

Aus dem Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

DISSERTATION

Syndrome mit Haut- und Knochenanomalien

Identifikation zugrundeliegender Gendefekte und funktionelle Analyse
der betroffenen Genprodukte

Doctor rerum medicinalium (Dr. rer. medic.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Björn Fischer

aus Berlin

Datum der Promotion: 14.02.2014

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung:	1
Abstract (Deutsch)	1
Abstract (Englisch)	2
Einleitung	3
Zielstellung	3
Methodik	4
Ergebnisse	7
Diskussion	9
Literaturverzeichnis	16
Ausgewählte Publikationen / Anteilserklärung	21
Ausgewählte Publikationen (Volltextversion)	
Fischer <i>et al.</i> 2012	23
Zampatti <i>et al.</i> 2012	36
Baasanjav <i>et al.</i> 2011	41
Reversade <i>et al.</i> 2009	54
Huchtagowder <i>et al.</i> 2009	62
Persönliche Informationen (Lebenslauf)	79
Komplette Publikationsliste	81
Eidesstattliche Versicherung	84
Danksagung	85

Abstract

Diese Publikationspromotion umfasst fünf in internationalen Fachzeitschriften publizierte Arbeiten, die sich mit der genetischen und funktionellen Untersuchung von Syndromen mit Auffälligkeiten im Skelettsystem und/oder in der Haut beschäftigen. In mehreren konsanguinen Familien mit einem progeroiden Cutis laxa Syndrom wurden mittels eines konventionellen Kandidatengenansatzes und durch Hochdurchsatzsequenzierung Mutationen im *PYCR1* Gen identifiziert. Für das Genprodukt, die Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase 1, konnte erstmals eine mitochondriale Lokalisation gezeigt werden. *PYCR1*-defiziente Zellen weisen eine erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress auf, was zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt. In vivo Untersuchungen in zwei Modellorganismen untermauerten diesen Befund.

Darüber hinaus wurde die Ursachen des *Wrinkly Skin Syndroms* und der Autosomal rezessiven Cutis laxa Typ 2A, die unterschiedliche Schweregrade der gleichen Pathologie darstellen, näher analysiert. Es wurden viele neue Mutationen im *ATP6V0A2* Gen identifiziert. Ein Funktionsverlust-Mechanismus konnte erstmals belegt und die Lokalisation der $\alpha 2$ Untereinheit der V-Typ H^+ ATPase im Golgi-Apparat von Hautfibroblasten nachgewiesen werden. Weiterhin war es möglich, einen für *ATP6V0A2*-Defizienz spezifischen zellbiologischen Test zu beschreiben. Dieser ermöglicht eine kosten- und zeiteffiziente Vorauswahl der bei Patienten mit Cutis laxa zu untersuchenden Gene. Veränderungen in der Morphologie des Golgi-Apparates sowie dessen Funktion konnten in *ATP6V0A2*-defizienten Zellen nachgewiesen werden. Eine erhöhte Tendenz dieser Zellen zu apoptotischem Zelltod wurde ebenfalls beobachtet.

In einer Familie mit skelettalen Auffälligkeiten wurde eine spezifische Mutation im *B3GAT3* Gen identifiziert. Die Mutation führt zur Degradation dieses im Golgi-Apparat lokalisierten Proteins, das entscheidend für einen der letzten Schritte in der Glukosaminoglykan-Linker-Synthese ist.

Zusammenfassend wurden im Rahmen dieser Publikationspromotion drei molekulargenetische Ursachen von Syndromen mit Anomalien von Haut und Knochen untersucht. Für zwei dieser Defekte wurde das betroffene Gen erstmalig beschrieben. Dies und erste Analysen an Hautfibroblasten erbrachten initiale Hinweise auf die mögliche Funktion der jeweils betroffenen Proteine und die zugrundeliegenden Pathomechanismen. Für die medizinische und klinische Genetik konnte diese Arbeit neue Erkenntnisse liefern, die zu entscheidenden Verbesserungen hinsichtlich der molekulargenetischen Untersuchung des Spektrums autosomal rezessiver Syndrome mit Cutis laxa führen werden.

