenen *siRNAs*. Für weitere Experimente wurde die *siRNA* mit der deutlichsten Senkung der COH1-Expression verwendet.

In einem zweiten Schritt wurde eine morphometrische Analyse der GA-Fragmentierung mittels Immunofluoreszenz durchgeführt. Die Auswahl der Zellkulturen richtete sich nach einer hohen Transfektionsrate, Reduktion der Proteinexpression und einer intrinsisch kompakten Golgi-Morphologie. Ausgeschlossen von der Auswertung wurden Zellen, die sich zum Zeitpunkt der Fixierung in Mitose befanden und/oder einen auf eine Apoptose hinweisenden Phänotyp aufwiesen.

Eine mögliche Fehlerquelle bei transienten RNAi-Experimenten sind *off-target* Effekte der *siRNA*. Diese haben zum Teil toxische Wirkung und können Auswirkungen auf die Expression anderer Proteine haben (159) (160). Eine erhöhte Apoptoseneigung aufgrund der Toxizität hätte direkte Konsequenzen auf die dann veränderte Golgi-Morphologie. Anhand der negativ-Kontrollen konnte der Effekt des Transfektionsagens abgeschätzt werden.

Die gezeigte signifikante Erhöhung der Golgi-Fragmente nach RNAi bestätigt einen Einfluss von COH1 auf die Strukturintegrität des Golgi-Apparates.

4.8 Intrazelluläre Lokalisation der COH1-Mutanten

4.8.1 Transiente Transfektion der COH1-Konstrukte

COH1 interagiert mit dem Golgi-Matrix-Protein GM130. Diese Bindung scheint zudem von bis dato unbekanntem Domänen am C-Terminus des Proteins vermittelt zu werden (3). In IF-Studien an kultivierten Fibroblasten von Cohen-Syndrom-Patienten mit bekannter *nonsense*-Variante konnte gezeigt werden, dass sowohl die kompakte Golgi-Struktur als auch die Kolo-kalisation mit GM130 und die Golgi-Assoziierung aufgehoben sind. Hypothese dieser Arbeit war nun, ein vergleichbares morphologisches Bild bei Expression der COH1-SNV Konstrukte zu beobachten.

Bedingung für eine gute Beurteilbarkeit waren auch hier eine hohe Transfektionsrate bei erhaltener Zellvitalität und eine kompakte GA-Morphologie in der spezifischen Zelllinie. Daher erfolgte zunächst die morphologische Analyse nativer Zellkulturen (HeLa, NIH3T3, MC3T3, B16F1, C2C12) mit IF-Färbung des GA mittels GM130 und RAB6. Die MC3T3, B16F1 und C2C12 Zellen wiesen einen aufgelockerten und in Relation zum Zytoplasma großen GA auf. Im Gegensatz dazu zeigten die HeLa- und NIH3T3-Zellen eine klar differenzierbaren, kom-

pakten und perinukleären GA. In Vergleichen mit den Transfektionagentien jetPEI und jet-PRIME zeigte sich eine Überlegenheit der Kombination von HeLa und jetPEI in der ermittelten Transfektionsrate, so dass diese Kombination auch im Verlauf verwendet wurde. Für die RNA-Interferenz-Experimente konnten mittels des Transfektionsagens INTERFERin in NIH3T3-Zellen ein COH1-*Knockdown* von etwa 90% erzielt werden.

Neben dem Referenzmarker GM130 wurden mit EEA1, Clathrin, Ubiquitin und LAMP1 weitere Marker des intrazellulären Golgi-*Trafficks* analysiert. Das Hüllprotein Clathrin und das Bindeprotein EEA1 sind an der Entstehung und dem Transport von frühen Endosomen beteiligt (161) (162). Ubiquitin ist Teil eines intrazellulären Regulationssystems (163).

Für keines der Proteine konnte in der IF-Färbung eine Kolokalisation mit COH1 festgestellt werden.

Zu Kontrolle wurden neben der transienten Transfektion der COH1-SNV Konstrukte in jeder Versuchsreihe stets auch native Zellen und eine Überexpression des COH1-wt Konstruktes untersucht. Die Daten zur Transfektion der COH1-SNV Konstrukte zeigen eine heterogene Verteilung des zytoplasmatischen COH1-Signals. Eine erfolgte Überexpression des Proteins konnte anhand der deutlich sichtbaren COH1-Signalzunahme im Vergleich zu benachbarten, nicht-transfizierten Zellen beurteilt werden.

Die COH1-SNV p.Ala590Thr, p.Ser824Ala, p.Ile2795Thr, p.Asn2986Ser zeigten im IF-Bild eine normale Anreicherung des COH1-Signals bei bekanntem intrinsischen Hintergrundsignal, die dem COH1-Wiltyp entspricht (3, 164).

Die übrigen COH1-SNV p.Ile1611Asn, p.Leu2168Arg, p.Tyr2316Cys, p.Gly2620Asp+p.Asn2968Ser, p.Gly2704Arg, p.Ser2748Leu zeigten ein diffuses und teils vesikuläres COH1-Signal ohne perinukleäre Anreicherung. Im Vergleich mit dem GM130 Signal konnte keine Lokalisation am GA beobachten werden. Die intakte Struktur des GA ist durch das vorhandene, intrinsische COH1 gewährleistet.

Unterschiede in der GA-Morphologie in Abhängigkeit vom transfizierten Konstrukt konnten in diesem Experiment nicht gefunden werden.

4.8.2 Transiente Transfektion der COH1-Konstrukte nach RNAi

Im *rescue* nach RNAi wurde die Fähigkeit der COH1-SNV untersucht, nach primärem *COH1-knockdown* mit konsekutiver GA-Fragmentierung die kompakte GA-Struktur wiederherzustellen. Dazu wurden zunächst in NIH3T3-Zellen nach *siRNA-knockdown* das COH1-wt Konstrukt überexprimiert. Hier zeigte sich die Rekonstituierung des GA im Vergleich zur untransfizierten Kontrolle. Vergleichbar mit den Ergebnissen aus 4.5.1 unterschieden sich auch hier zwei Gruppen. Die vier mit GM130-kolokalisierenden COH1-SNV p.Ala590Thr, p.Ser824Ala,

p.Ile2795Thr und p.Asn2986Ser vermittelten einen, mit dem COH1-wt vergleichbaren *rescue* nach RNAi. Zudem konnte die Kolo­kalisierung mit GM130 erneut nachgewiesen werden. Die COH1-nsSNV p.Ile1611Asn, p.Leu2168Arg, p.Tyr2316Cys, p.Gly2620Asp+p.Asn2968Ser, p.Gly2704Arg und p.Ser2748Leu erzeugten trotz detektierbarer Proteinexpression keinen sichtbaren *rescue* der GA-Fragmentierung. Durch Gegenfärbung mit GM130 konnte zudem keine räumliche Interaktion mit dem GA nachgewiesen werden.

Diese Experimente zeigten, dass vier der Substitutionen keinen Einfluss auf die strukturenbende Funktionalität von COH1 haben. Die subzelluläre Lokalisation und der Effekt im RNAi-*rescue*-Experiment unterscheiden sich in der Immunofluoreszenz nicht vom COH1-Wildtyp. In den übrigen Mutanten ist die räumliche und funktionelle Assoziation mit dem GA gestört, vergleichbar mit Befunden in Patienten-Fibroblasten mit COH1-*nonsense*-Varianten (3). Die nsSNV können somit Bereiche betreffen, die kritisch für die Interaktion mit Golgi-Strukturproteinen sind.

