

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

DISSERTATION

Eine *de novo* Missense Mutation im Gen Chromodomain
Helicase DNA binding protein 8 (*CHD8*): eine neue
Assoziation mit einem kongenitalen Myasthenie-Syndrom

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

zur Erlangung des akademischen Grades

Doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät

Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Chae-Young Lee

aus Seoul

Datum der Promotion: 26.06.2022

Inhaltsverzeichnis

| | |
|--|-----------|
| 1. Abkürzungsverzeichnis | 3 |
| 2. Abstract..... | 6 |
| 2. Zusammenfassung..... | 8 |
| 3. Manteltext..... | 10 |
| 3.1 Diagnostik seltener Erkrankungen | 10 |
| 3.1.1 Kongenitale Myasthenie-Syndrome | 10 |
| 3.1.2 CHD8 | 12 |
| 3.1.3 Die neuromuskuläre Endplatte | 13 |
| 3.1.4 Zielsetzung der Arbeit | 15 |
| 3.2. Patientinnen Fallberichte | 15 |
| 3.3. Methodik..... | 18 |
| 3.3.1 Exom-Sequenzierung und Evaluation gefundener DNA-Varianten | 18 |
| 3.3.2 Western Blot..... | 25 |
| 3.3.3 Immunofluoreszenz-Färbungen..... | 25 |
| 3.4 Ergebnisse und Diskussion | 27 |
| 3.4.1 Ergebnisse der Exomsequenzierung | 27 |
| 3.4.2 Ergebnisse des Western Blots | 27 |
| 3.4.3 Ergebnisse der Immunofluoreszenz-Färbungen | 28 |
| 3.4.4 Diskussion..... | 32 |
| 3.4.5 Einordnung und Ausblick..... | 38 |
| 4. Literatur | 41 |
| 5. Eidesstattliche Versicherung | 45 |
| 6. Anteilserklärung | 46 |
| 7. Auszug aus der Journal Summary List | 48 |
| 8. Druckexemplar der ausgewählten Publikation | 49 |
| 9. Lebenslauf | 64 |
| 10. Komplette Publikationsliste | 65 |
| 11. Danksagung..... | 66 |

Abbildungsverzeichnis

| | |
|--------------------------|----|
| <i>Abbildung 1</i> | 14 |
| <i>Abbildung 2</i> | 17 |
| <i>Abbildung 3</i> | 28 |
| <i>Abbildung 4</i> | 30 |
| <i>Abbildung 5</i> | 32 |
| | |
| <i>Tabelle 1</i> | 19 |
| <i>Tabelle 2</i> | 24 |
| <i>Tabelle 3</i> | 33 |
| <i>Tabelle 4</i> | 35 |

1. Abkürzungsverzeichnis

| | |
|----------|--|
| 3,4-DAP: | 3,4-Diaminopyridin |
| 5'UTR: | 5' untranslated region |
| A: | Adenin |
| AAE: | amino acid exchange |
| AChR: | Acetylcholinrezeptor |
| AD: | autosomal dominant |
| AGRN: | Agrin |
| ALG2: | alpha-1,3/1,6-mannosyltransferase |
| ALG14: | UDP-N-acetylglucosaminyltransferase subunit |
| AR: | autosomal rezessiv |
| ASD: | autism spectrum disorder |
| ASS: | Autismus-Spektrum-Störung |
| βCAT: | β-Catenin |
| bp: | Basenpaare |
| C: | Cytosin |
| CHD7: | chromodomain helicase DNA binding protein 7 |
| CHD8: | chromodomain helicase DNA binding protein 8 |
| CHRNA1: | cholinergic receptor nicotinic alpha 1 subunit |
| CHRNA7: | cholinergic receptor nicotinic alpha 7 subunit |
| CHRNB1: | cholinergic receptor nicotinic beta 1 subunit |
| CHRNB4: | cholinergic receptor nicotinic beta 4 subunit |
| CHRND: | cholinergic receptor nicotinic delta subunit |
| CHRNE: | cholinergic receptor nicotinic epsilon subunit |
| CHRNG: | cholinergic receptor nicotinic gamma subunit |
| CMS: | congenital myasthenic syndrome |
| DAPI: | 4'6-diamidino-2-phenylindole |
| DMD: | Dystrophin |
| DNA: | deoxyribonucleic acid |
| DOK-7: | Docking protein 7 |
| DPAGT1: | dolichyl-phosphate N-acetylglucosaminephosphotransferase 1 |
| DVL: | Dishevelled |
| ECM: | extrazelluläre Matrix |

| | |
|----------------|--|
| EGFP: | enhanced green fluorescent protein |
| EMG: | Elektromyogramm |
| ERBB3: | Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3 |
| ExAC: | Exome Aggregation Consortium |
| FW: | forward |
| FZD: | Frizzled |
| G: | Guanin |
| GFPT1: | glutamine-fructose-6-phosphate transaminase 1 |
| GSK3 β : | Glykogensynthase-Kinase 3 β |
| H1: | Histon 1 |
| HELLP: | Hemolysis, Elevated Liver enzymes, Low Platelet count syndrome |
| HrP: | horseradish peroxidase |
| IgG: | Immunglobulin G |
| HPO: | Human Phenotype Ontology |
| IGV: | Integrative Genomics Viewer |
| KAB/C-II: | Kaufmann Assessment Battery for Children II |
| kDa: | Kilodalton |
| KG: | Körpergewicht |
| Kis: | <i>Kismet</i> |
| LEMS: | Lambert-Eaton-Syndrom |
| LRP4: | low density lipoprotein receptor-related protein 4 |
| LRP8: | low density lipoprotein receptor-related protein 8 |
| MOI: | mode of inheritance |
| MRC: | Medical Research Council Scale |
| mRNA: | messenger ribonucleic acid |
| MuSK: | Muskelspezifische Tyrosinkinase |
| MYC: | MYC proto-oncogene |
| MYH2: | myosin heavy chain 2 |
| NME: | Neuromuskuläre Endplatte |
| NMJ: | neuromuscular junction |
| OMIM: | Online Mendelian Inheritance in Man |
| PCR: | Polymerase-Kettenreaktion |
| REV: | reverse |
| RT-qPCR: | real-time quantitative PCR |

| | |
|----------|--|
| SH2B1: | SH2B adaptor protein |
| siRNA: | small interfering RNA |
| SLAIN1: | SLAIN motif containing protein 1 |
| SLC38A6: | solute carrier family 38 member 6 |
| SM: | Spontanmutation |
| SNAP25: | synaptosomal-associated protein, 25kDa |
| SNARE: | SNAP receptor |
| SSW: | Schwangerschaftswoche |
| SYT12: | synaptotagmin 12 |
| T: | Thymin |
| TBP: | TATA-box binding protein |
| TCF4: | Transkriptionsfaktor 4 |
| TFIID: | Transkriptionsfaktor II D |
| VCF: | Variant Call Format |
| VGCC: | voltage gated calcium channel |
| WES: | Whole Exome Sequencing |
| WNT: | Wingless-related integration site |
| ZNS: | zentrales Nervensystem |

2. Abstract

Background: The correct diagnosis of rare, genetic diseases is difficult to obtain and patients often have to wait several years until they are correctly diagnosed. The aim of this work was to find the genetic basis of a novel congenital myasthenic syndrome (CMS) in female monozygotic twins suffering from muscle weakness, overgrowth, and macrocephalus.

Methods: With help of Whole Exome Sequencing (WES) and different *in silico* methods, I searched for and prioritized potential disease-causing DNA variants. A thorough and extensive literature research together with the synopsis of the clinical and molecular genetic findings, led me to a shortlist of several candidate variants. Next, I used conventional Sanger sequencing for segregation analysis and could confirm the presence of the pathogenic variant in the *CHD8* gene and its absence in the parents. To explore the subcellular location and an assumed function of CHD8 at the neuromuscular junction (NMJ), I conducted immunofluorescence stainings for CHD8, rapsyn, β -catenin (β CAT), and golgin, both on patient and control fibroblasts. In the course of the project, this was also done in human and mouse control muscle sections.

Results: I identified a spontaneous *de novo* missense mutation in *CHD8* [chr14:g.21,884,051G>A, GRCh37.p11 | c.1732C>T, NM_00117062 | p.(R578C)], the gene encoding chromodomain helicase DNA binding protein 8 (CHD8), which I deem responsible for the symptoms seen in our patients. Clinically, mutations affecting CHD8 are known to cause a subtype of autism spectrum disorder (ASD) with characteristics like facial dysmorphism, overgrowth, and macrocephalus. To date, no associations of CHD8 with a function at the NMJ or neuromuscular symptoms as seen in our patients have been reported. CHD8/Duplin plays a role in the regulation of the Wnt-related integration site (WNT) pathway *via* interaction with β CAT and in chromatin remodeling for transcriptional regulation. β CAT on the other hand is known to be implicated in correctly building the structure of the NMJ. I could demonstrate the presence of CHD8 at the NMJ with immunofluorescence stainings on human and mouse control muscle sections, where CHD8 colocalized with rapsyn and β CAT at its sarcoplasmic side.

Conclusion: The heterozygous *de novo* variant in *CHD8*, which I detected, is very likely to cause the CMS of our patients. They display overgrowth and macrocephaly, which overlaps with the CHD8-associated subtype of ASD and its morphological characteristics.

The muscular phenotype in our patients is a novel finding. My hypothesis was that CHD8 plays a structural role at the NMJ and in its transcriptional regulation *via* the WNT pathway and β CAT interaction. The findings broaden the clinical spectrum of CMS and might be considered for future approaches in diagnosing genetic causes of CMS.

2. Zusammenfassung

Hintergrund: Die Aufklärung genetischer Ursachen seltener, angeborener Erkrankungen ist oft schwierig und zeitintensiv. Das Ziel dieser Arbeit war die Identifikation der zugrundeliegenden Genmutation für ein bislang nicht beschriebenes kongenitales Myasthenie-Syndrom (CMS) bei weiblichen monozygoten Zwillingen, die Muskelschwäche, Makrozephalie und Großwuchs aufweisen.

Methodik: Mithilfe einer Gesamtexomsequenzierung und verschiedener computergestützter Methoden suchte ich nach potentiell krankheitsverursachenden DNA-Varianten und priorisierte diese hinsichtlich ihrer mutmaßlichen Pathogenität. Dazu führte ich eine ausführliche Literaturrecherche durch und in Zusammenschau der klinischen und molekulargenetischen Informationen habe ich letztlich einige wenige Kandidatenvarianten selektiert. Anschließend führte ich eine Segregationsanalyse mittels konventioneller Sanger-Sequenzierung durch und bestätigte so das Vorhandensein der pathogenen Variante im *CHD8* Gen der Patientinnen. Zur Darstellung der subzellulären Lokalisation und der strukturellen Funktion an der neuromuskulären Endplatte (NME) habe ich Immunfluoreszenz-Färbungen von CHD8, Rapsyn, β -Catenin (β CAT) und Golgin auf Fibroblasten unserer Patientinnen und gesunden Kontrollen durchgeführt. Im Verlauf wurden weitere Färbungen auf humanen und murinen Kontrollmuskelschnitten angefertigt.

Ergebnisse: Ich identifizierte eine spontane *missense* Mutation im *CHD8* Gen [chr14:g.21,884,051G>A, GRCh37.p11 | c.1732C>T, NM_00117062 | p.(R578C)], das für das Chromodomain helicase DNA binding protein 8 (CHD8) kodiert. Klinisch wurden bisher Mutationen in *CHD8* beschrieben, die mit Autismus-Spektrums-Störung (ASS) in Kombination mit fazialen Dismorphien, Hochwuchs und Makrozephalie einhergehen. Bislang war eine Funktion von CHD8 an der NME sowie eine Assoziation mit muskulären Symptomen nicht bekannt. Auf der zellulären Ebene ist CHD8/Duplin für die Regulation der WNT/ β CAT-Signalkaskade und für die Chromatin-Remodellierung zuständig. β CAT spielt außerdem eine Rolle in der strukturellen Integrität der NME. Immunfluoreszenz-Färbungen gegen Rapsyn und CHD8 auf Kontrollmuskelschnitten bestätigten die Expression von CHD8 an der NME sowie eine Kolo-kalisation mit Rapsyn und β CAT.

Zusammenfassung: Die von mir identifizierte heterozygote *de novo* Mutation in *CHD8* führt sehr wahrscheinlich zum CMS unserer Patientinnen. Der Hochwuchs sowie die

Makrozephalie überlappen mit der *CHD8*-assoziierten Unterform der ASS und ihren phänotypischen Charakteristika. Die muskulären Symptome stellen neue Erkenntnisse dar. Basierend auf meinen Erkenntnissen aus Literatur und Labor gehe ich von einer strukturbildenden Funktion von *CHD8* an der NME aus. Ich vermute zusätzlich eine Rolle in der Formation der NME über die Regulation der Genexpression *via* WNT. Die vorliegenden Ergebnisse erweitern das klinische Spektrum der CMS und sollten in Zukunft im Rahmen der molekularen Diagnostik berücksichtigt werden.

3. Manteltext

Die im folgenden Manteltext dargestellten Informationen und Erkenntnisse basieren im Wesentlichen auf der Publikation von Lee *et al.* (1), und werden hier mit dem Ziel der Publikationspromotion in einen breiteren wissenschaftlichen Kontext gerückt.

3.1 Diagnostik seltener Erkrankungen

Seltene Erkrankungen treten *per definitionem* mit einer Prävalenz von weniger als 1:2.000 auf und umfassen ein Spektrum verschiedenster Krankheitsbilder. Die klinische Vielfalt der Symptome in Kombination mit dem individuell seltenen Auftreten macht die Diagnose seltener Erkrankungen mithilfe herkömmlicher Methoden zu einer Herausforderung. Viele Patient*innen erhalten, falls überhaupt, erst nach Konsultation verschiedenster Ärzt*innen und einer oft jahrelangen diagnostischen Odyssee eine definitive Diagnose. Molekulargenetische Untersuchungen einzelner Gene zur genetischen Ursachenfindung, welche schon seit längerer Zeit im klinischen Alltag Anwendung finden, sind leider häufig mit einem enormen Zeitaufwand verbunden. Durch die Einführung von Hochdurchsatzmethoden zur Gensequenzierung, dem sogenannten Next Generation Sequencing und speziell seiner Sonderform, der Gesamtexomsequenzierung (Whole Exome Sequencing; WES), wurde dieser Prozess maßgeblich beschleunigt. Die umfangreiche Suche im gesamten Exom, also dem proteinkodierenden Teil des Genoms, kann nun in einem angemessenen Zeitrahmen erfolgen. Die gefundenen genetischen Varianten sind in der Regel aber so zahlreich, dass sie anschließend zunächst mit *in silico* Methoden auf ihr mutmaßliches Krankheitspotential hin untersucht und mit verschiedenen Filterschritten auf die wahrscheinlichsten Kandidaten reduziert werden müssen. Im Anschluss daran kann man mithilfe experimenteller Methoden den Verdacht der mutmaßlichen Krankheitsrelevanz einer Variante bestätigen und Arbeitshypothesen zum Pathomechanismus prüfen. Dieses Verfahren wurde auch zur erfolgreichen Bearbeitung der Zielstellung der vorliegenden Arbeit genutzt.

3.1.1 Kongenitale Myasthenie-Syndrome

Kongenitale Myasthenie-Syndrome (CMS; englisch: *congenital myasthenic syndrome*) stellen eine heterogene Gruppe meist autosomal-rezessiv vererbter Erkrankungen dar (2), bei denen eine strukturelle und/oder funktionelle Beeinträchtigung der

neuromuskulären Endplatte (NME) vorliegt. Mit einer Prävalenz von 1:500.000 in Europa gehören diese zu den seltenen Erkrankungen (3). Das klinische Bild ist vielfältig mit Muskelhypotonie, Ptosis und episodischen Apnoen als besonders häufigen Symptomen (3,4). Weiterhin kommt es oft zu einer sich postnatal oder im frühen Kindesalter manifestierenden Muskelschwäche, vor allem der okulären, bulbären und proximalen Extremitätenmuskulatur. Diese Muskelschwäche wird durch Triggerfaktoren wie körperliche Belastung oder Wärme verstärkt (2). Der Schweregrad reicht von letal verlaufender Ateminsuffizienz bis hin zu milder, nur Ausdauerleistungen beeinträchtigenden Muskelschwäche (2). Die bei einem CMS durch Mutationen veränderten Gene kodieren für Proteine, die eine essentielle Rolle in Aufbau und Funktion der NME spielen. Die CMS können entsprechend ihrer Ursache in prä-, post- und synaptische Formen unterteilt werden (4). Ätiologisch am häufigsten finden sich postsynaptische Defekte, welche die Untereinheiten des Acetylcholinrezeptors (AChR) (*CHRNA1*, *CHRNA1*, *CHRNB1*, *CHRND*, *CHRNE*, *CHRNG*) und seltener die Rezeptorkinetik („slow-channel“- und „fast-channel“-Syndrom) beeinträchtigen. Darunter fällt eine Subgruppe von Strukturproteinen der NME (Agrin, LRP4, MuSK, Dok-7, Rapsyn). Die Acetylcholintransferase (*CHAT*) ist unter den präsynaptischen Defekten am häufigsten von Mutationen betroffen und führt klinisch zu kritischen Apnoeepisoden, die sich oft schon in der Neonatalzeit manifestieren. Seltener werden Defekte in den Enzymen der N-Glykosylierung (*GFPT1*, *DPAGT1*, *ALG2*, *ALG14*) identifiziert (4).