Abstract

This thesis comprises five articles published in international scientific journals. The main goal was the molecular genetic investigation of syndromes with bone and skin abnormalities. Furthermore, we investigated the physiological function of the affected gene products.

In patients suffering from a progeroid form of autosomal recessive cutis laxa we were able to identify causative mutations in *PYCR1* by conventional candidate gene- and high-throughput sequencing. The affected gene product, pyrroline-5-carboxylate reductase 1, localizes to mitochondria and is involved in *de novo* biosynthesis of proline. *PYCR1* deficient cells show increased sensitivity against oxidative stress and an increased apoptosis rate. This observation was confirmed in vivo using two model organisms.

Furthermore we could further expand the mutation and phenotype spectrum of the allelic disorders wrinkly skin syndrome/autosomal recessive cutis laxa type 2A, caused by mutations in the *ATP6V0A2* gene. We proved a loss of function mechanism as the underlying defect and showed the *ATP6V0A2* gene product to be localized in the Golgi-apparatus of dermal fibroblasts. We also developed a fibroblast-based method for the identification of *ATP6V0A2* mutation carriers. Furthermore we found an altered morphology of the Golgi-apparatus and an increased apoptosis rate in *ATP6V0A2* deficient cells.

In a family with skeletal abnormalities we found a specific mutation in the *B3GAT3* gene affecting the catalytic center of the encoded enzyme. This protein is localized in the Golgi-apparatus, and plays an important role in one of the last steps of the glycosaminoglycan-linker-synthesis.

Taken together, in this thesis three different molecular genetic diseases with bone and skin abnormalities were investigated. For two of them, the underlying genetic defect was described for the first time. Initial investigations on dermal fibroblasts lead to first indications on the potential function of the affected gene products and the underlying pathomechanism. For medical and clinical genetics, this work revealed new insight into the clinical manifestations of the syndromes analyzed and improved the possibility for molecular diagnostics of autosomal recessive syndromes with cutis laxa.

Einleitung

Hereditäre Erkrankungen haben ein großes Potential für die Aufklärung der physiologischen Funktion von Genen und deren Genprodukten. Eine Gruppe solcher Erkrankungen sind Syndrome mit Cutis laxa (CL). Wie der Name bereits nahelegt, zeigen die Betroffenen eine unelastische Haut, die je nach Erkrankungstyp und Körperregion entweder schlaff herunterhängt oder feine Falten bildet, als gemeinsames klinisches Charakteristikum. Ultrastrukturell fällt eine Verminderung und Fragmentierung der dermalen elastischen Fasern auf. Zusätzlich findet sich meist noch eine Reduktion des Unterhautfettgewebes. Beides zusammen führt zu einer starken Ähnlichkeit mit der Altershaut. Außerdem ist eine generalisierte Bindegewebsschwäche mit Gelenküberstreckbarkeit und Hernien, Osteoporose, bzw. Osteopenie und eine unterschiedlich stark ausgeprägte mentale Beeinträchtigung (MR) häufig anzutreffen. Das Spektrum autosomal rezessiver Erkrankungen mit CL ist bzgl. der phänotypischen Ausprägung sowie der zugrundeliegenden genetischen Defekte sehr heterogen (Morava et al. 2009). Die autosomal rezessive CL Typ 1 (ARCL1A,#219100; ARCL1B,#614437; ARCL1C,#613177) wird durch Mutationen in *Fibulin-4*, *-5* und *LTBP4* verursacht (Huchtagowder et al. 2006; Loeys et al. 2002; Urban et al. 2009). Diese Erkrankungen zeichnen sich insbesondere durch die Schwere des Phänotyps aus, was v.a. aus der Lungenbeteiligung resultiert.