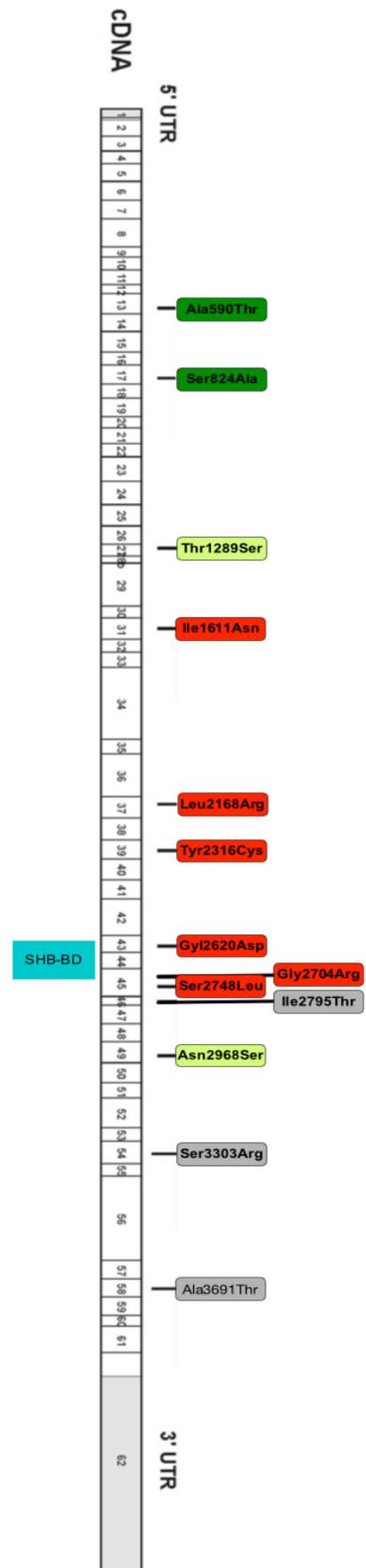
4.9 Membranbindung der COH1-SNV Proteine

Entgegen initialer Annahmen konnte bereits gezeigt werden, dass COH1 kein integrales, sondern ein peripheres Membranprotein ist (2, 3). Im Rahmen dieser Arbeit wurde das Membranbindungsverhalten der COH1-SNV untersucht. Methodisch war die Westernblot-Darstellung aufgrund des hohen Molekulargewichtes und des verhältnismäßig geringen Expressionsniveaus erschwert. Der COH1-Wildtyp wies eine Verteilung von 46,6% in der membrangebundenen und 53,4% in der zytosolischen Fraktion auf. In allen SNV zeigte sich eine Verminderung dieses Quotienten zugunsten der zytosolischen Fraktion. Am deutlichsten war diese Verschiebung auf unter 30% in den SNV p.1289Ser, p.Ile1611Asn, p.Leu2168Arg, p.Tyr2316Cys, p.Gly2620Asp+p.Asn2968Ser, p.Gly2704Arg und p.Ser2748Leu. Bei eingeschränkter statistischer Auswertbarkeit angesichts der hohen Standardabweichung ist dies ein Hinweis auf eine reduzierte Membranbindungsfähigkeit der Varianten.

4.10 Struktur- und Funktionsbeziehung

Anhang A2 gibt eine Übersicht über die putativen funktionellen Domänen der VPS13-Proteinfamilie. Für das Hefe-Analogon Vps13p gelang zudem mittels *single-particle* Elektronenmikroskopie eine 3D-Darstellung der Proteinarchitektur. Das Membranbindungsverhalten von Vps13p ist zudem von C- und N-terminalen Lipid-Bindungsdomänen abhängig (165). Alle VPS13-Proteine enthalten eine SHR-Bindungsdomäne. Varianten im pflanzlichen VPS13-Analogon SHBY, die ebenfalls die SHR-Bindungsdomäne tragen, führen zur einem eingeschränkten Längenwachstum in der Pflanzenart *Arabidopsis thaliana* (166). In der Zusammenschau des Malignitätspotentials und des Membranverhaltens der in diesen Arbeiten untersuchten SNV fällt eine Verteilung der eher benignen SNV C- bzw. N-Terminal an AS-Position p.590, p.824, p.1289 und p.2795, p.2968 auf. Die übrigen, hier eher maligne bewerteten CNVs liegen dazwischen (AS p.1611-2748, s.a. Abbildung 4.1). Eine mögliche Erklärung ist die Nähe zur SHR-Bindungsdomäne (AS 2603-2702, s. Abbildung 4.1) oder weiterer, noch unbekannter essentieller Domänen in diesem Proteinareal, die bei kleinster Abweichung einen funktionsverändernden Effekt haben. Zum anderen ist im Umkehrschluss denkbar, dass die C- und N-terminalen Abschnitte derart konserviert sind, dass funktionsverändernde SNV mit einem letalen Phänotypus einhergehen (z.B. durch *gain-of-function*), der eine Abbildungen der Allele im Genpool verhindert. Ausgehend von den vorliegenden Ergebnissen ist ein Rückschluss auf funktionsrelevante Domänen nicht möglich. Sollten in Zukunft Details zu der COH1-Struktur gewonnen werden, ist ein Abgleich mit den Ergebnissen dieser Arbeit sinnvoll.

Abbildung 4.1 Schematische Darstellung der *COH1*-cDNA mit Exon-Nummerierung. Position der nsSNV und Farbkodierung der Dignität: rot: wahrscheinlich pathogen, grün: benigne, hellgrün: wahrscheinlich benigne, grau: unklare Signifikanz. Lage und Größe der SHB-Bindungsdomäne türkis hinterlegt. Modifiziert nach Seifert et al. 2008.



4.11 Schlussfolgerungen und Ausblick

Die Charakterisierung von Sequenzvarianten wird in Zeiten zunehmender Datenmengen und Annotation einen steigenden Stellenwert einnehmen. In dieser Arbeit wurden die mit dem Cohen-Syndrom-assoziierten nsSNV in *COH1* funktionell *in vitro* und *in silico* charakterisiert. In einem Teil der Varianten zeigten sich Hinweise auf eine funktionelle Alteration im Vergleich mit dem WT-COH1, so dass ein pathogener Effekt plausibel scheint und somit in Einklang mit der Diagnose des Cohen-Syndroms steht. Für die übrigen nsSNV, die morphologisch ein unauffälliges Bild zeigten, stellt sich die Frage, ob bei den Patienten andere, im Rahmen der durchgeführten Diagnostik nicht erfasste Veränderung in *COH1* vorliegen. Ein anderer Grund könnte eine Funktionsveränderung der nsSNV sein, die nicht mit einer Golgi-Fragmentierung oder reduzierter Membranbindung einhergeht, also im Rahmen dieser Experimente nicht erfasst wurde. Zuletzt muss bei diesen Patienten auch die Diagnose des Cohen-Syndroms hinterfragt und differentialdiagnostisch Cohen-ähnliche Syndrome in Betracht gezogen werden.

Funktionsalterierende Varianten, die nicht zu einer Degradierung des Proteins führen, können ein Schlüssel zum Verständnis der Pathogenese genetischer Erkrankungen sein. Insbesondere pathogene Einzelnukleotidvarianten, die wie eine Stecknadel auf einer Landkarte einen sehr spezifischen Ort innerhalb eines Genes ausweisen, sind für die weitere humangenetische und molekulargenetische Aufarbeitung von großer Bedeutung.