Zur Diagnostik der CMS kommen die klinische Untersuchung, die Elektromyographie (EMG) und die laborchemische Antikörperdiagnostik gegen den AChR zum Ausschluss einer *Myasthenia gravis* zum Einsatz (2,3). Patient*innen mit einem CMS zeigen elektrophysiologisch oft ein Dekrement nach niedrig-frequenter repetitiver Stimulation im EMG, d.h. eine Amplitudenabnahme des Summenaktionspotentials durch eine verminderte Verfügbarkeit aktivierbarer Acetylcholinrezeptoren an der NME und einen erhöhten Jitterwert im Einzelfaser-EMG. Dieser stellt ein Maß für die Variabilität der Latenz zwischen Einzelfaserpotentialen einer motorischen Einheit dar (2,4). Bei einigen Subtypen der CMS zeigen die Patient*innen ein positives Ansprechen auf die intravenöse Gabe von Edrophoniumchlorid durch eine prompt eintretende, kurzzeitige Reduktion der Ptosis und Steigerung der Muskelkraft. Diese auch als „Tensilon-Test“ bekannte Untersuchung wird ebenfalls zur Diagnostik einer *Myasthenia gravis* eingesetzt (2). Auch molekulargenetische Methoden spielen zur Abklärung des Verdachts auf ein CMS

heutzutage eine wichtige Rolle. So kann zum Beispiel eine Mutationssuche mittels WES oder eine Panel-Sequenzierung, d.h. die Hochdurchsatzsequenzierung bestimmter bislang bekannter Krankheitsgene, erwogen werden (2). Aktuell sind für CMS Defekte in mehr als 20 Genen bekannt (4).

Die therapeutischen Möglichkeiten zur Behandlung der CMS sind beschränkt auf symptomatische Therapien, da es bislang keine kausale Therapie gibt. Cholinerge Agonisten wie Pyridostigmin, reversible präsynaptische Kaliumkanalblocker wie 3,4-Diaminopyridin (3,4-DAP), AChR-Blocker wie Fluoxetin und Quinidin und adrenerge Agonisten wie Salbutamol und Ephedrin kommen je nach zugrundeliegender Mutation als Therapeutika in Betracht.

3.1.2 CHD8

Durch die WES konnte ich eine Mutation in dem bislang nicht mit einer CMS assoziierten Gen *CHD8* als Ursache für das CMS unserer Patientinnen identifizieren. Das Gen ist an der chromosomalen Position 14q11.2 lokalisiert. Das Protein liegt durch alternatives Spleißen in zwei langen (262 und 290 kDa) und in einer kurzen Isoform (110 kDa) vor (5). Chromodomain helicase DNA binding protein 8 (CHD8) gehört zur Familie der ATP-abhängigen Chromatin-Remodellierungsenzyme und reguliert über die Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsfaktoren die Genexpression (6). Außerdem spielt CHD8 im kanonischen Wingless-related integration site (WNT)-Signalweg eine Rolle (5,7,8). Die Familie der WNT-Proteine umfasst 19 unterschiedlichen Glykoproteine, die u.a. aus Motoneuronen und Myozyten sezerniert werden (9). Sie sind wichtig für die Regulation von Zellproliferation und -morphologie, Achsenformation und Organentwicklung und können je nach Zusammensetzung von Rezeptoren in eine kanonische und eine nicht-kanonische Signalkaskade unterteilt werden (9). Im kanonischen Signalweg bindet WNT extrazellulär am Frizzled (FZD)-Rezeptor, der seinerseits Dishevelled (DVL) aktiviert und infolgedessen die Phosphorylierung von β -Catenin (β CAT) durch die Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) inhibiert. Normalerweise führt eine Phosphorylierung von β CAT zu dessen proteasomalem Abbau. Die Interaktion von WNT mit dem FZD-Rezeptor stabilisiert β CAT, führt zu dessen Akkumulation im Zellkern und durch seine Bindung an die Promotoren der Zielgene zu deren Aktivierung (10). β CAT ist ein Protein mit multiplen Funktionen. Als Transkriptionsfaktor interagiert es in oben beschriebener Weise mit dem Transkriptionsfaktor 4 (TCF4) und wirkt als Regulator der Genexpression (11). Diese Interaktion führt zur Aktivierung von Enhancer Regionen der Gene für c-Myc und Cyclin-

D1 (7). In Myozyten führt eine kanonische WNT-Aktivierung zu einer verminderten Rapsyn-Expression (12). Rapsyn ist für die Verankerung der postsynaptischen AChR und für die Aufrechterhaltung der synaptischen Architektur verantwortlich (12). CHD8 wurde initial als direkter Interaktionspartner und als negativer Regulator von β CAT entdeckt (5,7). Dabei inhibiert CHD8 die intrazelluläre Bindung von β CAT an den Transkriptionsfaktor TCF4 (7) (**Abbildung 1**). Außerdem antagonisiert CHD8 die Aktivierung der WNT/ β CAT-aktivierten Zielgene (z.B. *MYC*) durch eine Rekrutierung von Histon 1 (H1) (8). Es bindet an die C-terminale Seitenkette des H1 Proteins. Sowohl H1 als auch β CAT interagieren jeweils direkt mit CHD8 (8) und bilden einen trimeren Komplex, mit der Folge einer Gensuppression (8). Diese CHD8-abhängige Regulation ist jedoch zellspezifisch: so wird die WNT/ β CAT-Kaskade in nicht-neuronalen Zellen durch CHD8 negativ und in neuronalen Vorläuferzellen positiv reguliert (13). Neben der Funktion im WNT-Signalweg ist CHD8 in anderen Signalwegen zusätzlich aktiv in der „Chromatin-Remodellierung“, indem es durch Umlagerung von Nukleosomen H1 zu Genpromotoren rekrutiert. H1 als Linker Histon moduliert die Abstände zwischen den Nukleosomen und somit den Kondensationsstatus des Chromatins, was wiederum die Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsfaktoren beeinflusst.

3.1.3 Die neuromuskuläre Endplatte

Um eine mögliche ursächliche Verbindung zwischen CHD8 und den myasthenen Symptomen unserer Patientinnen zu verstehen, möchte ich zunächst die bislang bekannten molekularen Prozesse während der Entwicklung der neuromuskulären Endplatte zusammenfassen. Die Anwesenheit dicht beieinanderliegender AChR in der postsynaptischen Membran ist eine grundlegende Bedingung für eine funktionsfähige NME. Das Rezeptor-Clustering (Rezeptorakkumulation) wird durch multiple prä- und postsynaptische Faktoren präzise kontrolliert. Im nicht-innervierten Muskel führt die extrazelluläre Bindung von WNT an die muskelspezifische Tyrosinkinase (MuSK) und das Low density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4) in der postsynaptischen Membran zur Bildung von „Mikroclustern“ aus Acetylcholin-Rezeptoren im mittleren Anteil von Myozyten zu denen die Motoneurone hingeführt werden (14). Aus den Neuronen sezerniertes Agrin bindet ebenfalls an MuSK und LRP4 und trägt zur vollständigen Ausreifung der AChR-Cluster im dann innervierten Muskel bei (15). Die Cluster werden durch Rapsyn in der Membran verankert (15,16). Des Weiteren interagiert Rapsyn mit β CAT, um über α -Catenin den Komplex am Zytoskelett zu fixieren (17). Insgesamt

herrscht durch Entfernung und Einbau von Rezeptoren ein dynamisches Gleichgewicht aus positiver und negativer Regulation (18). Aus dem Muskel stammendes WNT3a führt über β CAT/GSK3 β zu einer verminderten Expression von Rapsyn, welches seinerseits das Agrin-induzierte AChR-Clustering verhindert (12). Zudem aktiviert Neuregulin von intrazellulär MuSK und trägt zur Modulation des AChR-Clusterings bei (17). Eine fein ausbalancierte Dynamik des AChR-Clusterings ist entscheidend für die synaptische Integrität.

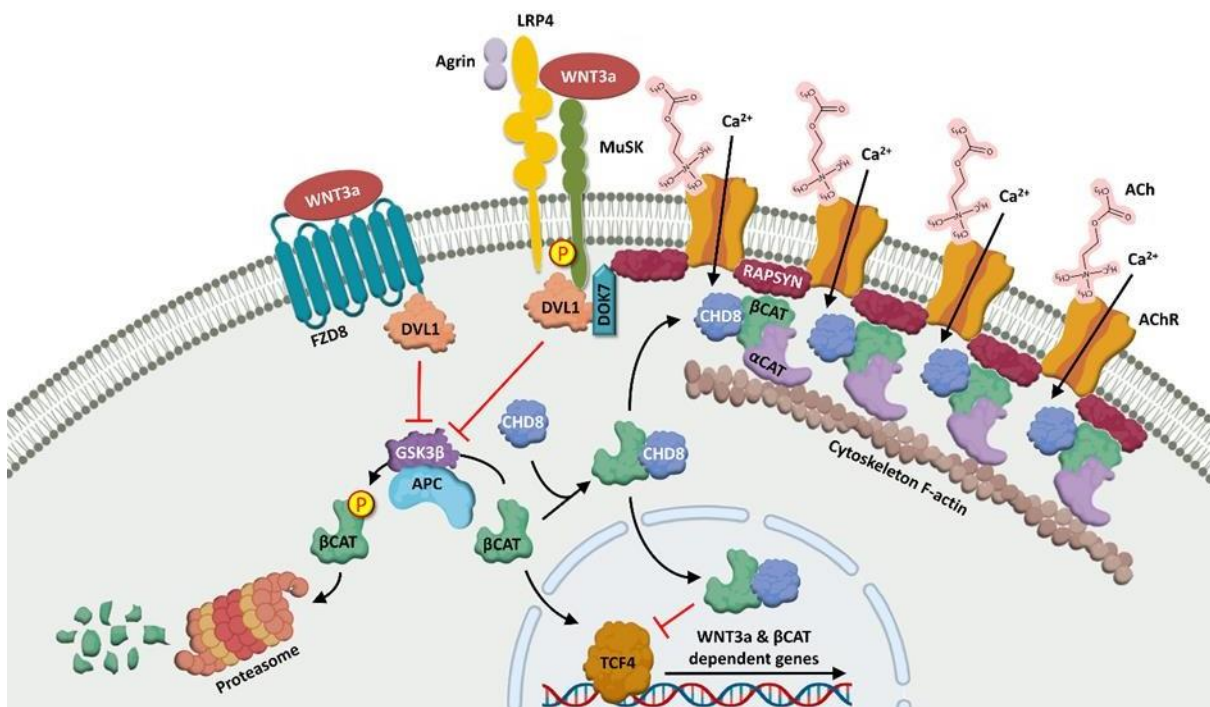


Abbildung 1 Die Abbildung zeigt die kanonische WNT- und LRP4/MuSK-Signalkaskade an der postsynaptischen neuromuskulären Endplatte (NME). β -Catenin (β CAT) akkumuliert im Zytoplasma und wird nach seiner Phosphorylierung durch Glykogensynthase-Kinase 3 β (GSK3 β) proteasomal abgebaut. Die Bindung von WNT3a an Frizzled 8 (FZD8) in der kanonischen WNT-Signalkaskade aktiviert Dishevelled (DVL), welches wiederum die Phosphorylierung von β CAT inhibiert. β CAT transloziert dann in den Nucleus, wo es als transkriptioneller Koaktivator für Transkriptionsfaktor 4 (TCF4) in der Transkription von WNT-abhängigen Zielgenen fungiert. Die Bindung von Agrin und WNT3a an der muskelspezifischen Tyrosinkinase (MuSK) und am Low density lipoprotein receptor-related protein 4 (LRP4) aktiviert DVL und Docking Protein 7 (DOK7), welche via Rapsyn das AChR-Clustering ermöglicht. Rapsyn verknüpft die AChR via α CAT und β CAT mit den F-Aktin-Filamenten des Zytoskeletts. Die Anwesenheit von Chromodomain helicase DNA binding protein 8 (CHD8) im Zytosol und dessen Bindung an β CAT verhindert die Bindung von β CAT an TCF4 und nachfolgend die Expression der Zielgene. Die Hypothese basiert auf der Annahme, dass auch an der NME eine Interaktion zwischen CHD8 und β CAT stattfinden und diese das AChR Clustering sowie die Architektur der NME beeinflussen könnte. Diese Abbildung wurde bereits in dem publizierten Artikel Lee *et al.* 2020 (1) verwendet und für die vorliegende Publikationsschrift übernommen.

3.1.4 Zielsetzung der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit war es, bei monozygoten weiblichen Zwillingen mit einem Symptomkomplex aus Makrozephalie, Hochwuchs und einem myasthenen Syndrom die krankheitsverursachende Mutation zu finden und diese genauer zu charakterisieren. Die Suche erstreckte sich über die bisher bekannten Gene für CMS hinaus, was durch die Hochdurchsatzmethode der Gesamtexomsequenzierung mit vertretbarem zeitlichem und finanziellem Einsatz möglich ist. Durch die Zusammenführung der molekulargenetischen Charakteristika, der bisher bekannten klinischen Phänotypen sowie der Proteinfunktion habe ich aus einer initial sehr langen Liste gefundener Varianten einige wenige Kandidatengene selektiert und ihre Pathogenität eingeschätzt. Dazu habe ich verschiedene Computerprogramme und Datenbanken genutzt.

3.2. Patientinnen Fallberichte

Die Fallberichte werden ausführlich in der Publikation Lee *et al.* (1) dargestellt und daher in der vorliegenden Arbeit nur in komprimierter Form ausgeführt. Die 14-jährigen weiblichen monozygoten Zwillinge sind die ersten Kinder gesunder, nicht konsanguiner, deutscher Eltern. Die Geburt erfolgte bei einem HELLP-Syndrom der Mutter *per Sectio* in der 31+6 SSW und es kam zu postnatalen Komplikationen. Bereits bei Geburt lag eine Makrozephalie mit einem okzipito-frontalen Kopfumfang von 33 cm (>97. Perzentile) vor. Im Säuglingsalter manifestierte sich eine Ptosis, Schwierigkeiten bei der Kopfkontrolle und eine verzögerte motorische Entwicklung mit freiem Laufen erst ab dem Alter von 2,5 Jahren. Das Gangbild verbesserte sich zunächst, wobei die Patientinnen im Alter von 6 Jahren häufiger stolperten und im Schulalter ein schwankendes Gangbild mit innenrotierten Füßen ohne tageszeitabhängige Fluktuation entwickelten. Dies wurde auf eine allgemeine Muskelschwäche zurückgeführt, die sich insbesondere nach Belastung und bei Kälte verstärkte. Auch die Handkraft ließ mit der Zeit nach. Außerdem bestanden seit dem Säuglingsalter gastrointestinale Probleme mit schwerer Obstipation. Bei einer insgesamt altersentsprechenden durchschnittlichen schulischen Leistung zeigten sich bislang bei keiner der Patientinnen kognitive Beeinträchtigungen.

In der körperlichen Untersuchung im Alter von 11,6 Jahren waren Körpergrößen und Kopfumfang jeweils oberhalb der 97. Perzentile. Es bestanden eine bilaterale Ptosis, Hypertelorismus, eine Hypomimie und -phonie. Die Kraftgrade der unteren Extremitäten, insbesondere die Fußhebung, waren gemäß der British Medical Research Council Scale

(MRC) auf 3-4/5 reduziert mit einer Verschlechterungstendenz bei Belastung oder Kälte. Die Zwillinge zeigten eine thorakolumbale Skoliose, eine *valgus* Kniestellung sowie ein unsicheres Gangbild mit innenrotierten Vorfüßen. Repetitive Stimulationen des *N. medianus* und *N. accessorius* ergaben kein Dekrement im Summenaktionspotential des *M. adductor pollicis brevis* und *M. trapezius*. Die Leitgeschwindigkeiten motorischer und sensorischer Nerven lagen im Normbereich. Der Edrophoniumchlorid-Test (fraktionierte intravenöse Injektion von insgesamt 3 mg Edrophoniumchlorid) ergab ein positives Ergebnis (**Abbildungen 2A und 2B**). Die Antikörperdiagnostik für Autoantikörper gegen PQ-Typ-Calcium-Kanal (VGCC), AChR, MuSK und Titin war negativ. Die zur differentialdiagnostischen Abklärung durchgeführten Untersuchungen lieferten keine pathologischen Befunde. Eine Intelligenztestung mittels Kaufmann Assessment Battery for Children II (KAB/C-II) im Testalter von 12 Jahren und 9 Monaten ergab ein durchschnittliches bis leicht unterdurchschnittliches Ergebnis in den einzelnen Kategorien. Bei beiden Patientinnen waren weder Schwierigkeiten in der sozialen Interaktion und Kommunikation noch ein stereotypes, repetitives Verhalten eruierbar, welche charakteristisch für eine Autismus-Spektrum-Störung (ASS) wären. Medikamentös wurde zunächst eine Behandlung mit Pyridostigmin *per os* initiiert, die eine kurzzeitige Besserung des Gangbildes sowie der Belastungstoleranz bewirkte. Jedoch musste die Medikation aufgrund zunehmender Nebenwirkungen wie Hypersalivation bei moderatem therapeutischem Effekt beendet werden. Nach 6 Wochen erfolgte eine Augmentation mit Salbutamol *per os* (0,04 mg/kg KG/d), die aufgrund chronischen Durchfalls als Nebenwirkung abgebrochen werden musste. Unter der Therapie mit 3,4-DAP, Firdapse® zeigten die Patientinnen eine bemerkenswerte klinische Besserung bezüglich der Muskelkraft, des Gangbildes und der Ausdauer. Bei 3,4-DAP handelt es sich um einen reversiblen präsynaptischen Kaliumkanal-Blocker an der NME, der ein verlängertes Aktionspotential durch eine gesteigerte Acetylcholin-Freisetzung bewirkt.