Die autosomal rezessive CL Typ 2 (ARCL2A,#219200) überlappt in vielen Bereichen des Phänotyps mit der ARCL1, jedoch sind keine Veränderungen in Lunge und Gefäßen beschrieben. Kornak und Kollegen konnten zeigen, dass Mutationen im *ATP6V0A2* Gen, welches für die $\alpha 2$ -Untereinheit der V-Typ- H^+ ATPase kodiert, ursächlich für diese Erkrankung sind (Kornak et al. 2008). Ein der ARCL2A ähnlicher Phänotyp, das MACS-Syndrom (MACS,#613075), wurde erstmals in Verbindung mit Mutationen im *RIN2* Gen beschrieben, das für ein endosomales Protein kodiert (Basel-Vanagaite et al. 2009). Die Gerodermia osteodysplastica (GO,#231070) zeichnet sich durch eine besonders ausgeprägte Osteoporose sowie eine fehlende MR aus. Mutationen im *GORAB* Gen, das für ein Golgin kodiert, wurden als ursächlich beschrieben (Hennies et al. 2008). Die ARCL3 bezeichnet das De Barsy Syndrom (DBS,#219150), einen weiteren klinischen Subtyp, der sich durch eine schwere progeroide Symptomatik auszeichnet und für den der zugrundeliegende genetische Defekt nicht abschließend identifiziert wurde (Kunze et al. 1985).

Zielstellung

In Familien mit Cutis laxa bzw. Anomalien in der Haut oder im Skelett sollten die krankheitsauslösenden Mutationen identifiziert werden. Weiterführendes Ziel waren Analysen bezüglich der Funktion der betroffenen Genprodukte und der Pathogenese dieser Syndrome.

Methodik

Homozygotiekartierung

Genetische Kartierungen wurden zum einen mittels Analyse von SNPs (*Single Nucleotide Polymorphisms*) und zum anderen durch Analyse von Mikrosatelliten durchgeführt. SNP-Kartierungen wurden in Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Nürnberg im Cologne Center of Genomics durchgeführt. Zur Anwendung kamen Affymetrix 500K Microarrays. Die Datenanalyse der Rohdaten erfolgte durch Frau Gudrun Nürnberg mittels Software wie HomozygosityMapper und HaploPainter (Seelow et al. 2009; Thiele and Nurnberg 2005). Mikrosatellitenanalyse zur Feinkartierung erfolgte durch PCR-gestützte Amplifikation und anschließende Auftrennung der fluoreszenzmarkierten Produkte in einem Kapillarsequenzierungs-automaten (ABI 3730, Foster City). Die genutzten Primer wurden teilweise von Frau Prof. Katrin Hoffmann zur Verfügung gestellt. Die Sequenzen zusätzlicher Primer wurden durch Datenbanken ermittelt und durch Bindungsstellen für Universalprimer ergänzt. Zur Fluoreszenzmarkierung der PCR-Produkte wurden der PCR-Reaktion fluoreszenzmarkierte Universalprimer zugegeben und anschließend detektiert (Schuelke 2000).

Sequenzierung

DNA Sequenzierung erfolgte durch konventionelle Kettenabbruchsynthese. Für die Zyklen-basierte Sequenzierung wurde der BigDye Terminator (Applied Biosystems, Foster City) genutzt. Die Fragmente wurden in einem Kapillarsequenzierungs-automaten (Applied Biosystems 3730, Foster City) aufgetrennt. Die Analyse der Sequenzen wurde mit Sequencing Analysis (Applied Biosystems, Foster City) und Seqman (DNASTar) durchgeführt. Der Abgleich von Sequenzvarianten und die Beurteilung eines potentiell krankheitsverursachenden Charakters wurde durch Vergleich mit der Datenbanksequenz (Ensemble/NCBI ref. Seq) und mit Hilfe der Software Mutation Taster (Schwarz et al. 2010) durchgeführt.