5 Literatur

1. Cohen MM, Jr., Hall BD, Smith DW, Graham CB, Lampert KJ. A new syndrome with hypotonia, obesity, mental deficiency, and facial, oral, ocular, and limb anomalies. *J Pediatr.* 1973;83(2):280-4.
2. Kolehmainen J, Black GC, Saarinen A, Chandler K, Clayton-Smith J, Traskelin AL, Perveen R, Kivitie-Kallio S, Norio R, Warburg M, Fryns JP, de la Chapelle A, Lehesjoki AE. Cohen syndrome is caused by mutations in a novel gene, COH1, encoding a transmembrane protein with a presumed role in vesicle-mediated sorting and intracellular protein transport. *Am J Hum Genet.* 2003;72(6):1359-69.
3. Seifert W, Kuhnisch J, Maritzen T, Horn D, Haucke V, Hennies HC. Cohen syndrome-associated protein, COH1, is a novel, giant Golgi matrix protein required for Golgi integrity. *J Biol Chem.* 2011;286(43):37665-75.
4. Seifert W, Holder-Espinasse M, Kuhnisch J, Kahrizi K, Tzschach A, Garshasbi M, Najmabadi H, Walter Kuss A, Kress W, Laureys G, Loeys B, Brilstra E, Mancini GM, Dollfus H, Dahan K, Apse K, Hennies HC, Horn D. Expanded mutational spectrum in Cohen syndrome, tissue expression, and transcript variants of COH1. *Hum Mutat.* 2009;30(2):E404-20.
5. Parri V, Katzaki E, Uliana V, Scionti F, Tita R, Artuso R, Longo I, Boschloo R, Vijzelaar R, Selicorni A, Brancati F, Dallapiccola B, Zelante L, Hamel CP, Sarda P, Lalani SR, Grasso R, Buoni S, Hayek J, Servais L, de Vries BB, Georgoudi N, Nakou S, Petersen MB, Mari F, Renieri A, Ariani F. High frequency of COH1 intragenic deletions and duplications detected by MLPA in patients with Cohen syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2010.
6. Katzaki E, Pescucci C, Uliana V, Papa FT, Ariani F, Meloni I, Priolo M, Selicorni A, Milani D, Fischetto R, Celle ME, Grasso R, Dallapiccola B, Brancati F, Bordignon M, Tenconi R, Federico A, Mari F, Renieri A, Longo I. Clinical and molecular characterization of Italian patients affected by Cohen syndrome. *J Hum Genet.* 2007.
7. Yu TW, Chahrour MH, Coulter ME, Jiralerspong S, Okamura-Ikeda K, Ataman B, Schmitz-Abe K, Harmin DA, Adli M, Malik AN, D'Gama AM, Lim ET, Sanders SJ, Mochida GH, Partlow JN, Sunu CM, Felie JM, Rodriguez J, Nasir RH, Ware J, Joseph RM, Hill RS, Kwan BY, Al-Saffar M, Mukaddes NM, Hashmi A, Balkhy S, Gascon GG, Hisama FM, LeClair E, Poduri A, Oner O, Al-Saad S, Al-Awadi SA, Bastaki L, Ben-Omran T, Teebi AS, Al-Gazali L, Eapen V, Stevens CR, Rappaport L, Gabriel SB, Markianos K, State MW, Greenberg ME, Taniguchi H, Braverman NE, Morrow EM, Walsh CA. Using whole-exome sequencing to identify inherited causes of autism. *Neuron.* 2013;77(2):259-73.
8. Rivera-Brugues N, Albrecht B, Wiczorek D, Schmidt H, Keller T, Gohring I, Ekici AB, Tzschach A, Garshasbi M, Franke K, Klopp N, Wichmann HE, Meitinger T, Strom TM, Hempel M. Cohen syndrome diagnosis using whole genome arrays. *J Med Genet.* 2011;48(2):136-40.
9. El Chehadeh S, Aral B, Gigot N, Thauvin-Robinet C, Donzel A, Delrue MA, Lacombe D, David A, Burglen L, Philip N, Moncla A, Cormier-Daire V, Rio M, Edery P, Verloes A, Bonneau D, Afenjar A, Jacqueline A, Heron D, Sarda P, Pinson L, Doray B, Vigneron J, Leheup B, Frances-Guidet AM, Dienne G, Holder M, Masurel-Paulet A, Huet F, Teyssier JR, Faivre L. Search for the best indicators for the presence of a VPS13B gene mutation and confirmation of diagnostic criteria in a series of 34 patients genotyped for suspected Cohen syndrome. *J Med Genet.* 2010;47(8):549-53.
10. Hennies HC, Rauch A, Seifert W, Schumi C, Moser E, Al-Taji E, Tariverdian G, Chrzanowska KH, Krajewska-Walasek M, Rajab A, Giugliani R, Neumann TE, Eckl KM, Karbasiyan M, Reis A, Horn D. Allelic heterogeneity in the COH1 gene explains clinical variability in Cohen syndrome. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1):138-45.

11. Mochida GH, Rajab A, Eyaid W, Lu A, Al-Nouri D, Kosaki K, Noruzinia M, Sarda P, Ishihara J, Bodell A, Apse K, Walsh CA. Broader geographical spectrum of Cohen syndrome due to COH1 mutations. *J Med Genet.* 2004;41(6):e87.
12. Seifert W, Holder-Espinasse M, Spranger S, Hoeltzenbein M, Rossier E, Dollfus H, Lacombe D, Verloes A, Chrzanowska KH, Maegawa GH, Chitayat D, Kotzot D, Huhle D, Meinecke P, Albrecht B, Mathijssen I, Leheup B, Raile K, Hennies HC, Horn D. Mutational spectrum of COH1 and clinical heterogeneity in Cohen syndrome. *J Med Genet.* 2006;43(5):e22.
13. Falk MJ, Feiler HS, Neilson DE, Maxwell K, Lee JV, Segall SK, Robin NH, Wilhelmsen KC, Traskelin AL, Kolehmainen J, Lehesjoki AE, Wiznitzer M, Warman ML. Cohen syndrome in the Ohio Amish. *Am J Med Genet A.* 2004;128A(1):23-8.
14. Kolehmainen J, Wilkinson R, Lehesjoki AE, Chandler K, Kivitie-Kallio S, Clayton-Smith J, Traskelin AL, Waris L, Saarinen A, Khan J, Gross-Tsur V, Traboulsi EI, Warburg M, Fryns JP, Norio R, Black GC, Manson FD. Delineation of Cohen syndrome following a large-scale genotype-phenotype screen. *Am J Hum Genet.* 2004;75(1):122-7.
15. Carey JC, Hall BD. Confirmation of the Cohen syndrome. *J Pediatr.* 1978;93(2):239-44.
16. Sack J, Friedman E. Cardiac involvement in the Cohen syndrome: a case report. *Clin Genet.* 1980;17(5):317-9.
17. Friedman E, Sack J. The Cohen syndrome: report of five new cases and a review of the literature. *J Craniofac Genet Dev Biol.* 1982;2(3):193-200.
18. Goecke T, Majewski F, Kauther KD, Sterzel U. Mental retardation, hypotonia, obesity, ocular, facial, dental, and limb abnormalities (Cohen syndrome). Report of three patients. *Eur J Pediatr.* 1982;138(4):338-40.
19. North C, Patton MA, Baraitser M, Winter RM. The clinical features of the Cohen syndrome: further case reports. *J Med Genet.* 1985;22(2):131-4.
20. Kousseff BG. Cohen syndrome: further delineation and inheritance. *Am J Med Genet.* 1981;9(1):25-30.
21. Kondo I, Hamabe J, Yamamoto K, Niikawa N. Exclusion mapping of the Cohen syndrome gene from the Prader-Willi syndrome locus. *Clin Genet.* 1990;38(6):422-6.
22. Kondo I, Nagataki S, Miyagi N. The Cohen syndrome: does mottled retina separate a Finnish and a Jewish type? *Am J Med Genet.* 1990;37(1):109-13.
23. Norio R, Raitta C, Lindahl E. Further delineation of the Cohen syndrome; report on chorioretinal dystrophy, leukopenia and consanguinity. *Clin Genet.* 1984;25(1):1-14.
24. Norio R. Cohen syndrome is neither uncommon nor new. *Am J Med Genet.* 1994;53(2):202-3.
25. Kivitie-Kallio S, Norio R. Cohen syndrome: essential features, natural history, and heterogeneity. *Am J Med Genet.* 2001;102(2):125-35.
26. Okamoto N, Hatsukawa Y, Arai H, Goto M. Cohen syndrome with high urinary excretion of hyaluronic acid. *Am J Med Genet.* 1998;76(5):387-8.
27. Sack J, Friedman E. The Cohen syndrome in Israel. *Isr J Med Sci.* 1986;22(11):766-70.
28. Chandler KE, Kidd A, Al-Gazali L, Kolehmainen J, Lehesjoki AE, Black GC, Clayton-Smith J. Diagnostic criteria, clinical characteristics, and natural history of Cohen syndrome. *J Med Genet.* 2003;40(4):233-41.
29. Young ID, Moore JR. Intrafamilial variation in Cohen syndrome. *J Med Genet.* 1987;24(8):488-92.
30. Murphy AM, Flanagan O, Dunne K, Lynch SA. High prevalence of Cohen syndrome among Irish travellers. *Clin Dysmorphol.* 2007;16(4):257-9.
31. Horn D, Kresova A, Kunze J, Reis A. Homozygosity mapping in a family with microcephaly, mental retardation, and short stature to a Cohen syndrome region on 8q21.3-8q22.1: redefining a clinical entity. *Am J Med Genet.* 2000;92(4):285-92.