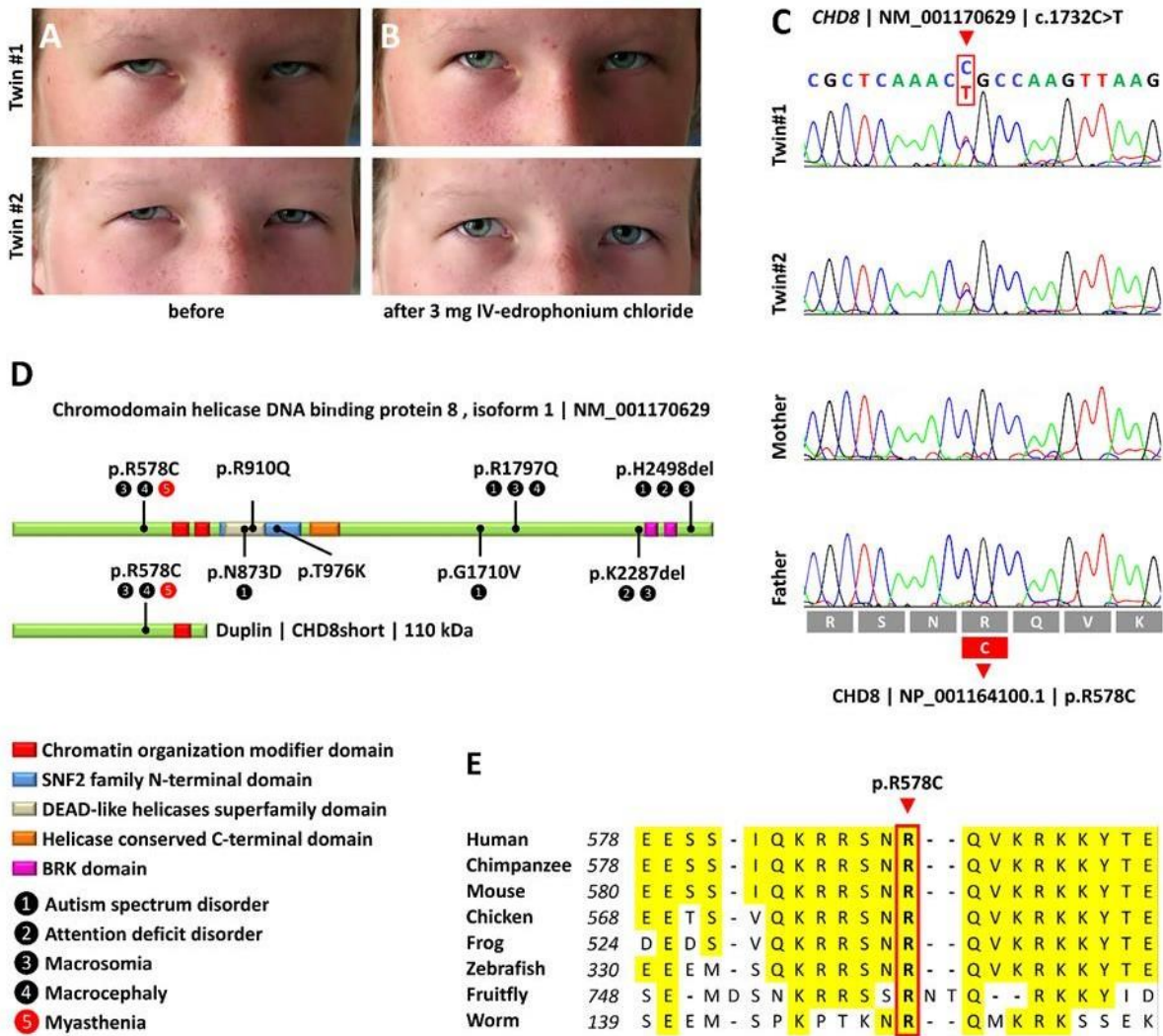


Abbildung 2 Ptosis bei beiden Zwillingen (A) vor und (B) 1 Minute nach der fraktionierten intravenösen Injektion von 3 mg Edrophoniumchlorid. Neben der Verminderung der Ptosis berichteten beide Patientinnen eine subjektive Verbesserung der Augenöffnung und der Handkraft. Der Effekt dauerte nur wenige Minuten an. (C) Elektropherogramm der Sanger-Sequenzierung mit der *de novo missense* Mutation in CHD8 [chr14:g.21,884,051G>A, GRCh37.p11 | c.1732C>T, NM_00117062 | p.(R578C)], die bei den Zwillingen, jedoch nicht bei den gesunden Eltern nachzuweisen war. (D) Lineare Darstellung der Proteindomänen der langen (290 kDa) und kurzen (110 kDa) Isoform (Duplin). Die p.R578C Mutation betrifft beide Isoformen. Die Lokalisationen der anderen publizierten *missense* Mutationen sind ebenfalls markiert. Die Nummerierungen stellen die klinischen Hauptcharakteristika der Patient*innen dar. Die unterschiedlichen Proteindomänen sind farblich gekennzeichnet. (E) Alignment der CHD8 Proteinsequenz unterschiedlicher Spezies. Die mutierte Aminosäure ist bis zu *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm) konserviert. Die Abbildung wurde entnommen aus der Publikation Lee *et al.* 2020 (1).

3.3. Methodik

3.3.1 Exom-Sequenzierung und Evaluation gefundener DNA-Varianten

Um eine mögliche krankheitsverursachende DNA-Veränderung zu detektieren, wertete ich die im Rahmen einer Gesamtexomsequenzierung entstandenen Daten detailliert aus. Technische Details zur Exomsequenzierung finden sich in der Publikation Lee *et al.* (1). Die Datenproduktion und -prozessierung bis hin zur Erstellung der Variant Call Format (VCF)-Datei mit allen detektierten Varianten erfolgte weitgehend automatisiert nach etablierten Protokollen der Arbeitsgruppe. Die erhaltene VCF-Datei enthielt 99,052 Abweichungen von der Referenzsequenz. Zur automatisierten Vorhersage des Krankheitspotentials dieser Varianten habe ich das Computerprogramm *MutationTaster2* (<https://www.mutationtaster.org/>) genutzt. Dabei handelt es sich um eine über das Internet frei zugängliche Anwendung, welche eine Einschätzung der Varianten hinsichtlich ihres krankheitsverursachenden Potentials ermöglicht. Dies erfolgt durch die Zusammenführung von Informationen aus unterschiedlichen Datenbanken und Literaturquellen und die Vorhersage durch einen integrierten Bayes Klassifikator. Dabei werden Kriterien wie der Konservierungsgrad (*via* PhyloP, PhastCons) oder ein möglicher Aminosäureaustausch und dessen Folgen mit einbezogen. Somit kann in Zusammenschau der Symptomkonstellation und der molekularen Informationen eine Bewertung der Variante nach ihrer klinischen Relevanz erfolgen. Durch *MutationTaster2* (<https://www.mutationtaster.org/>, letzter Zugang April 2019) als potentiell krankheitsverursachende („*disease causing*“) eingestufte Varianten habe ich im Anschluss durch verschiedene Filterschritte weiter reduziert und hinsichtlich der Genfunktion und bereits bekannter klinischer Informationen näher untersucht. Dieser Arbeitsschritt erfordert die individuelle Recherche zu den verschiedenen Genen, ihrer Funktion, sowie mutmaßlichen Assoziationen zum Erbgang des vorliegenden Krankheitsbildes und den Symptomen der Patientinnen und kann somit nicht automatisiert werden. Um die Zahl der Kandidatenvarianten weiter zu reduzieren, wendete ich die folgenden Filtermethoden an:

Zunächst erfolgte der erste Filterschritt über den **Phänotyp**, wofür die klinischen Merkmale basierend auf der Human Phenotype Ontology (HPO) eingegeben wurden (**Tabelle 1**). Anhand der folgenden drei Beispiele, sollen die Ausschlusskriterien bei potentiell krankheitsverursachenden Varianten näher betrachtet werden.

| | | | |
|----------|-----------------------|-----------|--|
| HPO:256 | Macrocephaly | HPO:1622 | Premature birth |
| HPO:508 | Ptosis | HPO:1763 | Pes planus |
| HPO:1252 | Muscular hypotonia | HPO:2643 | Neonatal respiratory distress |
| HPO:1270 | Motor delay | HPO:2650 | Scoliosis |
| HPO:1288 | Gait disturbance | HPO:2857 | Genu valgum |
| HPO:1290 | Generalized hypotonia | HPO:3397 | Generalized hypotonia dues to defect at the neuromuscular junction |
| HPO:1324 | Muscle weakness | HPO:30319 | Weakness of facial musculature |
| HPO:1548 | Overgrowth | | |

Table 1 Darstellung der klinischen Merkmale nach Human Phenotype Ontology (HPO), die bei *MutationTaster2* für den Filterschritt nach dem Phänotyp eingegeben wurden.

1.) **AGRN (Agrin)** [chr1:g.679,397G>A, GRCh37.p11 | c.1993G>A, NM_198576 | p.(E665K)]: Agrin stellt ein Strukturprotein der NME dar und spielt eine essentielle Rolle in ihrer Formation (15). Es liegt eine *missense* Mutation (Grantham-Score: 56) in einer hoch konservierten Domäne vor (PhastCons: 1). Mutationen in dem Gen sind assoziiert mit dem autosomal-rezessiv vererbtem CMS Typ 8 (OMIM #615120). Trotz der passenden Klinik, sprechen der heterozygote Trägerstatus unserer Patientinnen in Kombination mit der hohen heterozygoten Frequenz von 0,3321 % (351/105,688) in der Exome Aggregation Consortium (ExAC) Datenbank (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) gegen diese Variante als krankheitsverursachende Mutation. Bei der ExAC Datenbank handelt es sich um eine digitale Sammlung der bislang nachgewiesenen Varianten in Exomen von 60,705 humanen Individuen unterschiedlicher Populationen. Man geht davon aus, sollte eine Variante häufiger in ExAC gelistet sein, diese wahrscheinlicher einem benignen Polymorphismus als einer krankheitsverursachenden Variante entspricht und somit nicht als Ursache einer monogenen Erkrankung infrage kommt. Diese Herangehensweise hilft dabei, harmlose Varianten (Polymorphismen) herauszufiltern und die Menge an näher zu analysierenden Veränderungen zu reduzieren.

2.) **MYH2 (Myosin heavy chain 2)** [chr17:g.10,432,068G>A, GRCh37.p11 | c.3683G>A, NM_001100112 | p.(S1228N)]: Dieses Protein ist in den Muskelfasern Typ 2A exprimiert. Es handelt sich um eine heterozygote *missense* Mutation (Grantham-Score: 46) in einer hochkonservierten Domäne (PhastCons: 1). Die Variante ist bei ExAC mit einer Allelfrequenz von 0,0074 % (9/121368) für den heterozygoten Trägerstatus bekannt. Klinisch sind Mutationen in *MYH2* mit proximaler Myopathie und Ophthalmoplegie (OMIM #605637) assoziiert, welche mit fazialer Muskelschwäche, Ptosis und Kontrakturen einhergeht (19). Obwohl einige Symptome ähnlich sind, wären eher generalisierte muskuläre Symptome mit ggf. einer Erhöhung des Creatinkinase-Wertes im Labor zu

erwarten. Die bekannte Genfunktion des Strukturproteins MYH2 erklärt nicht hinreichend das myasthene Syndrom unserer Patientinnen.

3.) **SH2B1 (SH2B adaptor protein 1)** [chr16:g.28,880,618A>T, GRCh37.p11 | c.1223A>T, NM_001145912 | p.(E408V)]: Dieses Protein ist an vielen Signalkaskaden beteiligt, u.a. mit Insulin (20), Leptin (21) und dem Wachstumshormon (22). Es liegt eine heterozygote *missense* Mutation (Grantham-Score: 121) in einer hoch konservierten Domäne vor (PhastCons: 1) und die Variante ist nicht bei ExAC bekannt. Das 16p11.2-Mikrodeletionssyndrom, bei dem auch *SH2B1* mitbetroffen ist, ist durch mentale Retardierung, Hypotonie und Übergewicht gekennzeichnet (OMIM #613444). Aufgrund der molekularen Merkmale der Variante sowie der Bedeutung des Proteins in vielen Signalkaskaden und einer denkbaren Assoziation mit den Symptomen der Patientinnen, wurde diese Variante in die engere Auswahl genommen und eine Sanger-Sequenzierung zur Segregation der Variante in der Familie durchgeführt. Insbesondere durch die Beteiligung in der Wachstumshormon-Signalkaskade vermutete ich einen Zusammenhang mit dem Hochwuchs der Patientinnen. Aufgrund des heterozygoten Trägerstatus eines Elternteils wurde dieses Gen ausgeschlossen.

Für ein weiteres Filtermodell **basierend auf bekannten genetischen Ursachen** erstellte ich Listen mit Genen, welche (i) in der embryonalen Entwicklung der NME eine Rolle spielen und (ii) für strukturelle Proteine der NME kodieren. Diese Strategie basiert auf der Hypothese, dass die myasthenen Symptome der Patientinnen wahrscheinlich auf Mutationen in Genen zurückzuführen sind, welche für Strukturprotein der NME kodieren oder an der Entwicklung der NME beteiligt sind. Mit diesem Filtermodell konnte ich keine offensichtlich krankheitsverursachende Variante identifizieren. Folgend führe ich beispielhaft drei Gene auf, welche ich aus unterschiedlichen Gründen ausschließen konnte.

1.) **ERBB3 (Erb-B2 Rezeptor Tyrosinkinase 3)** [chr12:g.56,492,196delA, GRCh37.p11 | c.2617-88delA, NM_001982]: Die Tyrosinkinase fungiert als Rezeptor für Neuregulin 1, welche ihrerseits an der Transkription und am Clustering von AChR beteiligt ist (23,24). Es handelt sich um eine heterozygote Deletion, welche im Intron lokalisiert ist und somit keine offensichtlichen Auswirkungen auf die Genexpression hätte. Diese Variante ist nicht bei ExAC bekannt. Klinisch sind Mutationen in diesem Gen mit dem Syndrom der kongenitalen letalen Kontrakturen Typ 2 (OMIM #607598) assoziiert. Die Lokalisation im Intron und die abweichende Symptomatik stellten hier eher Ausschlusskriterien dar.

2.) **LRP8 (Low density lipoprotein receptor-related protein 8)**

[chr1:g.53,793,68_53,793,689insCCGCCG, GRCh37.p11 | c.38_39insCGGGG, NM_001018054]: LRP8 dient als Rezeptor für Reelin sowie für Liganden mit Apoprotein E (25). Neben der neuralen Migration im zentralen Nervensystem (ZNS) bildet es einen Teil der WNT/ β CAT-Signalkaskade (26). Es handelt sich um eine heterozygote Insertion (in frame), da es sich um ein Vielfaches eines Triplets handelt und somit nicht zu einer Verschiebung des Leserasters führt. Die Variante ist in der 5'UTR (5' untranslated region) lokalisiert, welche u.a. als Erkennungssequenz für die Translation fungiert und nicht direkt für die Aminosäuresequenz des entstehenden Proteins kodiert. Diese Variante ist nicht bei ExAC bekannt. Mit einer *coverage* von nur 11 ist der Bereich in ExAC aber eher spärlich abgedeckt. Zudem zeigt das Protein eine geringe Expression im Skelettmuskel (<https://www.proteinatlas.org/>). Folglich stuft ich die mutmaßliche Pathogenität der Variante in Bezug auf den Phänotyp unserer Patientinnen als niedrig ein.

3.) **SYT12 (Synaptotagmin 12)** [chr11:g.66,816,228G>A, GRCh37.p11 | c.1266G>A, NM_177963]: Es handelt sich um ein Phosphoprotein der synaptischen Vesikel, welche die spontane Neurotransmitterfreisetzung Calcium-unabhängig induziert (27). Es liegt eine stumme Mutation vor, da der Basenaustausch aufgrund der Redundanz des Codons nicht zu einem Aminosäureaustausch führt. Diese Variante ist nicht bei ExAC bekannt. Klinisch gibt es bislang keine Krankheitsbilder, welche mit diesem Gen assoziiert sind. Die fehlenden Veränderungen auf der Proteinebene, sowie der bislang unbekanntenen Phänotypen waren Gründe dafür, dass ich diese Variante als wahrscheinliche Krankheitsursache zunächst ausgeschlossen habe.