Quantitative PCR (qPCR)

In dieser Arbeit wurde SybrGreen (Applied Biosystems) zum Nachweis der Genexpression in unterschiedlichen humanen sowie murinen Proben gewählt. Die Lyse des jeweiligen Materials wurde mit Trizol (Invitrogen) durchgeführt. Anschließend erfolgte eine RNA Extraktion durch Phenol/Chloroform. Die cDNA wurde durch reverse Transkription mittels des H Minus First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas) gewonnen. Die Auswertung erfolgte durch relative Quantifizierung, d. h. relativ zu einem Kalibrator in einem ABI Prism 7500 Thermocycler (Applied Biosystems Foster City US).

Zellkultur

Fibroblasten wurden in DMEM 4,5 g/l Glukose (Lonza), angereichert mit 10% fetalem Kälberserum (Gibco), 1% Glutamin (Lonza) und 1% Penizillin/Streptomycin (Lonza) kultiviert. Die Kultivierung von HeLa Zellen wurde in DMEM 4,5 g/l Glukose, angereichert mit 5% fetalem Kälberserum und 1% Glutamin durchgeführt. Alle Zellkulturen wurden in einem Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂-Gehalt gehalten. Die Passagierung der Zellen erfolgte mittels Trypsin/EDTA (Lonza).

RNA Interferenz

Für diese Experimente wurden 0,9x10⁶ HeLa Zellen in einer Platte mit sechs Vertiefungen auf Deckgläschen mit 12 mm Durchmesser ausgesät. Nach 24 Stunden wurden siRNAs gegen unterschiedliche Zielgene mittels Interferin (PolyPlus) in diese Zellen transfiziert. Um eine hohe Effizienz zu erreichen, wurde dieser Prozess nach 12 Stunden wiederholt. Die Durchführung erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

Immunfluoreszenz auf fixierten Zellen

Zellen wurden auf Deckgläschen kultiviert. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS (Lonza) wurden die Zellen in 4% Paraformaldehyd w/v in 1x PBS für 10 Minuten bei 4 °C fixiert. Die Permeabilisierung wurde nach weiteren drei Waschschritten mit 1x PBS mit 0,1% Saponin w/v in 3% BSA w/v in 1x PBS bzw. mit 0,4% Triton-X-100 v/v in 3% BSA w/v in 1x PBS durchgeführt. Die Inkubation mit primären Antikörpern erfolgte über Nacht in 3% BSA w/v in 1x PBS bei 4 °C. Nach dreimaligem Waschen mit 1x PBS wurde die Inkubation des sekundären, fluoreszenzmarkierten Antikörpers 1,5 Stunden bei Raumtemperatur in 3% BSA w/v in 1x PBS durchgeführt. DNA wurde mit DAPI in 1x PBS für 10 Minuten bei Raumtemperatur gefärbt. Die Präparate wurden mit Fluoromount G (SouthernBiotech) auf Objektträgern fixiert und mit einem LSM510 meta Laserscanning-Mikroskop ausgewertet.

Analyse der mitochondrialen Morphologie nach oxidativem Stress

Fibroblasten wurden auf Deckgläschen ausgesät. Nach 48 Stunden bei einer Dichte von ca. 70% wurden die Zellen mit 500 µM Wasserstoffperoxid in Serum-reduziertem Wachstumsmedium für 10 Minuten behandelt und dann fixiert. Das mitochondriale Netzwerk wurde mittels Antikörpern sichtbar gemacht. Zur Auswertung wurden Zellen mit einem tubulären, intermediären und einem fragmentierten, mitochondrialen Netzwerk ausgezählt und die Prozentsätze der gesamten Zellpopulation gegeneinander aufgetragen. Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt und die Standardabweichung der jeweiligen Mittelwerte bestimmt. Signifikanzwerte wurden mittels des *Student's t-Test* bestimmt.