32. Steinlein O, Tariverdian G, Boll HU, Vogel F. Tapetoretinal degeneration in brothers with apparent Cohen syndrome: nosology with Mirhosseini-Holmes-Walton syndrome. *Am J Med Genet.* 1991;41(2):196-200.
33. Massa G, Doms L, Vanderschueren-Lodeweyckx M. Growth hormone deficiency in a girl with the Cohen syndrome. *J Med Genet.* 1991;28(1):48-50.
34. Bugiani M, Gyftodimou Y, Tsimpouka P, Lamantea E, Katzaki E, d'Adamo P, Nakou S, Georgoudi N, Grigoriadou M, Tsina E, Kabolis N, Milani D, Pandelia E, Kokotas H, Gasparini P, Giannoulia-Karantana A, Renieri A, Zeviani M, Petersen MB. Cohen syndrome resulting from a novel large intragenic COH1 deletion segregating in an isolated Greek island population. *Am J Med Genet A.* 2008;146A(17):2221-6.
35. Douzgou S, Petersen M. Clinical variability of genetic isolates of Cohen syndrome. *Clin Genet.* 2011;79(6):501-6.
36. Olivieri O, Lombardi S, Russo C, Corrocher R. Increased neutrophil adhesive capability in Cohen syndrome, an autosomal recessive disorder associated with granulocytopenia. *Haematologica.* 1998;83(9):778-82.
37. North KN, Fulton AB, Whiteman DA. Identical twins with Cohen syndrome. *Am J Med Genet.* 1995;58(1):54-8.
38. Gueneau L, Duplomb L, Sarda P, Hamel C, Aral B, Chehadeh SE, Gigot N, St-Onge J, Callier P, Thevenon J, Huet F, Carmignac V, Droin N, Faivre L, Thauvin-Robinet C. Congenital neutropenia with retinopathy, a new phenotype without intellectual deficiency or obesity secondary to VPS13B mutations. *Am J Med Genet A.* 2014;164A(2):522-7.
39. Rafiq MA, Leblond CS, Saqib MA, Vincent AK, Ambalavanan A, Khan FS, Ayaz M, Shaheen N, Spiegelman D, Ali G, Amin-Ud-Din M, Laurent S, Mahmood H, Christian M, Ali N, Fennell A, Nanjiani Z, Egger G, Caron C, Waqas A, Ayub M, Rasheed S, Forgeot d'Arc B, Johnson A, So J, Brohi MQ, Motttron L, Ansar M, Vincent JB, Xiong L. Novel VPS13B Mutations in Three Large Pakistani Cohen Syndrome Families Suggests a Baloch Variant with Autistic-Like Features. *BMC Med Genet.* 2015;16:41.
40. Yang C, Hou M, Li Y, Sun D, Guo Y, Liu P, Liu Y, Song J, Zhang N, Wei W, Chen Z. Gene analysis: A rare gene disease of intellectual deficiency-Cohen syndrome. *Int J Dev Neurosci.* 2018;68:83-8.
41. Loeys BL, Dietz HC, Braverman AC, Callewaert BL, De Backer J, Devereux RB, Hilhorst-Hofstee Y, Jondeau G, Faivre L, Milewicz DM, Pyeritz RE, Sponseller PD, Wordsworth P, De Paepe AM. The revised Ghent nosology for the Marfan syndrome. *J Med Genet.* 2010;47(7):476-85.
42. Fryns JP, Legius E, Devriendt K, Meire F, Standaert L, Baten E, Van den Berghe H. Cohen syndrome: the clinical symptoms and stigmata at a young age. *Clin Genet.* 1996;49(5):237-41.
43. Kivitie-Kallio S. A CLINICAL STUDY OF 29 FINNISH PATIENTS. Academic Dissertation. 2000;ISBN 951-45-8999-8.
44. Chandler KE, Moffett M, Clayton-Smith J, Baker GA. Neuropsychological assessment of a group of UK patients with Cohen syndrome. *Neuropediatrics.* 2003;34(1):7-13.
45. Norio R. Finnish Disease Heritage I: characteristics, causes, background. *Hum Genet.* 2003;112(5-6):441-56.
46. Douzgou S, Samples JR, Georgoudi N, Petersen MB. Ophthalmic findings in the Greek isolate of Cohen syndrome. *Am J Med Genet A.* 2011;155(3):534-9.
47. Hartong DT, Berson EL, Dryja TP. Retinitis pigmentosa. *Lancet.* 2006;368(9549):1795-809.
48. Daiger SP, Bowne SJ, Sullivan LS. Perspective on genes and mutations causing retinitis pigmentosa. *Archives of ophthalmology.* 2007;125(2):151-8.
49. Chandler KE, Biswas S, Lloyd IC, Parry N, Clayton-Smith J, Black GC. The ophthalmic findings in Cohen syndrome. *Br J Ophthalmol.* 2002;86(12):1395-8.