Im nächsten Schritt kamen ein Filtermodell für einen **dominanten** sowie eines für einen **rezessiven Vererbungsmodus** zum Einsatz. Für das **rezessive Modell** wurden die Varianten nach folgende Kriterien gefiltert: (i) rezessiver Vererbungsmodus (d.h. homozygotes oder *compound* heterozygotes Vorliegen einer potentiell krankheitsverursachenden Variante), (ii) Variante mit einer resultierenden Änderung der Aminosäuresequenz, (iii) Abwesenheit der jeweiligen Variante in homozygoter Form in der ExAC-Datenbank (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) in mehr als 10 Fällen (Homozygotenfrequenz $>1.7 \times 10^{-4}$ bzw. mittlere Allelfrequenz $>8.3 \times 10^{-5}$) [<https://exac.broadinstitute.org>, letzter Zugang am 01.04.2019] oder in mehr als 4 Fällen im 1000 Genom Projekt [<http://www.1000genomes.org>, letzter Zugang am 01.04.2019]. Im **dominanten Modell** wurde folgendermaßen gefiltert: (i) dominanter

Vererbungsmodus, (ii) nicht-synonyme DNA-Variante, (iii) Abwesenheit der jeweiligen Variante in der ExAC [<https://gnomad.broadinstitute.org/>, letzter Zugang am 01.04.2019] oder im 1000 Genom Projekt [<http://www.1000genomes.org>, letzter Zugang am 01.04.2019]. Beim rezessiven Filtermodell verblieb zum Schluss eine Variante in einem Gen.

1.) **SLAIN1 (SLAIN motif family member 1)** [chr13:78,272,267_78,272,268insGG, GRCh37.p11 | c.219_220insGG, NM_001242868]: Es handelt sich um ein Protein, welches die Dynamik der Mikrotubuli reguliert (28). Die vorliegende homozygote Insertion mit einer Verschiebung des Leserasters (*frameshift*) führt durch ein vorzeitiges Stopcodon zu einem *Nonsense-mediated mRNA Decay*, bei der eine fehlerhafte Proteinexpression verhindert wird. Diese Variante ist nicht bei ExAC bekannt. Klinische Assoziationen mit diesem Gen wurden bislang nicht beschrieben. Durch die Proteinfunktion konnte der Phänotyp unserer Patientinnen nicht hinreichend erklärt werden, sodass diese Variante ausgeschlossen wurde.

Im **dominanten Modell** erfüllten 68 Varianten in 37 Genen die geforderten Kriterien, die auch *CHD8* umfassten.

1.) **TBP (TATA-box binding protein)** [chr6:g.170,871,013_170,871,014insCAG, GRCh37.p11 | c.189_190insCAG, NM_003194]: Es handelt sich um den Transkriptionsfaktor TFIID (Transkriptionsfaktor II D), der durch seine Bindung an die TATA-Box die Transkription initiiert (29). Es liegt eine heterozygote Insertion (*in frame*) vor. Triplett-Repeats in diesem Gen sind assoziiert mit autosomal-dominant vererbter spinocerebellärer Ataxie 17 (OMIM #607136), welche mit extrapyramidalen Symptomen, kognitiver Beeinträchtigung und epileptischen Anfällen einhergeht. Der TBP/TFIID-Komplex spielt u.a. eine Rolle in der Aktivierung von muskelspezifischer Genexpression (30). Aufgrund der diskrepanten Symptomatik sowie der für den beschriebenen Phänotyp der spinocerebellären Ataxie notwendigen starken Erhöhung der Anzahl der Triplett-Repeats, die jedoch bei unseren Patientinnen nicht vorlag, ist die Pathogenität der vorliegenden Variante als gering einzustufen.

2.) **SLC38A6 (Solute carrier family 38 member 6)** [chr14:g.61,612,793A>G, GRCh37.p11 | c.833A>G, NM_153811 | p.(K278R)]: Es liegt eine *missense* Mutation (Grantham-Score: 26) vor. Über das Gen ist nur sehr wenig bekannt. Es kodiert für einen Natrium-abhängigen Aminosäure-/Proton-Antiporter. Das Protein interagiert mit

Synaptotagmin und SNAP25 (Synaptosomal-associated protein, 25 kDa) des SNARE (SNAP receptor)-Komplexes und ist im Glutaminzyklus der exzitatorischen Neuronen beteiligt (31). Das Gen wird vor allem im ZNS exprimiert, mit jedoch auch geringfügiger Expression im Skelettmuskel. Bislang wurden keinerlei klinische Assoziationen mit Mutationen in diesem Gen beschrieben. Ebenfalls gibt es keine Erkenntnisse aus Tierversuchen zu phänotypischen Konsequenzen von Mutationen in SLC37A6. Aufgrund der Expression hauptsächlich im ZNS, mit der sich der muskuläre Phänotyp der Patientinnen nicht erklären lässt, und bei ansonsten gänzlich fehlenden klinischen Informationen, schloss ich die Variante in diesem Gen als potentielle krankheitsverursachende Mutation aus.

Die diskutierten Varianten der jeweiligen Filtermodelle habe ich als Übersicht in der **Tabelle 2** zusammengefasst.

In der Zusammenschau der molekularen Genfunktion und dem klinischen Phänotyp kamen zwei Varianten in den Genen *CHD8* und *SH2B1* in die engere Auswahl. Um sicherzustellen, dass die gefundenen Varianten nicht auf Fehlern in der Verarbeitung der Sequenzierungsdaten beruhten, habe ich zunächst die Alignments der Varianten der engeren Auswahl mittels Integrative Genomics Viewer (IGV) Software (<https://software.broadinstitute.org/software/igv/>) manuell visualisiert. Mithilfe des IGVs kann der Datensatz gegen ein Referenzgenom auf Übereinstimmungen oder Abweichungen analysiert werden, aber auch eine gezielte Suche nach der Basensequenz auf einem bestimmten Locus erfolgen. Im Anschluss untersuchte ich die Segregation innerhalb der Familie mit Hilfe der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) und anschließender automatisierter Sanger-Sequenzierung (**Abbildung 2C**). Zur Bestätigung der *CHD8* Variante benutzte ich folgende Oligonukleotid-Primer: FW 5'-TTC ATG AAA ATT TTG GAG TAG AAT C-3', REV 3'-GGA ATC TCT CGA GCC TCG GA-5' (Produktlänge: 320 bp). Für die *SH2B1* Variante nutzte ich folgende Oligonukleotid-Primer: FW 5'-TTC ATG AAA ATT TTG GAG TAG AAT C-3', REV 3'-CAT TCG ACA TTT GAG TTT ACT AAA GT-5' (Produktlänge: 234 bp).

Die Variante in *SH2B1* konnte ich nach der Sanger-Sequenzierung als Krankheitsursache ausschließen, da sie auch bei dem Vater der Patientinnen in heterozygoter Form zu finden war. Da der Vater gesund ist, kann diese Variante in heterozygoter Form als Krankheitsursache ausgeschlossen werden.

| GENE | GENE NAME | OMIM | MOI | OMIM DISEASE NAME | ENSEMBL TRANSCRIPT | CHR | POS | VARIANT | AAE | COVERAGE | gnomAD | | |
|----------------|---|---------|--------|--|--------------------|-----|-------------|-----------|----------|----------|---------------|-----|-----|
| | | | | | | | | | | | Total alleles | Het | Hom |
| AGRN | Agtrin | #615120 | AR | Congenital myasthenic syndrome 8 | ENST00000379370 | 1 | 979,397 | G>A | p.E665K | 162 | 272,220 | 349 | 2 |
| MYH2 | Myosin heavy chain 2 | #605637 | AD, AR | Proximal Myopathy and Ophthalmoplegia | ENST00000397183 | 17 | 10,432,068 | C>T | p.S1228N | 176 | 251,456 | 9 | 0 |
| SH2B1 | SH2B adaptor protein 1 | #613444 | SM | 16p11.2 deletion syndrome | ENST00000337120 | 16 | 28,880,618 | A>T | p.E408V | 190 | 251,390 | 0 | 0 |
| ERBB3 | Erb-b2 receptor tyrosine kinase 3 | #607598 | AR | Lethal congenital contracture syndrome | ENST00000267101 | 12 | 56,492,196 | delA | | 22 | 32,118 | 0 | 0 |
| LRP8 | LDL receptor related protein 8 | | | | ENST00000371454 | 1 | 53,793,689 | insCCGCCG | | 11 | 24,652 | 0 | 0 |
| SYT12 | Synaptotagmin 12 | | | | ENST00000527043 | 11 | 66,816,228 | G>A | | 68 | 248,816 | 0 | 0 |
| TBP | TATA-box binding protein | #607136 | AD | Spinocerebellar ataxia 17 | ENST00000392092 | 6 | 170,871,014 | insCAG | p.-58Q | 38 | 22,990 | 0 | 0 |
| SLC38A6 | Solute carrier family 38 member 6 | | | | ENST00000267488 | 14 | 61,512,793 | A>G | p.K278R | 63 | 247,008 | 0 | 0 |
| CHD8 | Chromodomain helicase DNA-binding protein 8 | #617032 | AD | Autism, susceptibility to, 18 | ENST00000557364 | 14 | 21,884,051 | G>A | p.R578C | 150 | 248,278 | 0 | 0 |

Tabelle 2 Eine Auswahl an Varianten, welche durch die Software MutationTaster2 als potentiell krankheitsverursachend eingestuft wurden. MOI: mode of inheritance; AD: autosomal dominant; AR: autosomal recessive; SM: spontaneous mutation; AAE: amino acid exchange.

3.3.2 Western Blot

Zur Untersuchung, ob sich die detektierte DNA-Veränderung auf die Menge des CHD8 Proteins in der Zelle auswirkt, habe ich CHD8 mithilfe der Western Blot Technik visualisiert. Zunächst habe ich Fibroblasten der Patientinnen sowie gesunder Kontrollen nach einem standardisierten Protokoll geerntet und Proteine aus Zelllysaten extrahiert. Anschließend führte ich einen Western Blot mit folgenden Antikörpern durch:

1. Primärer Antikörper: anti-CHD8 polyclonal rabbit (ab84527, Abcam, Cambridge, UK, Verdünnung 1:500) mit Inkubation bei 4°C über Nacht
2. Sekundärer Antikörper: Goat anti-rabbit (IgG-HrP, AlexaFluor 488, AlexaFluor568, Verdünnung 1:2.000) mit einstündiger Inkubation bei Raumtemperatur.

3.3.3 Immunofluoreszenz-Färbungen

Zur genaueren Darstellung der subzellulären Lokalisierung des CHD8 Proteins führte ich verschiedene Immunofluoreszenz-Färbungen durch.

3.3.3.1 CHD8/Golgin-97-Immunofluoreszenz von Fibroblasten der Patientinnen und Kontrollen

Die Fibroblasten der Patientinnen und Kontrollen wurden auf runden Deckgläschen mit einem Durchmesser von 12 mm nach einem standardisierten Protokoll vorbereitet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primären anti-CHD8 (ab114126; Abcam, Cambridge, UK, 1:50 Verdünnung, der Antikörper erkennt die Aminosäuren 604–629 von humanem CHD8, NP_001164100.1) und anti-Golgin-97 Antikörpern (sc-73619, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA, 1:100 Verdünnung) bei 4°C über Nacht und die Zugabe der sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörper (AlexaFluor488, AlexaFluor568) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Zellkerne wurden mit DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) markiert. Die visuelle Darstellung erfolgte mit dem 100x Objektiv unter einem Leica DMI 4000B Mikroskop.

3.3.3.2 CHD8/Rapsyn-Immunofluoreszenz von Kontroll-Muskelschnitten

Humane Muskelkryoschnitte von Kontrollprobanden habe ich nach einem standardisierten Protokoll vorbereitet. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primären anti-CHD8 (Abcam, ab114126, 1:100 Verdünnung) und anti-Rapsyn Antikörpern (Santa Cruz Biotechnology Inc., sc-58585, 1:50 Verdünnung) bei 4°C über Nacht und die Zugabe der sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörper (AlexaFluor488, AlexaFluor568) für

eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Zellkerne wurden mit DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) markiert.

3.3.3.3 CHD8/Rapsyn/Dystroglycan-Immunofluoreszenz von Kontroll-Muskelschnitten

Humane Muskelkryoschnitte von Kontrollprobanden habe ich nach einem standardisierten Protokoll vorbereitet wie in der Publikation detailliert beschrieben. Anschließend erfolgte die Inkubation mit primären anti-CHD8- (ab84527, Abcam, Cambridge, UK, 1:5 Verdünnung), anti-Rapsyn (sc-58585, Santa Cruz Biotechnology Inc., Dallas, Texas, USA, 1:50 Verdünnung) und anti-Dystroglycan (AF6868, R&D Systems, Minneapolis, Minnesota, USA, Verdünnung 1:30) Antikörpern und die Zugabe der sekundären Fluoreszenz-markierten Antikörper (AlexaFluor647, AlexaFluor488, AlexaFluor568) für eine Stunde bei Raumtemperatur. Die Zellkerne wurden mit DAPI (Vector Laboratories, Burlingame, California, USA) dargestellt.

3.3.3.4 CHD8/Rapsyn/ β CAT-Immunofluoreszenz auf einzelnen Muskelfasern und Kontroll-Muskelschnitten einer *DMD*^{EGFP}-Maus

Diese Färbung erfolgte auf einer Einzelmuskelfaser sowie Muskelschnitten einer *DMD*^{EGFP}-Maus. Die Vorbereitung und Färbung der Muskelfasern erfolgte dank einer arbeitsgruppen-internen Kooperation durch eine erfahrene und spezialisierte Kollegin (Dr. rer. nat. Mina Petkova) und wird detailliert in der Publikation Lee *et al.* (1) beschrieben. Da die Ergebnisse wichtig sind für die Weiterentwicklung meiner Hypothese, werde ich sie im Verlauf vorstellen und möchte an dieser Stelle kurz auf den genetischen Hintergrund eingehen. Die Maus verfügt über eine EGFP-Insertion im *DMD*-Gen, welches für Dystrophin, einem sarkolemmalen Protein zur strukturellen Verbindung zwischen Zytoskelett und der extrazellulären Matrix (ECM), kodiert. Die endogene EGFP-Expression ermöglicht eine Darstellung des Dystrophins bis zur Ebene einzelner Muskelfasern ohne eine immunhistochemische Färbung (32). Dies stellt einen erheblichen Vorteil dar, sowohl in der Qualität der generierten Ergebnisse als auch in Bezug auf den erforderlichen Arbeitsaufwand.

3.4 Ergebnisse und Diskussion

3.4.1 Ergebnisse der Exomsequenzierung

Im WES-Datensatz fand ich eine heterozygote *de novo* Variante im *CHD8* Gen [chr14:21,884,051G>A, GRCh37.p11; c.1732C>T, ENST00000430710]. Um die mögliche Pathogenität von DNA-Sequenzvarianten unabhängig vom Untersucher möglichst einheitlich zu beurteilen, gibt es verschiedene Kriterien, die in den *Standards and Guidelines for the Interpretation of Sequence Variants* des American College of Medical Genetics and Genomics (33) zusammengefasst sind. Die detektierte Variante im *CHD8* Gen kann diesen Kriterien folgend als „*likely pathogenic*“, also wahrscheinlich krankheitsverursachend, klassifiziert werden. Auf Proteinebene führt diese Mutation zu einem Austausch von Arginin zu Cystein (p.Arg578Cys) in der Glutamin-reichen Domäne des CHD8 Proteins. Die Variante wurde von uns in der NCBI ClinVar Datenbank unter der Varianten-ID 870572 hinterlegt.

3.4.2 Ergebnisse des Western Blots

Der Western Blot mit aus Fibroblasten der Patienten und Kontrollen extrahiertem Protein gestaltete sich aufgrund der molekularen Größe von CHD8 (290 kDa) schwierig. Trotz wiederholter Versuche nach unterschiedlichen Protokollen waren die Ergebnisse nicht zufriedenstellend und ungeeignet, um eine weiterführende densitometrische semi-quantitative Messung durchzuführen. Unerwartete Weise zeigten sich zwei Banden bei etwa 90 kDa und 110 kDa anstatt bei der nach Herstellerangaben erwarteten Größe von 290 kDa. Ich vermute, dass diese Bande die kurze Isoform des Proteins (Duplin) mit einer Länge von etwa 740 Aminosäuren darstellt. Die Banden könnten allerdings auch durch eine unspezifische Bindung des Antikörpers an andere Zellproteine entstanden sein. In der ebenfalls mitgeführten Muskelkontrolle waren gar keine Banden sichtbar. Der Unterschied könnte durch den Gewebeunterschied zwischen Fibroblasten und Muskelzellen bedingt sein. Ein optischer Vergleich der Bandenstärke der Patientin und den Kontrollen zeigte keinen Unterschied. Aufgrund der molekularen Größe des Proteins war der Transfer auf die Membran mit der hierfür verwendeten Semi-dry Methode erschwert. Für Proteine mit einer sehr hohen molekularen Größe wären Methoden wie der Wet-blot besser geeignet, diese waren aber in unserem Labor nicht etabliert. Zudem ist es auch nicht ausgeschlossen, dass der kommerziell erhältliche Antikörper nicht im Western Blot funktioniert, da er vom Hersteller nur für die Anwendung in der

Immunhistologie verkauft wird. Aufgrund der Art der Mutation (*missense*) war jedoch auch nicht unbedingt quantitativer Unterschied zwischen den Proben unserer Patientinnen und der Kontrollen zu erwarten, was sich später auch in der Immunfärbung bestätigte (siehe unten).