50. Kivitie-Kallio S, Summanen P, Raitta C, Norio R. Ophthalmologic findings in Cohen syndrome. A long-term follow-up. *Ophthalmology*. 2000;107(9):1737-45.
51. Uyhazi KE, Binenbaum G, Carducci N, Zackai EH, Aleman TS. Early photoreceptor outer segment loss and retinoschisis in Cohen syndrome. *Ophthalmic Genet*. 2018;39(3):399-404.
52. Prasad AN, Prasad C. Genetic evaluation of the floppy infant. *Semin Fetal Neonatal Med*. 2011;16(2):99-108.
53. Seltzer LE, Paciorkowski AR. Genetic disorders associated with postnatal microcephaly. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*. 2014;166C(2):140-55.
54. Kerr B, Alvarez-Saavedra M, Saez MA, Saona A, Young JI. Defective body-weight regulation, motor control and abnormal social interactions in *Mecp2* hypomorphic mice. *Hum Mol Genet*. 2008;17(12):1707-17.
55. Chao HT, Chen H, Samaco RC, Xue M, Chahrour M, Yoo J, Neul JL, Gong S, Lu HC, Heintz N, Ekker M, Rubenstein JL, Noebels JL, Rosenmund C, Zoghbi HY. Dysfunction in GABA signalling mediates autism-like stereotypies and Rett syndrome phenotypes. *Nature*. 2010;468(7321):263-9.
56. Neul JL, Kaufmann WE, Glaze DG, Christodoulou J, Clarke AJ, Bahi-Buisson N, Leonard H, Bailey ME, Schanen NC, Zappella M, Renieri A, Huppke P, Percy AK, RettSearch C. Rett syndrome: revised diagnostic criteria and nomenclature. *Ann Neurol*. 2010;68(6):944-50.
57. Kivitie-Kallio S, Autti T, Salonen O, Norio R. MRI of the brain in the Cohen syndrome: a relatively large corpus callosum in patients with mental retardation and microcephaly. *Neuropediatrics*. 1998;29(6):298-301.
58. Moog U, Kutsche K, Kortum F, Chilian B, Bierhals T, Apeshiotis N, Balg S, Chassaing N, Coubes C, Das S, Engels H, Van Esch H, Grasshoff U, Heise M, Isidor B, Jarvis J, Koehler U, Martin T, Oehl-Jaschkowitz B, Ortibus E, Pilz DT, Prabhakar P, Rappold G, Rau I, Rettenberger G, Schluter G, Scott RH, Shoukier M, Wohlleber E, Zirn B, Dobyns WB, Uyanik G. Phenotypic spectrum associated with *CASK* loss-of-function mutations. *J Med Genet*. 2011;48(11):741-51.
59. Miles JH. Autism spectrum disorders--a genetics review. *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics*. 2011;13(4):278-94.
60. Lamb JA, Parr JR, Bailey AJ, Monaco AP. Autism: in search of susceptibility genes. *Neuromolecular medicine*. 2002;2(1):11-28.
61. Davis JS. Ocular manifestations in Down syndrome. *Pennsylvania medicine*. 1996;99 Suppl:67-70.
62. Tahvanainen E, Norio R, Karila E, Ranta S, Weissenbach J, Sistonen P, de la Chapelle A. Cohen syndrome gene assigned to the long arm of chromosome 8 by linkage analysis. *Nat Genet*. 1994;7(2):201-4.
63. Velayos-Baeza A, Vettori A, Copley RR, Dobson-Stone C, Monaco AP. Analysis of the human *VPS13* gene family. *Genomics*. 2004;84(3):536-49.
64. Schormair B, Kemlink D, Mollenhauer B, Fiala O, Machetanz G, Roth J, Berutti R, Strom TM, Haslinger B, Trenkwalder C, Zahorakova D, Martasek P, Ruzicka E, Winkelmann J. Diagnostic exome sequencing in early-onset Parkinson's disease confirms *VPS13C* as a rare cause of autosomal-recessive Parkinson's disease. *Clin Genet*. 2018;93(3):603-12.
65. Zou M, Li R, Wang JY, Wang K, Wang YN, Li Y, Ji FX, Sun SN, Huang SS, Fan HH, Huang CP, Zhang X, Zhu JH. Association analyses of variants of *SIPA1L2*, *MIR4697*, *GCH1*, *VPS13C*, and *DDRGK1* with Parkinson's disease in East Asians. *Neurobiol Aging*. 2018;68:159 e7- e14.
66. Gauthier J, Meijer IA, Lessel D, Mencacci NE, Krainc D, Hempel M, Tsiakas K, Prokisch H, Rossignol E, Helm MH, Rodan LH, Karamchandani J, Carecchio M, Lubbe SJ, Telegrafí A, Henderson LB, Lorenzo K, Wallace SE, Glass IA, Hamdan FF, Michaud JL,

- Rouleau GA, Campeau PM. Recessive mutations in $>VPS13D$ cause childhood onset movement disorders. *Ann Neurol*. 2018.
67. Seong E, Insolera R, Dulovic M, Kamsteeg EJ, Trinh J, Bruggemann N, Sandford E, Li S, Ozel AB, Li JZ, Jewett T, Kievit AJA, Munchau A, Shakkottai V, Klein C, Collins C, Lohmann K, van de Warrenburg BP, Burmeister M. Mutations in $VPS13D$ lead to a new recessive ataxia with spasticity and mitochondrial defects. *Ann Neurol*. 2018.
68. Lewis BP, Green RE, Brenner SE. Evidence for the widespread coupling of alternative splicing and nonsense-mediated mRNA decay in humans. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2003;100(1):189-92.
69. Barreiro LB, Laval G, Quach H, Patin E, Quintana-Murci L. Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat Genet*. 2008;40(3):340-5.
70. Yang J, Benyamin B, McEvoy BP, Gordon S, Henders AK, Nyholt DR, Madden PA, Heath AC, Martin NG, Montgomery GW, Goddard ME, Visscher PM. Common SNPs explain a large proportion of the heritability for human height. *Nat Genet*. 2010;42(7):565-9.
71. Stefl S, Nishi H, Petukh M, Panchenko AR, Alexov E. Molecular mechanisms of disease-causing missense mutations. *J Mol Biol*. 2013;425(21):3919-36.
72. 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, Committee ALQA. 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*. 2015;17(5):405-24.
73. Lang GA, Iwakuma T, Suh YA, Liu G, Rao VA, Parant JM, Valentin-Vega YA, Terzian T, Caldwell LC, Strong LC, El-Naggar AK, Lozano G. Gain of function of a p53 hot spot mutation in a mouse model of Li-Fraumeni syndrome. *Cell*. 2004;119(6):861-72.
74. Balikova I, Lehesjoki AE, de Ravel TJ, Thienpont B, Chandler KE, Clayton-Smith J, Traskelin AL, Fryns JP, Vermeesch JR. Deletions in the $VPS13B$ ($COH1$) gene as a cause of Cohen syndrome. *Hum Mutat*. 2009;30(9):E845-54.
75. Feuk L, Carson AR, Scherer SW. Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet*. 2006;7(2):85-97.
76. Zarrei M, MacDonald JR, Merico D, Scherer SW. A copy number variation map of the human genome. *Nature reviews Genetics*. 2015;16(3):172-83.
77. Kolehmainen J, Norio R, Kivitie-Kallio S, Tahvanainen E, de la Chapelle A, Lehesjoki AE. Refined mapping of the Cohen syndrome gene by linkage disequilibrium. *Eur J Hum Genet*. 1997;5(4):206-13.
78. Klute MJ, Melancon P, Dacks JB. Evolution and diversity of the Golgi. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(8):a007849.
79. Lorente-Rodriguez A, Barlowe C. Entry and exit mechanisms at the cis-face of the Golgi complex. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(7).
80. Lee C, Goldberg J. Structure of coatamer cage proteins and the relationship among COPI, COPII, and clathrin vesicle coats. *Cell*. 2010;142(1):123-32.
81. Hughson FM, Reinisch KM. Structure and mechanism in membrane trafficking. *Curr Opin Cell Biol*. 2010;22(4):454-60.
82. Glick BS, Luini A. Models for Golgi traffic: a critical assessment. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2011;3(11):a005215.
83. Rothman JE. The future of Golgi research. *Mol Biol Cell*. 2010;21(22):3776-80.
84. Emr S, Glick BS, Linstedt AD, Lippincott-Schwartz J, Luini A, Malhotra V, Marsh BJ, Nakano A, Pfeffer SR, Rabouille C, Rothman JE, Warren G, Wieland FT. Journeys through the Golgi--taking stock in a new era. *J Cell Biol*. 2009;187(4):449-53.
85. Gaynor EC, Graham TR, Emr SD. COPI in ER/Golgi and intra-Golgi transport: do yeast COPI mutants point the way? *Biochim Biophys Acta*. 1998;1404(1-2):33-51.