3.4.3 Ergebnisse der Immunfluoreszenz-Färbungen

3.4.3.1 CHD8/Golgin-97-Immunfluoreszenz von Fibroblasten der Patientinnen und Kontrollen

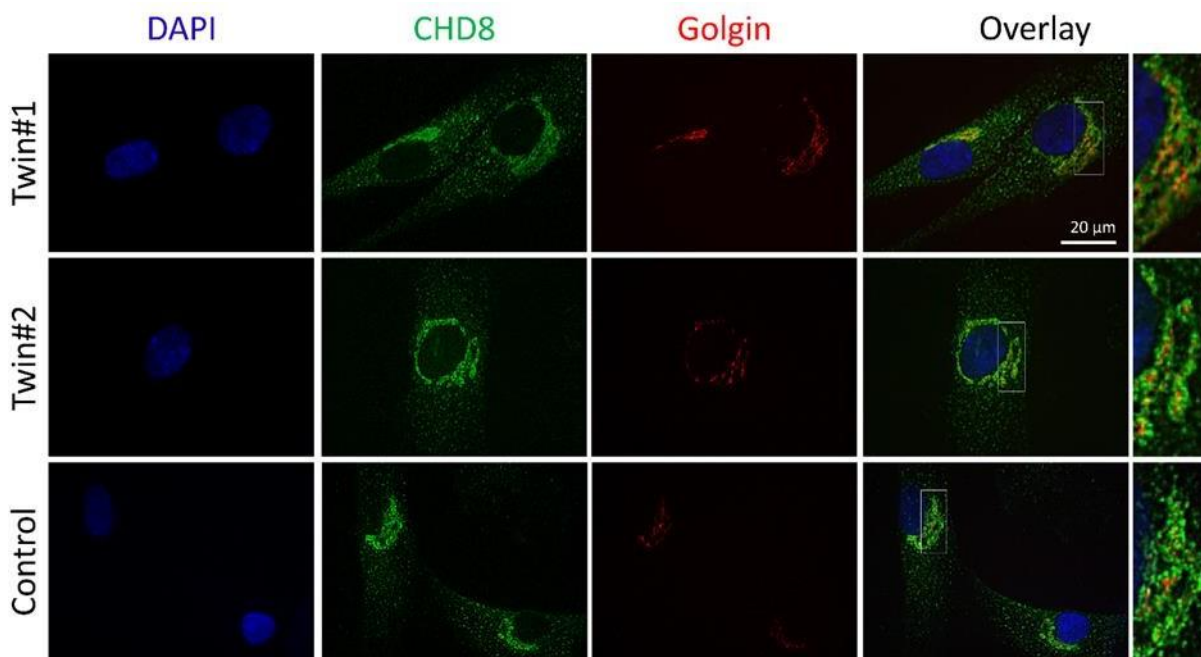


Abbildung 3 CHD8/Golgin-Immunfluoreszenz-Färbungen von Fibroblasten der Patientinnen und der Kontrolle zeigen eine diffuse zytoplasmatische Verteilung des CHD8 mit einer deutlichen Anreicherung um den Golgi-Apparat. Es sind keine Unterschiede zwischen den Patientinnen und der Kontrolle ersichtlich. Rechts ist das Areal innerhalb der Box in Vergrößerung dargestellt. Diese Abbildung wurde bereits in dem publizierten Artikel Lee *et al.* 2020 (1) verwendet und für die vorliegende Publikationsschrift übernommen.

Um eine mutationsbedingte fehlerhafte intrazelluläre Lokalisierung von CHD8 in Zellen der Patientinnen auszuschließen, führte ich eine Immunfluoreszenz-Färbung mit einem Antikörper gegen CHD8 sowie gegen Golgin, einem Protein des Golgi-Apparates, durch. Es zeigte sich eine diffuse intrazelluläre Verteilung des CHD8 Proteins im Zytoplasma mit einer besonders hohen Dichte rund um den Nukleus sowohl in Hautfibroblasten gesunder Kontrollen als auch der Patientinnen. Zudem konnte eine Kolo-kalisation von CHD8 mit dem Golgi-Apparat dargestellt werden. Die perinukleäre Lokalisierung von CHD8 in der Region des Golgi-Apparates wurde zuvor bereits bei immunhistochemischen Färbungen humaner Adenokarzinomzellen beschrieben (34). In der Zusammenschau zeigten sich

keine mutationsbedingten Unterschiede in der subzellulären Lokalisation des CHD8 Proteins in Fibroblasten (**Abbildung 3**).

3.4.3.2 CHD8/Rapsyn-Immunofluoreszenz von Kontroll-Muskelschnitten

Aufgrund der muskulären Symptomatik unserer Patientinnen interessierte mich die Expression und intrazelluläre Lokalisation von CHD8 in Muskelzellen. Hier stellte sich speziell die Frage, ob CHD8 eine Rolle im Bereich der NME spielen könnte. Da keine Muskelbiopsien unserer Patientinnen verfügbar waren und diese rein zu Forschungszwecken aus ethischen Gründen auch nicht durchführbar sind, habe ich die CHD8-Expression in der Skelettmuskulatur auf Muskelschnitten gesunder Kontrollen untersucht. Zur spezifischen Darstellung der NME wurde das „Markerprotein“ Rapsyn angefärbt, welches sich an der intrazellulären Seite der NME befindet. Die CHD8-Expression verteilte sich erneut diffus im Zytoplasma, allerdings mit einer besonders hohen Dichte im Bereich der NME (**Abbildung 4**).

3.4.3.3 CHD8/Rapsyn/Dystroglycan-Immunofluoreszenz von Kontroll-Muskelschnitten

In einem weiteren Schritt führte ich eine Dreifachfärbung gegen CHD8, Rapsyn und Dystroglycan (α - und β -Untereinheit) durch. Dystroglycan ist ein transmembranöses Strukturprotein zwischen der ECM und dem Zytoskelett (u.a. Aktin, Dystrophin) sowie ein Rezeptorprotein für extrazelluläre Liganden bestehend aus einer extrazellulären α - und einer transmembranösen β -Untereinheit. Mit Hilfe seiner Anfärbung kann die Zellmembran der Myozyten dargestellt werden. Die Dreifach-Immunofluoreszenz ergab analog zur CHD8/Rapsyn-Immunofluoreszenz eine Anordnung der Färbungen entsprechend einer intrazellulären Kolo-kalisation des CHD8 mit den beiden oben genannten Proteinen der NME.

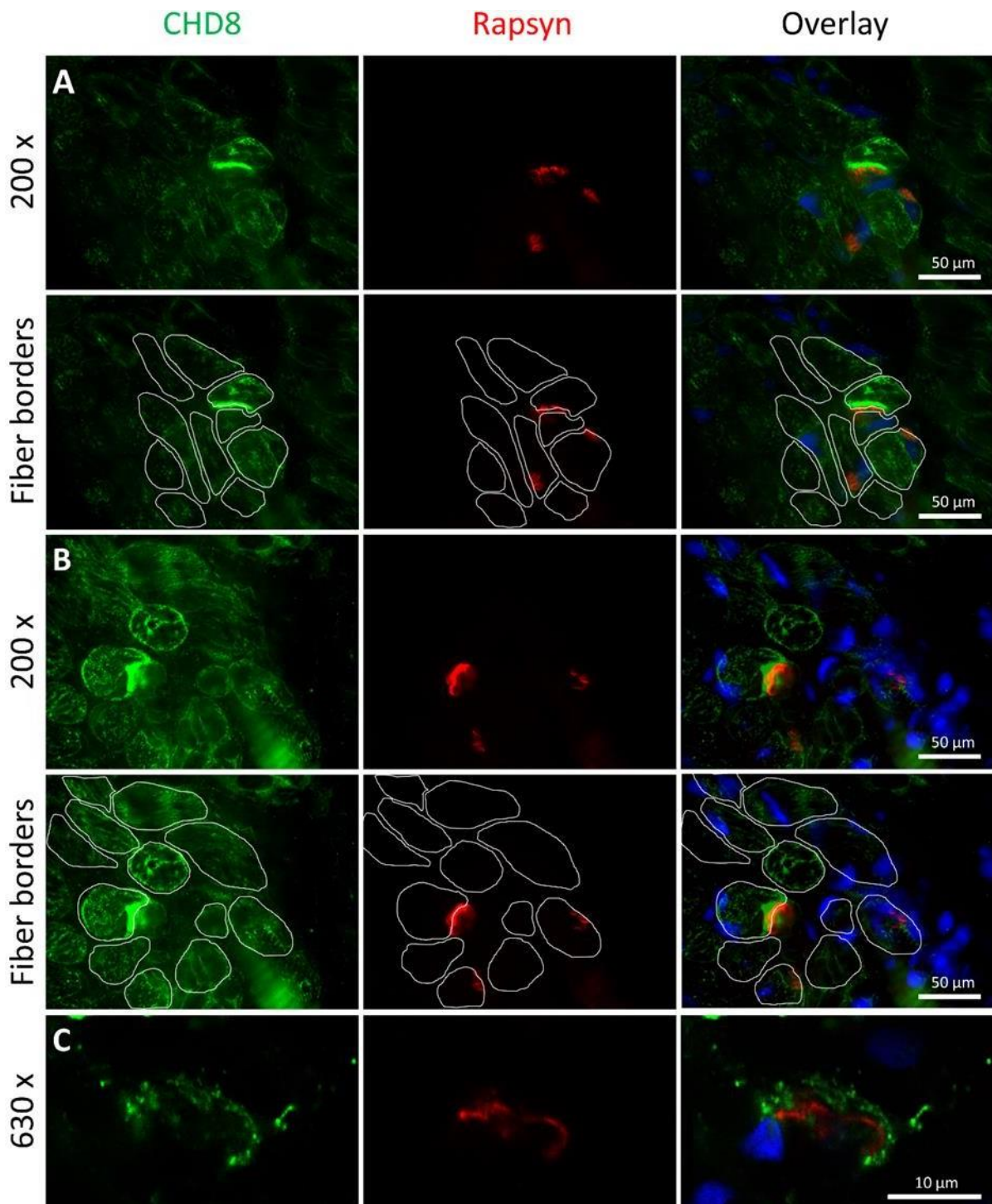


Abbildung 4 CHD8/Rapsyn-Immunofluoreszenz-Färbungen des *Musculus deltoideus* vom Menschen zeigen eine Kolokalisation des CHD8/Duplin und Rapsyn an der neuromuskulären Endplatte (NME). (A, B) Das grüne CHD8/Duplin-Signal war gesprenkelt im gesamten Zytoplasma mit stärkerer Anreicherung auf der sarkoplasmatischen Seite des Rapsyn-Signals zu vermerken. Die weißen Linien kennzeichnen die sarkoplasmatische Membran zur besseren Abgrenzung der Zellgrenzen. (C) Eine vergrößerte Darstellung des eng beieinanderliegenden Signals von CHD8 und Rapsyn an der NME. Die Zellkerne sind mit DAPI (blau) markiert. Diese Abbildung wurde bereits in dem publizierten Artikel Lee *et al.* 2020 (1) verwendet und für die vorliegende Publikationsschrift übernommen.

3.4.3.4 CHD8/Rapsyn/ β CAT-Immunofluoreszenz auf Muskelfaser und Kontroll- Muskelschnitten einer DMD^{EGFP}-Maus

Zur Beurteilung der exakten intrazellulären Lokalisation von CHD8 wurden Immunfluoreszenz-Färbungen auf einzelnen Muskelfasern der Maus durchgeführt. Die spezielle Methode der Einzelfaserextraktion wurde von einer Kollegin der Arbeitsgruppe entwickelt und ebenso wie die Immunfluoreszenzfärbung der Muskeinzelfasern im Rahmen einer arbeitsgruppen-internen Kooperation von Kolleg*innen für mein Projekt durchgeführt. Die Immunfluoreszenz ergab eine weite Verteilung des CHD8 im Sarkoplasma mit einem verstärkten Signal an der NME. Rapsyn und Dystrophin sind ebenso an der NME zu sehen. β CAT kolokalisiert direkt angrenzend zu CHD8 (Abbildung 5).

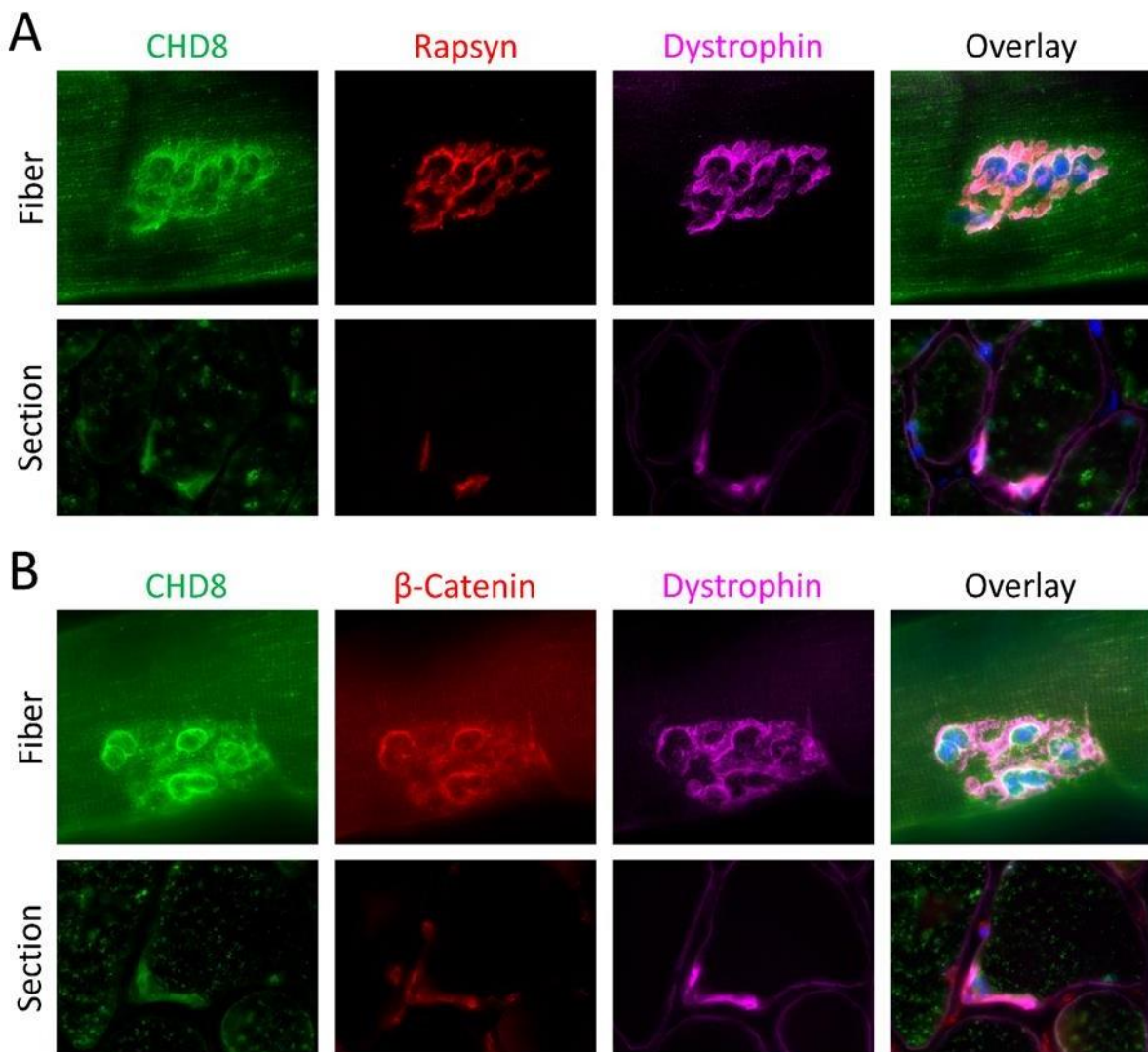


Abbildung 5 (A) CHD8/Rapsyn/Dystrophin und (B) CHD8/ β -Catenin (β CAT)/Dystrophin Immunofluoreszenz-Färbungen der isolierten Mausmuskelfaser vom *Musculus extensor digitorum longus* und Muskelschnitten des *Musculus quadriceps*. (A, B) Das grüne CHD8/Duplin-Signal war gesprenkelt im Zytoplasma nachweisbar mit einer hohen Dichte an der neuromuskulären Endplatte (NME), welche mit dem roten Rapsyn-Signal markiert ist. Der Antikörper gegen CHD8 erkennt die Aminosäuren 604-629 in Nachbarschaft zur Mutation in der N-terminalen Domäne des CHD8/Duplin. Das Dystrophin-Signal (Magenta) kennzeichnet die sarkoplasmatische Membran und ist ebenfalls an der NME angereichert. (B) β CAT kolokalisiert direkt angrenzend zu CHD8/Duplin an der NME. Darüber hinaus erkennt der Antikörper gegen β CAT auch das nukleär lokalisierte β CAT. Die Zellkerne wurden mit DAPI markiert und sind in blau dargestellt. Diese Abbildung wurde bereits in dem publizierten Artikel Lee *et al.* 2020 (1) verwendet und für die vorliegende Publikationsschrift übernommen.