86. Bonfanti L, Mironov AA, Jr., Martinez-Menarguez JA, Martella O, Fusella A, Baldassarre M, Buccione R, Geuze HJ, Mironov AA, Luini A. Procollagen traverses the Golgi stack without leaving the lumen of cisternae: evidence for cisternal maturation. *Cell*. 1998;95(7):993-1003.
87. Staehelin LA, Kang BH. Nanoscale architecture of endoplasmic reticulum export sites and of Golgi membranes as determined by electron tomography. *Plant Physiol*. 2008;147(4):1454-68.
88. Mogelsvang S, Gomez-Ospina N, Soderholm J, Glick BS, Staehelin LA. Tomographic evidence for continuous turnover of Golgi cisternae in *Pichia pastoris*. *Mol Biol Cell*. 2003;14(6):2277-91.
89. Mogelsvang S, Marsh BJ, Ladinsky MS, Howell KE. Predicting function from structure: 3D structure studies of the mammalian Golgi complex. *Traffic*. 2004;5(5):338-45.
90. Kweon HS, Beznoussenko GV, Micaroni M, Polishchuk RS, Trucco A, Martella O, Di Giandomenico D, Marra P, Fusella A, Di Pentima A, Berger EG, Geerts WJ, Koster AJ, Burger KN, Luini A, Mironov AA. Golgi enzymes are enriched in perforated zones of golgi cisternae but are depleted in COPI vesicles. *Mol Biol Cell*. 2004;15(10):4710-24.
91. Trucco A, Polishchuk RS, Martella O, Di Pentima A, Fusella A, Di Giandomenico D, San Pietro E, Beznoussenko GV, Polishchuk EV, Baldassarre M, Buccione R, Geerts WJ, Koster AJ, Burger KN, Mironov AA, Luini A. Secretory traffic triggers the formation of tubular continuities across Golgi sub-compartments. *Nat Cell Biol*. 2004;6(11):1071-81.
92. Lavieu G, Zheng H, Rothman JE. Stapled Golgi cisternae remain in place as cargo passes through the stack. *Elife*. 2013;2:e00558.
93. Pfeffer SR. Hopping rim to rim through the Golgi. *Elife*. 2013;2:e00903.
94. Mizuno-Yamasaki E, Rivera-Molina F, Novick P. GTPase networks in membrane traffic. *Annu Rev Biochem*. 2012;81:637-59.
95. Barr FA. Review series: Rab GTPases and membrane identity: causal or inconsequential? *J Cell Biol*. 2013;202(2):191-9.
96. Pfeffer SR. Rab GTPase localization and Rab cascades in Golgi transport. *Biochem Soc Trans*. 2012;40(6):1373-7.
97. Marra P, Salvatore L, Mironov A, Jr., Di Campli A, Di Tullio G, Trucco A, Beznoussenko G, Mironov A, De Matteis MA. The biogenesis of the Golgi ribbon: the roles of membrane input from the ER and of GM130. *Mol Biol Cell*. 2007;18(5):1595-608.
98. Nakamura N. Emerging new roles of GM130, a cis-Golgi matrix protein, in higher order cell functions. *J Pharmacol Sci*. 2010;112(3):255-64.
99. Nozawa K, Casiano CA, Hamel JC, Molinaro C, Fritzler MJ, Chan EK. Fragmentation of Golgi complex and Golgi autoantigens during apoptosis and necrosis. *Arthritis Res*. 2002;4(4):R3.
100. Ramirez IB, Lowe M. Golgins and GRASPs: holding the Golgi together. *Semin Cell Dev Biol*. 2009;20(7):770-9.
101. Feinstein TN, Linstedt AD. GRASP55 regulates Golgi ribbon formation. *Mol Biol Cell*. 2008;19(7):2696-707.
102. Puthenveedu MA, Bachert C, Puri S, Lanni F, Linstedt AD. GM130 and GRASP65-dependent lateral cisternal fusion allows uniform Golgi-enzyme distribution. *Nat Cell Biol*. 2006;8(3):238-48.
103. Wang Y, Satoh A, Warren G. Mapping the functional domains of the Golgi stacking factor GRASP65. *J Biol Chem*. 2005;280(6):4921-8.
104. Xiang Y, Wang Y. GRASP55 and GRASP65 play complementary and essential roles in Golgi cisternal stacking. *J Cell Biol*. 2010;188(2):237-51.
105. Gillingham AK, Munro S. Long coiled-coil proteins and membrane traffic. *Biochim Biophys Acta*. 2003;1641(2-3):71-85.