3.4.4 Diskussion

Mithilfe von WES identifizierte ich eine dominante Spontanmutation im *CHD8* Gen zweier unserer Patientinnen. Die monozygoten Zwillinge leiden unter einem angeborenen Myasthenie-Syndrom mit Muskelschwäche, Ptosis, Makrozephalie und Hochwuchs. Ich führte verschiedene Laborexperimente durch, um die Präsenz der Mutation zu bestätigen und diese weiter zu charakterisieren. Ich konnte zeigen, dass CHD8 in humanen Muskelschnitten verstärkt an der NME zu finden ist und hier zwischen Rapsyn und β CAT lokalisiert ist. Dieses Ergebnis konnte auch in Einzelmuskelfasern aus der Maus bestätigt werden. Bislang war keine Assoziation zwischen Myasthenie und Mutationen in diesem Gen bekannt, insofern erweitert das Ergebnis dieser Arbeit das Wissen über den klinischen Phänotyp und mutmaßliche molekulare Funktionen von CHD8.

Folgende Argumente stützen meine Hypothese, dass die bei unseren Patientinnen gefundene Variante c.1732C>T krankheitsverursachend ist:

1. Es handelt sich um eine Spontanmutation, die nicht in der gnomAD-Datenbank aufgeführt wird. Die gnomAD-Datenbank beinhaltet 17,2 Millionen Varianten von 125,748 Exomen und 261,9 Millionen Varianten von 15,708 Genomen von nicht-verwandten Individuen unterschiedlicher Herkunft. Diese ist im Browser frei zugänglich: <https://gnomad.broadinstitute.org/>.
2. Das mutierte Codon (CGC>TGC, p.Arg578Cys) ist sowohl auf der DNA- als auch auf der Aminosäureebene hochkonserviert. Diese Information wurde aus *MutationTaster2* entnommen und beziffert sich bei dieser Variante einem PhyloP-Wert von 5,2 und einem PhastCons-Wert von 1, was einem hohen evolutionären Konservierungsgrad dieser Aminosäure entspricht (**Abbildung 2E**).
3. Der Austausch eines Arginins zu einem Cystein ersetzt eine basische, positiv geladene Seitenkette durch eine schwefelhaltige Thiolgruppe. Dieser Austausch ist aufgrund der unterschiedlichen bio-physikochemisch Eigenschaften der Seitenketten

als funktionell relevant zu betrachten, was sich ausdrückt durch einen relativ hohen Grantham-Score von 180. Obwohl die Immunofluoreszenz-Färbungen keine Unterschiede in der subzellulären Lokalisation in Hautfibroblasten zwischen Patientinnen und nicht betroffenen Kontrollen darstellten, könnte die Proteinfaltung und somit die Interaktion mit den Bindungspartnern verändert sein. Ebenfalls möglich ist ein gewebespezifischer Pathomechanismus, der in Hautzellen nicht evident ist.

4. Der Phänotyp unserer Patientinnen und der Patient*innen mit *CHD8*-assoziertem ASS überschneidet sich hinsichtlich der charakteristischen Merkmale wie Makrozephalie und Hochwuchs.
5. Andere ursächliche Mutationen in bekannten Genen für das CMS (35 Gene) und Hochwuchs (14 Gene) konnten ausgeschlossen werden (**Tabelle 3**).

| | |
|-------------------------------------|---|
| 1. CMS (n=35) Version 1.35 | <i>AGRN, ALG14, ALG2, CACNA1A, CHAT, CHRNA1, CHRNB1, CHRND, CHRNE, CHRNG, COL13A1, COLQ, DOK7, DPAGT1, GFPT1, GMPPB, LAMA5, LAMB2, LRP4, MUSK, MYO9A, PLEC, PREPL, RAPSN, RYR1, SCN4A, SLC18A3, SLC25A1, SLC5A7, SNAP25, SYT15, SYT2, TOR1AIP1, UNC13A, VAMP1</i> |
| 2. Hochwuchs (n=14), Version 1.7 | <i>AKT1, AKT2, AKT3, CCND2, CDKN1C, HRAS, KRAS, MTOR, NRAS, PIK3CA, PIK3R2, PTEN, RASA1, TBC1D7</i> |

Tabelle 3 Diese Genzusammenstellungen wurden von der Genomics England PanelApp heruntergeladen, welche alle Gene mit einer hohen, mittleren und niedrigen Evidenz einer Assoziation zum genannten Phänotyp beinhalten (<https://panelapp.genomicsengland.co.uk>, letzter Zugang am 19. Mai 2019).

6. Nach dem Standard und den Leitlinien für die Interpretation von DNA-Varianten des *American College of Medical Genetics and Genomics* kann diese Variante als „*likely pathogenic*“ eingestuft werden. Sie ist nicht nachweisbar bei den Eltern (PS2), nicht in der gnomAD-Datenbank gelistet (PM2), Mutationen im vermuteten Gen sind als Ursache für ähnliche Phänotypen bekannt (PP4) und die Ergebnisse computergestützter Methoden zur Analyse des Krankheitspotentials der Variante stützen die Hypothese der Kausalität der Mutation (PP3). Die Kategorisierung nach dem oben genannten Standard erleichtert eine einheitliche Einschätzung von DNA-Sequenzvarianten über die Grenzen von Arbeitsgruppen und lokalen Gepflogenheiten hinweg. Dazu werden die zutreffenden Kriterien summiert und in die Kategorien „*pathogenic*“, „*likely pathogenic*“, „*benign*“, „*likely benign*“ und „*uncertain significance*“ eingeteilt. Die Kriterien richten sich u.a. nach der Art der Mutation, der Veränderung auf der Aminosäure-Ebene, dem Erbgang, der funktionellen Auswirkung auf das Protein, der Allelfrequenz in der Population und der *in silico* Daten (33).

In bisherigen Publikationen wurden im Zusammenhang mit Mutationen betreffend *CHD8* unterschiedliche Phänotypen, mit den gemeinsamen Symptomen Hochwuchs, Makrozephalie, ASS sowie gastrointestinalen Problemen beschrieben (35–45). Weiterhin treten faziale Merkmale wie ein Hypertelorismus, ein prominenter supraorbitaler Knochenwulst und nach unten gerichtete Lidachsen auf (35,37,43,45). Auch unsere Patientinnen zeigen diese Auffälligkeiten. Die meisten der krankheitsverursachenden Varianten in *CHD8* sind *de novo* Mikrodeletionen (43,45,46) oder *frameshift* Mutationen mit einer Verschiebung des Leserasters (35,40,46). Eine klare Genotyp-Phänotyp Korrelation konnte bislang nicht gezeigt werden. **Tabelle 4** zeigt eine Übersicht bislang beschriebener *missense* Mutationen und Deletionen einzelner Aminosäuren bei denen das Leseraster bewahrt bleibt im Menschen und die assoziierten Symptome.

Die Lokalisation der detektierten Mutation p.R578C am N-Terminus des CHD8 Proteins ist interessant, da diese als bislang erste und einzige Variante sowohl die kurze als auch die lange Isoform des CHD8 Proteins betrifft. *CHD8* Mutationen, welche mit ASS assoziiert sind, betreffen vor allem die Helicase-Domäne, die für die Chromatin-Remodellierung zuständig ist (47). Die kurze Isoform beinhaltet das Erkennungssignal für die nukleäre Lokalisation sowie die Bindungsstelle für β CAT, welche für die aktive Inhibition der WNT-Signalkaskade notwendig ist (47).

In einem Mausmodell, in dem eine heterozygote *frameshift* Mutation zu einem vorzeitigen Abbruch der Translation an der Aminosäure Position 419 in CHD8 führte, kam es zur Bildung eines trunkierten Proteins ohne seine wichtigen funktionellen Domänen. Diese Mäuse wiesen eine Makrozephalie auf (11). Die fazialen Charakteristika konnten ebenfalls in Experimenten mit Zebrafischen induziert werden. Diese exprimierten nach der Fertilisation hohe Mengen an CHD8 im ZNS und im Gastrointestinaltrakt. Eine Injektion mit CHD8-Morpholinos führte neben einem erweiterten Augenabstand und vergrößertem Kopfumfang zu einer verlangsamten Darmmotilität mit reduzierter Anzahl enterischer Neuronen (35).

| Characteristics and symptoms | HPO ID | this publication | | Bernier <i>et al</i> , 2014 | | |
|---|------------|------------------|-------------|-----------------------------|-------------------------|-------------------------|
| | | Twin#1 | Twin#2 | Nij07_06646 | Nij-010878 | 14406.p1 |
| gender | | F | F | M | M | M |
| age of last assessment | | 14 | 14 | 17 | 11 | 13 |
| chromosomal localization (GRCh37.p11, hg19) | | 14:21884051 | 14:21884051 | 14:21863071 | chr14:21860016_21860018 | chr14:21854024_21854026 |
| genomic variant | | G>A | G>A | C>T | delCTT | delGTG |
| effect on translation (NM_001170629) | | p.R578C | p.R578C | p.R1797Q | p.K2287del | p.H2498del |
| mode of inheritance | | spontaneous | spontaneous | paternal | unknown | spontaneous |
| Head | | | | | | |
| macrocephalus (head circumference) | HP:0000256 | +4.82 SD | +4.82 SD | +2.0 SD | +1.5 SD | +1.6 SD |
| prominent supraorbital ridge | HP:0000336 | - | - | x | | |
| hypertelorism | HP:0000316 | x | x | | | |
| down-slanted palpebral fissures | HP:0000494 | x | x | x | | |
| Muscular | | | | | | |
| delayed motor development | HP:0001270 | x | x | | | |
| congenital ptosis | HP:0007970 | x | x | | | |
| difficulties walking (stumbling, interiorly rotated feet) | HP:0002355 | x | x | | | |
| muscular hypotonia | HP:0001252 | x | x | | | |
| increased muscle fatigability | HP0030196 | x | x | | | |
| decreased facial expression | HP:0004673 | x | x | | | |
| weak voice | HP:0001621 | x | x | | | |
| Skeletal | | | | | | |
| planus feet | HP:0001763 | x | x | x | | |
| macrosomia (body height) | HP:0001520 | +1.9 SD | +2.5 SD | +2.2 SD | +1.0 SD | 1.1 SD |
| abnormal dentition | HP:0000164 | x | x | | | |
| scoliosis | HP:0002650 | x | x | | | |
| Metabolic | | | | | | |
| overweight | HP:0025502 | - | - | | x | x |
| Neurological and psychiatric | | | | | | |
| autism spectrum disorder | HP:0000729 | - | - | x | | x |
| intellectual disability | HP:0001249 | - | - | x | x | |
| attention deficit disorder | HP:0007018 | - | - | | x | x |
| sleep disturbance | HP:0002360 | - | - | x | | x |
| speech regression | HP:0002371 | - | - | | | |
| seizures | HP:0001250 | - | - | | | |
| Ocular | | | | | | |
| myopia | HP:0000545 | x | x | | | |
| Respiratory and chest | | | | | | |
| respiratory distress | HP:0002098 | x | x | | | |
| patent foramen ovale | HP:0001655 | x | x | | | |
| Gastrointestinal | | | | | | |
| diarrhea | HP:0002014 | x | x | x | | |
| Birth | | | | | | |
| Caesarean section | HP:0011410 | x | x | x | | |
| birth induction | | x | x | | | x |
| neonatal hyperbilirubinemia | HP:0003265 | x | x | | | |

Tabelle 4 Ein Überblick bislang publizierter *CHD8* missense Mutationen oder Deletionen einzelner Aminosäuren in *CHD8* und der assoziierten Symptome sowie der Symptome unserer Patientinnen. Bei den meisten bislang publizierten, nur das *CHD8* Gen betreffenden Varianten, handelt es sich um *nonsense* und *frameshift* Mutationen. Diese Tabelle wurde im Supplement des bereits in dem publizierten Artikels Lee *et al.* 2020 (1) verwendet und für die vorliegende Publikationsschrift übernommen.

Mich interessierte besonders die Frage, ob bei bisherigen Studien Patient*innen mit Muskelhypotonie aufgefallen waren. Dieses Symptom wurde zwar vereinzelt erwähnt (43,45,46), jedoch handelte es sich um *frameshift* Mutationen (46) und Mikrodeletionen (43,45), die teils mehrere Gene betrafen, sodass eine eindeutige Zurückführung des Phänotyps auf ein Gen schwierig war. Von vier weiteren Patient*innen mit *missense* Mutationen gibt es zwei Berichte über einen eher milden Phänotyp ohne Muskelsymptomatik (p.N837D, p.T976K) (48) und bei weiteren zwei Patienten keine nähere Angabe zum klinischen Phänotyp (p.R910Q, p.G1710V) (35,48). Unter den

bekanntesten Mutationen waren bislang Domänen der langen Isoform betroffen, welche zentral und am C-Terminus lokalisiert sind.

Weiterhin interessant ist der Aspekt, dass zwar Mutationen in *CHD8* primär mit ASS und Makrozephalie assoziiert sind, unsere Patientinnen jedoch normale kognitive Fähigkeiten und Sozialverhalten aufwiesen und es keinen Anhalt für eine ASS gab (Fremdanamnese der Kindseltern, Verhaltensbeobachtung). Diese Tatsache ist in der Hinsicht überraschend, da ASS und Intelligenzminderung bisher als Schlüsselmerkmale von *CHD8* Mutationen galten. Anzumerken ist hierzu jedoch, dass die Diagnosestellung einer ASS bei weiblichen Patientinnen oft später erfolgt als bei männlichen Patienten (49). Des Weiteren tritt die Symptomatik bei Patientinnen teilweise in abgemilderter Form auf oder wird durch Komorbiditäten wie eine Angststörung oder eine depressive Störung maskiert (50). Patientinnen weisen tendenziell auch einen kompetenteren Umgang mit eigenen sozialen Defiziten auf (51). Insgesamt deutet sich an, dass weiblichen Patientinnen einen milder ausgeprägten Phänotyp zeigen als männliche Patienten (52). Die myasthenen Symptome unserer Patientinnen erweitern nun das klinische Spektrum und deuten auf eine spezielle Rolle der kurzen *CHD8* Isoform (Duplin) für die Struktur und Funktion der NME hin. Aufgrund der vielfältigen Funktion in der Regulation der Genexpression und der Regulation des WNT-Signalweges vermute ich, dass *CHD8* eine duale Rolle an der NME spielt:

1. Regulation der Genexpression von Proteinen, welche an der NME beteiligt sind
2. Beteiligung an der strukturellen Integrität der NME.

Die dichte Anhäufung („Clustering“) von AChR in der postsynaptischen Membran ist ein essenzieller Prozess für die Formation einer funktionsfähigen NME. Dieser Prozess wird durch unterschiedlich prä- und postsynaptische Faktoren kontrolliert (14). In der Entwicklung des frühen Myotoms initiiert die Bindung von WNT an der MuSK und dem LRP4 auf der postsynaptischen Membran die Bildung von AChR-Mikroclustern im Zentrum der Muskelfasern, zu denen später die Axone hingeleitet werden (14). Die Bindung von Agrin an LRP4 und MuSK ermöglicht die Ausbildung ausgereifter AChR am vollentwickelten Muskel. Diese Cluster werden durch Rapsyn in der Membran verankert (15). Auf der sarkoplasmatischen Seite führt die Interaktion von Rapsyn und β CAT zur Verankerung der NME am Zytoskelett (17). Dabei handelt es sich um einen hoch dynamischen Prozess bestehend aus Ein- und Ausbau der Rezeptoren (18). Über FZD8

und β CAT/GSK3 β führt aus dem Muskel sezerniertes WNT3a zu einer reduzierten Rapsyn-Expression. Dem steht das durch Agrin induzierte AChR-Clustering entgegen (12). Ein Gleichgewicht beider Vorgänge scheint essenziell für die synaptische Integrität zu sein und garantiert eine Anpassung der synaptischen Stärke an wechselnde mechanische Anforderungen an den Muskel.

Experimente in Myotuben von *RAPSN*^{-/-} Mäusen zeigten, dass Rapsyn eine essentielle Rolle für das β CAT-induzierte AChR-Clustering spielt (16). Die Interaktion wird verstärkt durch Agrin (16), welche wiederum von der β CAT-induzierten AChR-Aggregation abhängig ist (17). Die Kollokalisierung von CHD8 und Rapsyn in unseren immunhistochemischen Kofärbungen stützt die Hypothese, dass CHD8 ebenfalls eine Bedeutung für das AChR-Clustering hat. Ich vermute, dass diese aus der Interaktion mit dem Rapsyn-gebundenem β CAT resultiert.

CHD8 wird im zentralen Nervensystem und im Nervengewebe hoch exprimiert (53). Die Funktionen sowie die Effekte von Mutationen sind durch die Interaktionen mit den unterschiedlichen Bindungspartnern sehr wahrscheinlich gewebespezifisch. *CHD8*-Insuffizienz führt zur verminderten Expression vieler Gene, was eine RNA-Sequenzierung nach *CHD8*-Knockdown mittels siRNA in humanen neuronalen Vorläuferzellen nachweisen konnte (54). Unter den vermindert exprimierten Genen befinden sich *CHRNA4*, *CHRNA7* sowie *LRP4*, all dies sind Gene, welche für die Struktur und Funktion der NME relevant sind. *CHRNA4*, *CHRNA7* kodieren für die β 4- und β 7-Untereinheiten des nikotinergen AChR. Mutationen in *LRP4* sind assoziiert mit dem CMS Typ 17 (OMIM #616304). *NRG1* kodiert für Neuregulin 1 und wird ebenfalls im Rahmen eines *CHD8*-Knockdowns verändert exprimiert. Es modifiziert über die Interaktion mit MuSK das AChR-Clustering an der NME. Gleichzeitig aktiviert es die lokale Gentranskription und erhöht die *CHRNE* Transkription. *CHRNE* kodiert für die β -Untereinheit des AChR und ersetzt die embryonale γ -Untereinheit (*CHRNA3*).

Meine Arbeitshypothese zur Erklärung der myasthenen Symptome unserer Patientinnen durch die muskelspezifische Funktion von CHD8/Duplin basiert auf der Annahme, dass CHD8 sowohl als transkriptioneller Regulator als auch als Strukturprotein der NME eine Bedeutung hat. CHD8/Duplin interagiert direkt mit β CAT und wirkt inhibitorisch auf die Genexpression der Zielgene in der WNT-Signalkaskade (5). β CAT fungiert aber nicht nur als Transkriptions-Koaktivator. In Muskelzellen, dient es ebenfalls als Strukturprotein der NME. Über eine Interaktion mit Rapsyn verbindet es die AChR mit dem Zytoskelett (17).

Muskeln von β CAT-Knockout-Mäusen zeigten erweiterte NME-Areale, weit verteilte AChR-Cluster und eine Dislokation der Motoneurone. Interessanterweise zeigten diese Mäuse zusätzlich eine gestörte Acetylcholinfreisetzung, welche vermutlich auf Defekte in der Vesikelfusion und in der Exozytose aus der präsynaptischen Nervenendigung zurückzuführen ist. Die Autoren dieser Arbeit gingen von der Funktion des β CAT in der präsynaptischen Muskeldifferenzierung über eine retrograde Signalkaskade aus (55). Die Tatsache, dass unsere Patientinnen von 3,4-DAP, einer pharmakologischen Substanz zur Verstärkung der Acetylcholin-Freisetzung aus der präsynaptischen Nervenendigung, profitierten, bringt uns zur Formulierung einer weiteren, bislang jedoch nicht überprüften Hypothese: Möglicherweise spielt CHD8 über eine Interaktion mit β CAT sowohl post- als auch präsynaptisch, z.B. in der Regulation der Vesikelfreisetzung, eine Rolle.

Untersuchungen in *Drosophila melanogaster* zeigten, dass *Kismet (Kis)*, ein Homolog des humanen *CHD7* und *CHD8*, über die Regulation der Endozytose präsynaptischer Vesikel die Neurotransmission an der NME beeinflusst. Bei Fruchtfliegen mit einer *loss of function* Mutation (*kis^{LM27}/kis^{k13416}*) ist das Vesikelrecycling eingeschränkt, welches sich durch einen verminderten Rab11-Spiegel (lokalisiert in recycelten Endosomen) zeigt (56). Rab11 ist für die Clathrin-induzierte Endozytose zuständig (57). CHD7 und CHD8 beeinflussen die Expression von Rab-Proteinen (39). Die Autoren schlussfolgerten, dass nicht die sofort verfügbare Menge an Vesikeln (*reserve pool*), sondern die vorrätige Menge (*recycling pool*) für längere Neurotransmissionen beeinträchtigt wird (56). Die *missense* Mutation bei unseren Patientinnen könnte neben direkten strukturellen Auswirkungen an der Postsynapse auch spezifische präsynaptische Interaktionen beeinträchtigen. Für das tiefere Verständnis der Interaktion und Dynamik der CHD8-Expression an der NME sind weitere experimentelle wissenschaftliche Untersuchungen erforderlich und deren Zusammensicht mit den klinisch phänotypischen Daten von Patienten und Versuchstieren.

3.4.5 Einordnung und Ausblick

In dieser Arbeit habe ich die Lokalisation des Proteins CHD8 als mögliches strukturelles Element an der NME untersucht. Weiterhin habe ich mögliche Zusammenhänge zwischen dem Gen *CHD8* und dessen Bedeutung für die Genexpression der Proteine der NME theoretisch besprochen. Zusammenhänge konnte ich durch eine ausführliche Charakterisierung der Symptomatik von *CHD8*-Knockout-Tiermodellen und Patient*innen und durch die Verknüpfung der bekannten Proteinfunktion mit bislang publizierten

klinischen Daten herstellen. Die Immunofluoreszenz-Färbungen, welche die Expression von CHD8 an der NME nachweisen, stützen die Hypothese, dass CHD8 gleichzeitig ein Strukturprotein der NME ist. Die in dieser Arbeit gefundene neue Assoziation des *CHD8* Gens mit einem CMS ist für den klinischen Alltag relevant, da das bisherige Gen-Panel für das CMS erweitert werden kann. Dieser Schritt könnte eine beschleunigte und präzise Diagnostik bei Patient*innen mit Verdacht auf eine CMS ermöglichen, bevor eine WES notwendig wird.

Zur besseren Korrelation der zellbiologischen Phänomene mit dem klinischen Phänotyp wäre eine Untersuchung der Muskelbiopsien betroffener Patienten (i) nach strukturellen Veränderungen an der NME und (ii) nach funktionellen Veränderungen der Neurotransmission interessant. Zu erwarten wären u.a. Hinweise auf dezentral fehllokalisierte Nervenendigungen oder eine breitere Verteilung der AChR, die auch bei β CAT^{-/-}-Knockout-Mäusen beschrieben wurden. Auf der funktionellen Ebene zeigten diese Mäuse eine verminderte Neurotransmission, welche auf eine reduzierte Vesikelfreisetzung bei Depolarisation durch verminderte Calciumsensitivität zurückzuführen ist (55). Dieser Aspekt ist in der Hinsicht interessant, dass unsere Patientinnen ein gutes Ansprechen auf 3,4-DAP zeigten, welche bisher offiziell nur zur medikamentösen Therapie beim Lambert-Eaton-Syndrom (LEMS) zugelassen ist. Beim LEMS kommt es durch VGCC-Antikörper gegen präsynaptische spannungsabhängige Calcium-Kanäle zur gestörten Neurotransmission. 3,4-DAP verlängert durch die Blockade der präsynaptischen Kaliumkanäle die Aktionspotential-induzierte Depolarisation (58). Die günstige pharmakologische Wirkung bei unseren Patientinnen könnte sich über eine möglicherweise ebenfalls präsynaptische Pathophysiologie erklären.

Zudem wäre eine Transkriptionsanalyse der Muskel-RNA (RNA-Sequencing, quantitative RT-qPCR) der Gene, welche für die Proteine der NME kodieren (z.B. Rapsyn, MuSK, LRP4) für unterschiedliche *CHD8* Mutationen interessant. Eine Zusammensicht der Folgen von *CHD8* Mutationen auf der strukturellen, funktionellen und Transkriptionsebene in Korrelation zur betroffenen Domäne sowie der Mutationsart würde das Verständnis der klinischen Bedeutung einer Mutation in *CHD8* erweitern. Die neue Assoziation mit muskulären Symptomen könnte zukünftig Kliniker anregen, welche sich primär mit der Rolle des *CHD8* für eine ASS sowie das ZNS befasst haben, ebenso nach möglichen neuromuskulären Symptomen zu suchen. Die bisher wenigen Daten zu

den muskelspezifischen Symptomen bei diesen Patienten könnten schließlich nicht durch ihre ‚reale‘ Abwesenheit, sondern durch eine fehlende Erhebung oder Suche danach bedingt sein.

Durch die rasanten Fortschritte in der molekulargenetischen Diagnostik der letzten 20 Jahre durch automatisierte Hochdurchsatzmethoden ist die die Anzahl der richtigen Diagnosestellungen bei seltenen Erkrankungen steil angestiegen. Obwohl bislang nur in den wenigsten Fällen eine kausale Therapie möglich ist, entlastet eine klare Diagnose die betroffenen Patient*innen und Familien und ermöglicht eine humangenetische Beratung für die weitere Familienplanung. Diese Aspekte sollten eine breitere Anwendung dieser Methoden im klinischen Alltag unterstützen und eine interdisziplinäre Zusammenarbeit auf diesem Feld bestärken.

4. Literatur

1. Lee CY, Petkova M, Morales-Gonzalez S, Gimber N, Schmoranzer J, Meisel A, u. a. A spontaneous missense mutation in the chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (CHD8) gene: a novel association with congenital myasthenic syndrome. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 2020;46(6):588–601.
2. Sieb JP, Kraner S, Steinlein OK, Bufler J. Kongenitale Myasthenie-Syndrome. *Klin Neurophysiol.* September 2000;31(03):148–54.
3. Hantai D, Nicole S, Eymard B. Congenital myasthenic syndromes: an update. *Curr Opin Neurol.* Oktober 2013;26(5):561–8.
4. Engel AG, Shen X-M, Selcen D, Sine SM. Congenital myasthenic syndromes: pathogenesis, diagnosis, and treatment. *Lancet Neurol.* 1. April 2015;14(4):420–34.
5. Sakamoto I, Kishida S, Fukui A, Kishida M, Yamamoto H, Hino S, u. a. A Novel β -Catenin-binding Protein Inhibits β -Catenin-dependent Tcf Activation and Axis Formation. *J Biol Chem.* 20. Oktober 2000;275(42):32871–8.
6. Kingston RE, Tamkun JW. Transcriptional Regulation by Trithorax-Group Proteins. *Cold Spring Harb Perspect Biol.* 10. Januar 2014;6(10):a019349.
7. Kobayashi M, Kishida S, Fukui A, Michiue T, Miyamoto Y, Okamoto T, u. a. Nuclear Localization of Duplin, a β -Catenin-binding Protein, Is Essential for Its Inhibitory Activity on the Wnt Signaling Pathway. *J Biol Chem.* 22. Februar 2002;277(8):5816–22.
8. Nishiyama M, Skoultchi AI, Nakayama KI. Histone H1 Recruitment by CHD8 Is Essential for Suppression of the Wnt– β -Catenin Signaling Pathway. *Mol Cell Biol.* 15. Januar 2012;32(2):501–12.
9. Willert K, Nusse R. β -catenin: a key mediator of Wnt signaling. *Curr Opin Genet Dev.* 1. Februar 1998;8(1):95–102.
10. Logan CY, Nusse R. The Wnt Signaling Pathway in Development and Disease. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2004;20(1):781–810.
11. Suetterlin P, Hurley S, Mohan C, Riegman KLH, Pagani M, Caruso A, u. a. Altered Neocortical Gene Expression, Brain Overgrowth and Functional Over-Connectivity in Chd8 Haploinsufficient Mice. *Cereb Cortex N Y N 1991.* 01 2018;28(6):2192–206.
12. Wang J, Ruan N-J, Qian L, Lei W, Chen F, Luo Z-G. Wnt/ β -Catenin Signaling Suppresses Rapsyn Expression and Inhibits Acetylcholine Receptor Clustering at the Neuromuscular Junction. *J Biol Chem.* 8. Januar 2008;283(31):21668–75.
13. Durak O, Gao F, Kaeser-Woo YJ, Rueda R, Martorell AJ, Nott A, u. a. Chd8 mediates cortical neurogenesis via transcriptional regulation of cell cycle and Wnt signaling. *Nat Neurosci.* November 2016;19(11):1477–88.
14. Barik A, Lu Y, Sathyamurthy A, Bowman A, Shen C, Li L, u. a. LRP4 Is Critical for Neuromuscular Junction Maintenance. *J Neurosci.* 15. Oktober 2014;34(42):13892–905.
15. Gautam M, Noakes PG, Moscoso L, Rupp F, Scheller RH, Merlie JP, u. a. Defective Neuromuscular Synaptogenesis in Agrin-Deficient Mutant Mice. *Cell.* 17. Mai 1996;85(4):525–35.

16. Moransard M, Borges LS, Willmann R, Marangi PA, Brenner HR, Ferns MJ, u. a. Agrin Regulates Rapsyn Interaction with Surface Acetylcholine Receptors, and This Underlies Cytoskeletal Anchoring and Clustering. *J Biol Chem.* 28. Februar 2003;278(9):7350–9.
17. Zhang B, Luo S, Dong X-P, Zhang X, Liu C, Luo Z, u. a. β -Catenin Regulates Acetylcholine Receptor Clustering in Muscle Cells through Interaction with Rapsyn. *J Neurosci.* 11. April 2007;27(15):3968–73.
18. Luo S, Zhang B, Dong X, Tao Y, Ting A, Zhou Z, u. a. HSP90 β Regulates Rapsyn Turnover and Subsequent AChR Cluster Formation and Maintenance. *Neuron.* 9. Oktober 2008;60(1):97–110.
19. Lossos A, Baala L, Soffer D, Averbuch-Heller L, Dotan S, Munnich A, u. a. A novel autosomal recessive myopathy with external ophthalmoplegia linked to chromosome 17p13.1-p12. *Brain.* 1. Januar 2005;128(1):42–51.
20. Nelms K, O'Neill TJ, Li S, Hubbard SR, Gustafson TA, Paul WE. Alternative splicing, gene localization, and binding of SH2-B to the insulin receptor kinase domain. *Mamm Genome.* 1. Dezember 1999;10(12):1160–7.
21. Li Z, Zhou Y, Carter-Su C, Myers MG, Rui L. SH2B1 enhances leptin signaling by both Janus kinase 2 Tyr813 phosphorylation-dependent and -independent mechanisms. *Mol Endocrinol Baltim Md.* September 2007;21(9):2270–81.
22. Rui L, Mathews LS, Hotta K, Gustafson TA, Carter-Su C. Identification of SH2-Bbeta as a substrate of the tyrosine kinase JAK2 involved in growth hormone signaling. *Mol Cell Biol.* 11. Januar 1997;17(11):6633–44.
23. Zhu X, Lai C, Thomas S, Burden SJ. Neuregulin receptors, erbB3 and erbB4, are localized at neuromuscular synapses. *EMBO J.* 1. Dezember 1995;14(23):5842–8.
24. Ahn Jo S, Zhu X, Marchionni MA, Burden SJ. Neuregulins are concentrated at nerve-muscle synapses and activate ACh-receptor gene expression. *Nature.* 12. Januar 1995;373(6510):158–61.
25. Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, u. a. Direct Binding of Reelin to VLDL Receptor and ApoE Receptor 2 Induces Tyrosine Phosphorylation of Disabled-1 and Modulates Tau Phosphorylation. *Neuron.* 1. Oktober 1999;24(2):481–9.
26. Zhang J, Zhang X, Zhang L, Zhou F, van Dinther M, ten Dijke P. LRP8 mediates Wnt/ β -catenin signaling and controls osteoblast differentiation. *J Bone Miner Res.* 1. Oktober 2012;27(10):2065–74.
27. Maximov A, Shin O-H, Liu X, Südhof TC. Synaptotagmin-12, a synaptic vesicle phosphoprotein that modulates spontaneous neurotransmitter release. *J Cell Biol.* 26. Dezember 2006;176(1):113–24.
28. van der Vaart B, Manatschal C, Grigoriev I, Olieric V, Gouveia SM, Bjelic S, u. a. SLAIN2 links microtubule plus end-tracking proteins and controls microtubule growth in interphase. *J Cell Biol.* 13. Juni 2011;193(6):1083–99.
29. Peterson MG, Tanese N, Pugh BF, Tjian R. Functional domains and upstream activation properties of cloned human TATA binding protein. *Science.* 29. Juni 1990;248(4963):1625–30.
30. Malecova B, Dall'Agnese A, Madaro L, Gatto S, Toto PC, Albin S, u. a. TBP/TFIID-dependent activation of MyoD target genes in skeletal muscle cells. *eLife.* 11. Februar 2016;5:e12534.