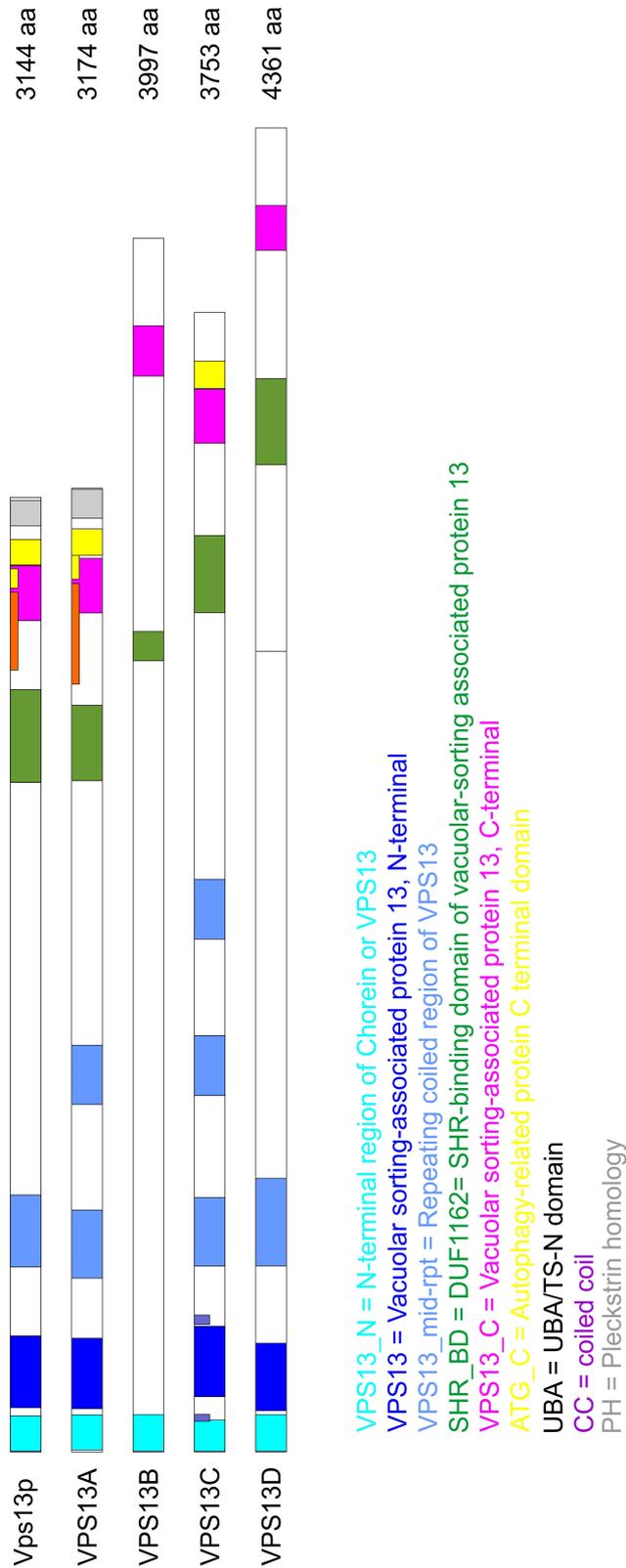
106. Waters MG, Pfeffer SR. Membrane tethering in intracellular transport. *Curr Opin Cell Biol.* 1999;11(4):453-9.
107. Munro S. The golgin coiled-coil proteins of the Golgi apparatus. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(6).
108. Diao A, Rahman D, Pappin DJ, Lucocq J, Lowe M. The coiled-coil membrane protein golgin-84 is a novel rab effector required for Golgi ribbon formation. *J Cell Biol.* 2003;160(2):201-12.
109. Barr FA. A novel Rab6-interacting domain defines a family of Golgi-targeted coiled-coil proteins. *Curr Biol.* 1999;9(7):381-4.
110. Goud B, Gleeson PA. TGN golgins, Rabs and cytoskeleton: regulating the Golgi trafficking highways. *Trends Cell Biol.* 2010;20(6):329-36.
111. Redding K, Brickner JH, Marschall LG, Nichols JW, Fuller RS. Allele-specific suppression of a defective trans-Golgi network (TGN) localization signal in Kex2p identifies three genes involved in localization of TGN transmembrane proteins. *Mol Cell Biol.* 1996;16(11):6208-17.
112. Enyenihi AH, Saunders WS. Large-scale functional genomic analysis of sporulation and meiosis in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics.* 2003;163(1):47-54.
113. Nakanishi H, Suda Y, Neiman AM. Erv14 family cargo receptors are necessary for ER exit during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* 2007;120(Pt 5):908-16.
114. Park JS, Neiman AM. VPS13 regulates membrane morphogenesis during sporulation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci.* 2012;125(Pt 12):3004-11.
115. Kilmartin JV. Sfi1p has conserved centrin-binding sites and an essential function in budding yeast spindle pole body duplication. *J Cell Biol.* 2003;162(7):1211-21.
116. Duplomb L, Duvet S, Picot D, Jego G, El Chehadeh-Djebbar S, Marle N, Gigot N, Aral B, Carmignac V, Thevenon J, Lopez E, Riviere JB, Klein A, Philippe C, Droin N, Blair E, Girodon F, Donadieu J, Bellanne-Chantelot C, Delva L, Michalski JC, Solary E, Faivre L, Foulquier F, Thauvin-Robinet C. Cohen syndrome is associated with major glycosylation defects. *Hum Mol Genet.* 2014;23(9):2391-9.
117. Scherer WF, Syverton JT, Gey GO. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 1953;97(5):695-710.
118. Graham FL, Smiley J, Russell WC, Nairn R. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol.* 1977;36(1):59-74.
119. Raptis L, Bolen JB. Polyomavirus transforms rat F111 and mouse NIH 3T3 cells by different mechanisms. *J Virol.* 1989;63(2):753-8.
120. Sudo H, Kodama HA, Amagai Y, Yamamoto S, Kasai S. In vitro differentiation and calcification in a new clonal osteogenic cell line derived from newborn mouse calvaria. *J Cell Biol.* 1983;96(1):191-8.
121. Fidler IJ. Biological behavior of malignant melanoma cells correlated to their survival in vivo. *Cancer Res.* 1975;35(1):218-24.
122. Yaffe D, Saxel O. Serial passaging and differentiation of myogenic cells isolated from dystrophic mouse muscle. *Nature.* 1977;270(5639):725-7.
123. Ito W, Ishiguro H, Kurosawa Y. A general method for introducing a series of mutations into cloned DNA using the polymerase chain reaction. *Gene.* 1991;102(1):67-70.
124. Eischeid AC. SYTO dyes and EvaGreen outperform SYBR Green in real-time PCR. *BMC Res Notes.* 2011;4:263.
125. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods.* 2001;25(4):402-8.
126. Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1977;74(12):5463-7.

127. Grantham R. Amino acid difference formula to help explain protein evolution. *Science*. 1974;185(4154):862-4.
128. Risler JL, Delorme MO, Delacroix H, Henaut A. Amino acid substitutions in structurally related proteins. A pattern recognition approach. Determination of a new and efficient scoring matrix. *J Mol Biol*. 1988;204(4):1019-29.
129. Choi Y, Sims GE, Murphy S, Miller JR, Chan AP. Predicting the functional effect of amino acid substitutions and indels. *PLoS One*. 2012;7(10):e46688.
130. Altschul SF, Gish W, Miller W, Myers EW, Lipman DJ. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol*. 1990;215(3):403-10.
131. Adzhubei I, Jordan DM, Sunyaev SR. Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. *Curr Protoc Hum Genet*. 2013;Chapter 7:Unit7 20.
132. Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D. MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods*. 2010;7(8):575-6.
133. Ng PC, Henikoff S. SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function. *Nucleic Acids Res*. 2003;31(13):3812-4.
134. Li B, Krishnan VG, Mort ME, Xin F, Kamati KK, Cooper DN, Mooney SD, Radivojac P. Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions. *Bioinformatics*. 2009;25(21):2744-50.
135. Pejaver V, Mooney SD, Radivojac P. Missense variant pathogenicity predictors generalize well across a range of function-specific prediction challenges. *Hum Mutat*. 2017;38(9):1092-108.
136. Calabrese R, Capriotti E, Fariselli P, Martelli PL, Casadio R. Functional annotations improve the predictive score of human disease-related mutations in proteins. *Hum Mutat*. 2009;30(8):1237-44.
137. Brugha TS, Doos L, Tempier A, Einfeld S, Howlin P. Outcome measures in intervention trials for adults with autism spectrum disorders; a systematic review of assessments of core autism features and associated emotional and behavioural problems. *Int J Methods Psychiatr Res*. 2015;24(2):99-115.
138. Thusberg J, Olatubosun A, Vihinen M. Performance of mutation pathogenicity prediction methods on missense variants. *Hum Mutat*. 2011;32(4):358-68.
139. Grigoriev I, Splinter D, Keijzer N, Wulf PS, Demmers J, Ohtsuka T, Modesti M, Maly IV, Grosveld F, Hoogenraad CC, Akhmanova A. Rab6 regulates transport and targeting of exocytotic carriers. *Dev Cell*. 2007;13(2):305-14.
140. Nakamura N, Rabouille C, Watson R, Nilsson T, Hui N, Slusarewicz P, Kreis TE, Warren G. Characterization of a cis-Golgi matrix protein, GM130. *J Cell Biol*. 1995;131(6 Pt 2):1715-26.
141. Lohmann K, Klein C. Next generation sequencing and the future of genetic diagnosis. *Neurotherapeutics*. 2014;11(4):699-707.
142. Capriotti E, Calabrese R, Casadio R. Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics*. 2006;22(22):2729-34.
143. Miosge LA, Field MA, Sontani Y, Cho V, Johnson S, Palkova A, Balakishnan B, Liang R, Zhang Y, Lyon S, Beutler B, Whittle B, Bertram EM, Enders A, Goodnow CC, Andrews TD. Comparison of predicted and actual consequences of missense mutations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2015;112(37):E5189-98.
144. Zhang Z, Miteva MA, Wang L, Alexov E. Analyzing effects of naturally occurring missense mutations. *Comput Math Methods Med*. 2012;2012:805827.
145. Witham S, Takano K, Schwartz C, Alexov E. A missense mutation in CLIC2 associated with intellectual disability is predicted by in silico modeling to affect protein stability and dynamics. *Proteins*. 2011;79(8):2444-54.

146. Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat Rev Genet.* 2011;13(2):135-45.
147. Herman S, Varga D, Deissler HL, Kreienberg R, Deissler H. Medium-sized deletion in the BRCA1 gene: Limitations of Sanger sequencing and MLPA analyses. *Genet Mol Biol.* 2012;35(1):53-6.
148. Katsonis P, Koire A, Wilson SJ, Hsu TK, Lua RC, Wilkins AD, Lichtarge O. Single nucleotide variations: biological impact and theoretical interpretation. *Protein Sci.* 2014;23(12):1650-66.
149. Hakenberg J, Cheng WY, Thomas P, Wang YC, Uzilov AV, Chen R. Integrating 400 million variants from 80,000 human samples with extensive annotations: towards a knowledge base to analyze disease cohorts. *BMC bioinformatics.* 2016;17:24.
150. Pritchard JK, Cox NJ. The allelic architecture of human disease genes: common disease-common variant...or not? *Hum Mol Genet.* 2002;11(20):2417-23.
151. Bryksin AV, Matsumura I. Overlap extension PCR cloning: a simple and reliable way to create recombinant plasmids. *Biotechniques.* 2010;48(6):463-5.
152. Reikofski J, Tao BY. Polymerase chain reaction (PCR) techniques for site-directed mutagenesis. *Biotechnol Adv.* 1992;10(4):535-47.
153. Wang Y, Seemann J. Golgi biogenesis. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 2011;3(10):a005330.
154. Machamer CE. The Golgi complex in stress and death. *Front Neurosci.* 2015;9:421.
155. Haase G, Rabouille C. Golgi Fragmentation in ALS Motor Neurons. New Mechanisms Targeting Microtubules, Tethers, and Transport Vesicles. *Front Neurosci.* 2015;9:448.
156. Joshi G, Bekier ME, 2nd, Wang Y. Golgi fragmentation in Alzheimer's disease. *Front Neurosci.* 2015;9:340.
157. Lavieu G, Dunlop MH, Lerich A, Zheng H, Bottanelli F, Rothman JE. The Golgi ribbon structure facilitates anterograde transport of large cargoes. *Mol Biol Cell.* 2014;25(19):3028-36.
158. Xiang Y, Zhang X, Nix DB, Katoh T, Aoki K, Tiemeyer M, Wang Y. Regulation of protein glycosylation and sorting by the Golgi matrix proteins GRASP55/65. *Nat Commun.* 2013;4:1659.
159. Dorsett Y, Tuschl T. siRNAs: applications in functional genomics and potential as therapeutics. *Nat Rev Drug Discov.* 2004;3(4):318-29.
160. Fedorov Y, Anderson EM, Birmingham A, Reynolds A, Karpilow J, Robinson K, Leake D, Marshall WS, Khvorova A. Off-target effects by siRNA can induce toxic phenotype. *RNA.* 2006;12(7):1188-96.
161. Dumas JJ, Merithew E, Sudharshan E, Rajamani D, Hayes S, Lawe D, Corvera S, Lambright DG. Multivalent endosome targeting by homodimeric EEA1. *Mol Cell.* 2001;8(5):947-58.
162. Graham TR, Kozlov MM. Interplay of proteins and lipids in generating membrane curvature. *Curr Opin Cell Biol.* 2010;22(4):430-6.
163. Pickart CM, Eddins MJ. Ubiquitin: structures, functions, mechanisms. *Biochim Biophys Acta.* 2004;1695(1-3):55-72.
164. Seifert W, Kuhnisch J, Maritzen T, Lommatzsch S, Hennies HC, Bachmann S, Horn D, Haucke V. Cohen syndrome-associated protein COH1 physically and functionally interacts with the small GTPase RAB6 at the Golgi complex and directs neurite outgrowth. *J Biol Chem.* 2015;290(6):3349-58.
165. De M, Oleskie AN, Ayyash M, Dutta S, Mancour L, Abazeed ME, Brace EJ, Skiniotis G, Fuller RS. The Vps13p-Cdc31p complex is directly required for TGN late endosome transport and TGN homotypic fusion. *J Cell Biol.* 2017;216(2):425-39.

166. Koizumi K, Gallagher KL. Identification of SHRUBBY, a SHORT-ROOT and SCARECROW interacting protein that controls root growth and radial patterning. *Development*. 2013;140(6):1292-300.

Anhang A2 – Putative funktionelle Proteindomänen in Vps13 und der VPS13-Familie



Anhang A3 – Golgi-Partikel-Analyse-Makro für ImageJ

```
macro "Golgi Action Tool Options - C037T1d16G [n1]" {
  threshold = getNumber("Threshold: ", threshold);

  if (selectionType== -1)
    exit("Area selection required");
  List.setMeasurements;
  getPixelSize(unit, pw, ph, pd);

  // Check der Einheit
  if(unit == "µm"){
    h = List.getValue("Height")*(1/pw);
    w = List.getValue("Width")*(1/pw);
  }
  else{
    h = List.getValue("Height");
    w = List.getValue("Width");
  }
  run("Copy");
  newImage(File.name+"_count", "8-bit White", w, h, 1);
  run("Paste");
  setAutoThreshold("Default dark");
  setThreshold(threshold, 255);
  run("Analyze Particles...", "size=0-Infinity circularity=0.00-1.00 show=Nothing summarize record");
}
```

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Malte Zorn, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Charakterisierung von Cohen-Syndrom-assoziierten missense-Varianten* selbstständig 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 beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung (siehe „Uniform Requirements for Manuscripts (URM)“ des ICMJE -www.icmje.org) kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

Meine Anteile an etwaigen Publikationen zu dieser Dissertation entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem/der Betreuer/in, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s.o) und werden von mir verantwortet.

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

Datum

Unterschrift

Danksagung

Ich danke Prof. Dr. Sebastian Bachmann für seine Unterstützung, sein Vertrauen und die Möglichkeit, diese Arbeit in seinem Labor anfertigen zu dürfen. Er begleitete mich zunächst als Anatomiedozent, später als Mentor und Förderer in der Studienstiftung und während meiner Tätigkeit am Institut für Vegetative Anatomie.

Ich danke insbesondere auch Dr. Wenke Seifert für die intensive Betreuung und Begleitung während meiner Laborarbeit, für die Geduld, für ihre fachliche Expertise und auch unser freundschaftliches Miteinander.

Ich danke dem Team des Institutes für Vegetative Anatomie der Charité für die ständige Ansprechbarkeit und Unterstützung in und um das Labor. Hier seien insbesondere Dr. Christin Dathe, Dr. Aljona Borschewski, Kerstin Riskowski, Dr. Kerim Mutig, Katharina Blankenstein und Anette Drobbe genannt.

Ich danke Dr. Jirko Kühnisch für wertvolles Feedback und fachliche Unterstützung.

Ich danke meinen Eltern, die mich in Studium und Promotion begleitet haben und mich in meinen Entscheidungen und Anstrengungen stets uneingeschränkt unterstützt haben.

Mein größter Dank gilt dir, Asja. Du hast mich durch die Höhen und Tiefen dieser Zeit begleitet. Ich danke dir für die Nachsicht und Geduld mit mir.

Lebenslauf

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