31. Bagchi S, Baomar HA, Al-Walai S, Al-Sadi S, Fredriksson R. Histological Analysis of SLC38A6 (SNAT6) Expression in Mouse Brain Shows Selective Expression in Excitatory Neurons with High Expression in the Synapses. *PLOS ONE*. 21. April 2014;9(4):e95438.
32. Petkova MV, Morales-Gonzales S, Relizani K, Gill E, Seifert F, Radke J, u. a. Characterization of a DmdEGFP reporter mouse as a tool to investigate dystrophin expression. *Skelet Muscle [Internet]*. 5. Juli 2016 [zitiert 9. November 2020];6. Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4932663/>
33. Richards S, Aziz N, Bale S, Bick D, Das S, Gastier-Foster J, u. a. 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*. Mai 2015;17(5):405–23.
34. Shanks MO, Lund LM, Manni S, Russell M, Mauban JRH, Bond M. Chromodomain Helicase Binding Protein 8 (Chd8) Is a Novel A-Kinase Anchoring Protein Expressed during Rat Cardiac Development. *PLoS ONE [Internet]*. 10. Oktober 2012 [zitiert 9. November 2020];7(10). Verfügbar unter: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3468582/>
35. Bernier R, Golzio C, Xiong B, Stessman HA, Coe BP, Penn O, u. a. Disruptive CHD8 Mutations Define a Subtype of Autism Early in Development. *Cell*. 17. Juli 2014;158(2):263–76.
36. De Rubeis S, He X, Goldberg AP, Poultney CS, Samocha K, Ercument Cicek A, u. a. Synaptic, transcriptional and chromatin genes disrupted in autism. *Nature*. November 2014;515(7526):209–15.
37. Drabova J, Seemanova E, Hancarova M, Pourova R, Horacek M, Jancuskova T, u. a. Long term follow-up in a patient with a de novo microdeletion of 14q11.2 involving CHD8. *Am J Med Genet A*. 1. April 2015;167(4):837–41.
38. Iossifov I, O’Roak BJ, Sanders SJ, Ronemus M, Krumm N, Levy D, u. a. The contribution of *de novo* coding mutations to autism spectrum disorder. *Nature*. November 2014;515(7526):216–21.
39. Katayama Y, Nishiyama M, Shoji H, Ohkawa Y, Kawamura A, Sato T, u. a. CHD8 haploinsufficiency results in autistic-like phenotypes in mice. *Nature*. 29. September 2016;537(7622):675–9.
40. Merner N, Forgeot d’Arc B, Bell SC, Maussion G, Peng H, Gauthier J, u. a. A de novo frameshift mutation in chromodomain helicase DNA-binding domain 8 (CHD8): A case report and literature review. *Am J Med Genet A*. 1. Mai 2016;170(5):1225–35.
41. Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma’ayan A, Samocha KE, Sabo A, u. a. Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature*. 10. Mai 2012;485(7397):242–5.
42. O’Roak BJ, Stessman HA, Boyle EA, Witherspoon KT, Martin B, Lee C, u. a. Recurrent *de novo* mutations implicate novel genes underlying simplex autism risk. *Nat Commun*. 24. November 2014;5:ncomms6595.
43. Prontera P, Ottaviani V, Toccaceli D, Rogaia D, Ardisia C, Romani R, u. a. Recurrent ~100 Kb microdeletion in the chromosomal region 14q11.2, involving CHD8 gene, is associated with autism and macrocephaly. *Am J Med Genet A*. 1. Dezember 2014;164(12):3137–41.
44. Stolerman ES, Smith B, Chaubey A, Jones JR. CHD8 intragenic deletion associated with autism spectrum disorder. *Eur J Med Genet*. April 2016;59(4):189–94.

45. Zahir F, Firth HV, Baross A, Delaney AD, Eydoux P, Gibson WT, u. a. Novel deletions of 14q11.2 associated with developmental delay, cognitive impairment and similar minor anomalies in three children. *J Med Genet.* 1. September 2007;44(9):556–61.
46. Douzgou S, Liang HW, Metcalfe K, Somarathi S, Tischkowitz M, Mohamed W, u. a. The clinical presentation caused by truncating CHD8 variants. *Clin Genet.* 2019;96(1):72–84.
47. Kunkel GR, Tracy JA, Jalufka FL, Lekven AC. CHD8short, a naturally-occurring truncated form of a chromatin remodeler lacking the helicase domain, is a potent transcriptional coregulator. *Gene.* 30. Januar 2018;641:303–9.
48. Ostrowski PJ, Zachariou A, Loveday C, Beleza-Meireles A, Bertoli M, Dean J, u. a. The CHD8 overgrowth syndrome: A detailed evaluation of an emerging overgrowth phenotype in 27 patients. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 2019;181(4):557–64.
49. Begeer S, Mandell D, Wijnker-Holmes B, Venderbosch S, Rem D, Stekelenburg F, u. a. Sex differences in the timing of identification among children and adults with autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* Mai 2013;43(5):1151–6.
50. Hartley SL, Sikora DM. Sex differences in autism spectrum disorder: an examination of developmental functioning, autistic symptoms, and coexisting behavior problems in toddlers. *J Autism Dev Disord.* Dezember 2009;39(12):1715–22.
51. Werling DM. The role of sex-differential biology in risk for autism spectrum disorder. *Biol Sex Differ.* 2016;7:58.
52. Jung H, Park H, Choi Y, Kang H, Lee E, Kweon H, u. a. Sexually dimorphic behavior, neuronal activity, and gene expression in Chd8-mutant mice. *Nat Neurosci.* September 2018;21(9):1218–28.
53. Platt RJ, Zhou Y, Slaymaker IM, Shetty AS, Weisbach NR, Kim J-A, u. a. Chd8 Mutation Leads to Autistic-like Behaviors and Impaired Striatal Circuits. *Cell Rep.* 11. April 2017;19(2):335–50.
54. Wilkinson B, Grepo N, Thompson BL, Kim J, Wang K, Evgrafov OV, u. a. The autism-associated gene chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (CHD8) regulates noncoding RNAs and autism-related genes. *Transl Psychiatry.* 19. Mai 2015;5(5):e568.
55. Li X-M, Dong X-P, Luo S-W, Zhang B, Lee D-H, Ting AKL, u. a. Retrograde regulation of motoneuron differentiation by muscle β -catenin. *Nat Neurosci.* März 2008;11(3):262–8.
56. Latcheva NK, Delaney TL, Viveiros JM, Smith RA, Bernard KM, Harsin B, u. a. The CHD Protein, Kismet, is Important for the Recycling of Synaptic Vesicles during Endocytosis. *Sci Rep.* 18 2019;9(1):19368.
57. Kokotos AC, Peltier J, Davenport EC, Trost M, Cousin MA. Activity-dependent bulk endocytosis proteome reveals a key presynaptic role for the monomeric GTPase Rab11. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 23 2018;115(43):E10177–86.
58. Quartel A, Turbeville S, Lounsbury D. Current therapy for Lambert-Eaton myasthenic syndrome: development of 3,4-diaminopyridine phosphate salt as first-line symptomatic treatment. *Curr Med Res Opin.* Juni 2010;26(6):1363–75.

5. Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Chae-Young Lee, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: *Eine de novo Missense Mutation im Gen Chromodomain Helicase DNA binding protein 8 (CHD8): eine neue Assoziation mit einem kongenitalen Myasthenie-Syndrom / A de novo missense mutation in the chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (CHD8) gene: a novel association with congenital myasthenic syndrome* selbständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe.

Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren/innen beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) werden von mir verantwortet.

Ich versichere ferner, dass ich die in Zusammenarbeit mit anderen Personen generierten Daten, Datenauswertungen und Schlussfolgerungen korrekt gekennzeichnet und meinen eigenen Beitrag sowie die Beiträge anderer Personen korrekt kenntlich gemacht habe (siehe Anteilserklärung). Texte oder Textteile, die gemeinsam mit anderen erstellt oder verwendet wurden, habe ich korrekt kenntlich gemacht.

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

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

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

Datum

Unterschrift

6. Anteilserklärung

Es liegt keine geteilte Autorenschaft vor.

Chae-Young Lee hatte folgenden Anteil an der folgenden Publikation:

Chae-Young Lee, Mina Petkova, Susanne Morales-Gonzales, Niclas Gimbert, Jan Schmoranzer, Andreas Meisel, Wolfgang Böhmerle, Werner Stenzel, Markus Schuelke, Jana Marie Schwarz. A spontaneous missense mutation in the chromodomain helicase DNA-binding protein (*CHD8*) gene: a novel association with congenital myasthenic syndrome ***Neuropathology and Applied Neurobiology*** 2020;46(6):588-601. <https://doi.org/10.1111/nan.12617>.

Anteilserklärung an der erfolgten Publikation:

Ich führte selbstständig mittels *in silico* Methoden die Sequenzierungsanalyse der genetischen Informationen des WES durch. Dabei stellte ich die für die einzelnen Filtermodelle notwendigen Kriterien zusammen. Die potentiell pathogenen Varianten wertete ich im Einzelnen aus und selektierte die Kandidatengene und -varianten unter Berücksichtigung der molekulargenetischen Informationen sowie der Informationen zur Proteinfunktion und bislang publizierten Phänotypen. Eine Auswahl wird in Figure 1 E und in der Supplemental table 2 dargestellt. Zudem führte ich die Polymerasenkettenreaktion, die Segregationsanalyse mittels Sanger-Sequenzierung, den Western Blot sowie die Immunfluoreszenzfärbungen an Fibroblasten und humanen Kontrollmuskelschnitten durch. Die Ergebnisse habe ich in Figure 1C, Figure 2, Supplemental figure 2 und Supplemental figure 3 visualisiert. Die Korrelation des Phänotyps zum Genotyp habe ich durch eine Analyse bisheriger Daten und einer ausführlichen Literaturrecherche zusammengestellt, dessen Ergebnisse ich in der Supplemental table 1 zusammengeführt habe. Die Hypothesenformulierung erfolgte durch mich zusammen mit meinen Betreuer*innen nach einer ausführlichen Literaturrecherche, welche in Zusammenschau der experimentellen Ergebnisse in der Diskussion dargelegt und in den wissenschaftlichen Kontext gestellt wurde. Daraus ist Figure 4 entstanden. Den ersten Entwurf des Manuskripts mit Einleitung, Methodik, Ergebnissen und Diskussion habe ich verfasst. Jana Marie Schwarz und Markus Schuelke supervidierten diesen Prozess. Hierfür stellte ich das klinische Bild eines CMS sowie der Funktion des Proteins CHD8 für die Einleitung zusammen, und entwarf die

Figure 1D. Für den Fallbericht habe ich eine Studie der Epikrisen, der diagnostischen Befunde und gezielten Anamneseerhebung erstellt. Zur Verlaufsbeobachtung und medikamentösen Einstellung erfolgten regelmäßige Evaluationen und Gespräche mit den Patientinnen und ihren Eltern, die ich gemeinsam mit Markus Schuelke durchführte.

Unterschrift, Datum und Stempel des erstbetreuenden Hochschullehrers

Unterschrift der Doktorandin

7. Auszug aus der Journal Summary List

Journal Data Filtered By: **Selected JCR Year: 2017** Selected Editions: SCIE, SSCI
 Selected Categories: **"NEUROSCIENCES"** Selected Category Scheme: WoS
Gesamtanzahl: 261 Journale

| Rank | Full Journal Title | Total Cites | Journal Impact Factor | Eigenfactor Score |
|-----------|--|--------------|-----------------------|-------------------|
| 1 | NATURE REVIEWS NEUROSCIENCE | 40,834 | 32.635 | 0.069940 |
| 2 | NATURE NEUROSCIENCE | 59,426 | 19.912 | 0.153710 |
| 3 | ACTA NEUROPATHOLOGICA | 18,783 | 15.872 | 0.041490 |
| 4 | TRENDS IN COGNITIVE SCIENCES | 25,391 | 15.557 | 0.040790 |
| 5 | BEHAVIORAL AND BRAIN SCIENCES | 8,900 | 15.071 | 0.010130 |
| 6 | Annual Review of Neuroscience | 13,320 | 14.675 | 0.016110 |
| 7 | NEURON | 89,410 | 14.318 | 0.216730 |
| 8 | PROGRESS IN NEUROBIOLOGY | 13,065 | 14.163 | 0.015550 |
| 9 | BIOLOGICAL PSYCHIATRY | 42,494 | 11.982 | 0.056910 |
| 10 | MOLECULAR PSYCHIATRY | 18,460 | 11.640 | 0.047200 |
| 11 | JOURNAL OF PINEAL RESEARCH | 9,079 | 11.613 | 0.008600 |
| 12 | TRENDS IN NEUROSCIENCES | 20,061 | 11.439 | 0.026860 |
| 13 | BRAIN | 52,061 | 10.840 | 0.075170 |
| 14 | SLEEP MEDICINE REVIEWS | 6,080 | 10.602 | 0.010720 |
| 15 | ANNALS OF NEUROLOGY | 37,251 | 10.244 | 0.053390 |
| 16 | Translational Stroke Research | 2,202 | 8.266 | 0.005260 |
| 17 | NEUROSCIENCE AND BIOBEHAVIORAL REVIEWS | 24,279 | 8.037 | 0.048460 |
| 18 | NEUROSCIENTIST | 4,738 | 7.461 | 0.008730 |
| 19 | NEURAL NETWORKS | 10,086 | 7.197 | 0.015290 |
| 20 | FRONTIERS IN NEUROENDOCRINOLOGY | 3,924 | 6.875 | 0.006040 |
| 21 | NEUROPSYCHOPHARMACOLOGY | 24,537 | 6.544 | 0.042870 |
| 22 | CURRENT OPINION IN NEUROBIOLOGY | 14,190 | 6.541 | 0.034670 |
| 23 | Molecular Neurodegeneration | 3,489 | 6.426 | 0.009850 |
| 24 | CEREBRAL CORTEX | 29,570 | 6.308 | 0.058970 |
| 25 | BRAIN BEHAVIOR AND IMMUNITY | 12,583 | 6.306 | 0.026850 |
| 26 | BRAIN PATHOLOGY | 4,952 | 6.187 | 0.007750 |
| 27 | Brain Stimulation | 4,263 | 6.120 | 0.014510 |
| 28 | NEUROPATHOLOGY AND APPLIED NEUROBIOLOGY | 3,654 | 6.059 | 0.006350 |
| 29 | JOURNAL OF CEREBRAL BLOOD FLOW AND METABOLISM | 19,450 | 6.045 | 0.028280 |
| 30 | JOURNAL OF NEUROSCIENCE | 176,157 | 5.970 | 0.265950 |
| 31 | Molecular Autism | 1,679 | 5.872 | 0.006320 |
| 32 | Translational Neurodegeneration | 589 | 5.872 | 0.002280 |
| 33 | GLIA | 13,417 | 5.846 | 0.020530 |
| 34 | Neurotherapeutics | 3,973 | 5.719 | 0.008980 |
| 35 | PAIN | 36,132 | 5.559 | 0.038000 |
| 36 | NEUROIMAGE | 92,719 | 5.426 | 0.152610 |
| 37 | Acta Neuropathologica Communications | 2,326 | 5.414 | 0.011550 |
| 38 | Multiple Sclerosis Journal | 10,675 | 5.280 | 0.021890 |

8. Druckexemplar der ausgewählten Publikation

Lee CY, Petkova M, Morales-Gonzalez S, Gimber N, Schmoranzer J, Meisel A, Böhmerle W, Stenzel W, Schuelke M, & Schwarz JM. A spontaneous missense mutation in the chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (CHD8) gene: a novel association with congenital myasthenic syndrome. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2020;46(6):588-601.

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

<https://doi.org/10.1111/nan.12617>

9. Lebenslauf

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

10. Komplette Publikationsliste

[1] Gusic M, Schottmann G, Feichtinger RG, Du C, Scholz C, Wagner M, Mayr JA, **Lee CY**, Yépez VA, Lorenz N, Morales-Gonzalez S, Panneman DM, Rötig A, Rodenburg R, Wortmann SB, Prokisch H, & Schuelke M. Bi-Allelic UQCRFS1 Variants Are Associated with Mitochondrial Complex III Deficiency, Cardiomyopathy, and Alopecia Totalis. *American Journal of Human Genetics*, 2020;106(1), 102–111.

<https://doi.org/10.1016/j.ajhg.2019.12.005>

[2] **Lee CY**, Petkova M, Morales-Gonzalez S, Gimber N, Schmoranzler J, Meisel A, Böhmerle W, Stenzel W, Schuelke M, & Schwarz JM. A spontaneous missense mutation in the chromodomain helicase DNA-binding protein 8 (CHD8) gene: a novel association with congenital myasthenic syndrome. *Neuropathology and Applied Neurobiology* 2020;46(6):588-601.

<http://doi:10.1111/nan.12617>

11. Danksagung

Ich möchte mich vom ganzen Herzen bei meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Jana Marie Schwarz bedanken, die meinen Weg in den letzten Jahren im Rahmen der Promotion treu begleitet hat. Sie hat mir den Raum für meine eigenen Ideen gegeben und mich trotzdem in die richtige Richtung gewiesen, nach der ich mich orientieren konnte. Ich bin mir sicher, dass sie eine tolle Ärztin wird. Vielen Dank für die Geduld und die liebevolle Betreuung.

Mein Dank gilt ebenso meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Markus Schülke, der mich 2015 im Rahmen meiner Hausarbeit in die Thematik der genetischen Diagnostik bei seltenen Erkrankungen eingeführt hat. Es war mir eine große Ehre, ein Teil seiner Arbeitsgruppe gewesen zu sein. Das Wissen und die wertvollen Erfahrungen, die ich sammeln konnte, werden mich sicher mein Leben lang begleiten. Ich schätze seine Leidenschaft für die Klinik und Forschung sowie die große Bereitschaft, sein umfangreiches Wissen mit uns zu teilen.

Bei den Kolleg*innen (insbesondere Esther Gill, Susanne Gonzales-Morales, Mina Petkova) der AG Schülke möchte ich mich herzlichst für die gute Zusammenarbeit und Unterstützung bedanken.

Zuletzt gilt der Dank meiner Familie und meinen Freunden für die seelische Unterstützung in alltäglichen Situationen, für die aufbauenden Worte und das stetige Vertrauen in meine Person.