Retrograder Transport (Golgi zum Endoplasmatischen Retikulum)

Fibroblasten wurden auf Deckgläschen ausgesät. Nach 48 Stunden hatten die Zellen eine Dichte von 70%. Die Behandlung mit 5 µg/ml Brefeldin A erfolgte für exakt sechs Minuten in normalem Wachstumsmedium. Die Zellen wurden fixiert und unterschiedliche Proteine des Golgi Kompartiments mit spezifischen Antikörpern gefärbt. Für jede Zelllinie wurden mindestens 500 Zellen pro Experiment ausgezählt und die Rate von Zellen, die noch eine intakte Golgi-Struktur aufwiesen, bestimmt.

TGFbeta 1 ELISA

Zur Analyse von TGFbeta 1 in Zellkulturüberständen wurde ein kommerzieller ELISA der Firma R&D benutzt. Hierzu wurden 2×10^6 Fibroblasten in Platten mit sechs Vertiefungen ausgesät. Bei dieser Zelldichte hatten die Zellen bereits Konfluenz erreicht und waren damit bereit zur Sekretion von Komponenten der extrazellulären Matrix (EZM). Nach zwei Tagen wurde das Wachstumsmedium durch ein serumfreies Medium (DMEM mit Ultraglutamin und 5mg/ml BSA) ersetzt. Nach weiteren 24 Stunden wurde das Medium in Polypropylenröhrchen gesammelt und Zelltrümmer abzentrifugiert. Nach Säureaktivierung wurde der Gehalt an TGFbeta 1 mit dem TGFbeta 1-spezifischen ELISA analysiert. Die erhaltenen Werte wurden anhand der Gesamtproteinmenge korrigiert.

Western Blot

Proteinanalytik wurde aus Fibroblastenlysaten durchgeführt. Hierzu wurden die Zellen bis zu einem definierten Konfluenzgrad kultiviert. Die Lyse erfolgte mit entsprechenden Zellysepuffern und die Konzentration der erhaltenen Lysate wurde mittels eines BCA-Kits (Pierce) bestimmt. Definierte Proteinmengen wurden durch SDS Polyacrylamid-Gelelektrophorese aufgetrennt und im Tank-Blot Verfahren über Nacht bei 30 V auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte über Nacht bei 4 °C. Nach drei Waschschrritten erfolgte die Inkubation des, mit Meerrettichperoxidase gekoppelten, sekundären Antikörpers 1,5 Stunden bei 4 °C. Nach weiteren fünf Waschschrritten wurde die Membran mit ECL Reaktionslösung 10 Minuten bei 4 °C inkubiert und mittels Licht-sensitivem Film (Aqfa) visualisiert.

Ergebnisse

In Familien mit an Cutis laxa erkrankten Personen, die einen vorgealterten (progeroiden) Aspekt und in den meisten Fällen eine MR aufwiesen, wurden durch Homozygotiekartierungen chromosomale Regionen identifiziert, die mit der Erkrankung assoziiert waren. Durch nachfolgende Kandidatengensequenzierung bzw. Hochdurchsatzsequenzierung gelang es, Mutationen im *PYCR1* Gen als Erkrankungsursache zu identifizieren. Diese Mutationen, bei denen es sich zum Großteil um Aminosäuresubstitutionen handelte, akkumulierten in den Exons 4 bis 6 des Gens. Diese Veränderungen führten zu einer unterschiedlich ausgeprägten Degradation des PYCR1 Proteins, der Pyrrolin-5-Carboxylat-Reduktase 1. Dieses Enzym ist an der *de novo* Biosynthese der Aminosäure Prolin beteiligt. Für dieses Protein konnte durch Immunfärbung erstmals eine mitochondriale Lokalisation gezeigt werden. Des Weiteren war eine höhere Sensitivität PYCR1-defizienter Zellen gegenüber oxidativem Stress zu beobachten. Dies äußerte sich durch ein verändertes mitochondriales Membranpotential, eine abnorme mitochondriale Morphologie und, daraus folgend, eine erhöhte Neigung zur Apoptose. Durch Pycr1 Inaktivierung in zwei Tiermodellen konnten dies untermauert werden (Reversade et al. 2009). In weiteren Analysen gelang es, das klinische- sowie das Mutations-spektrum zu vergrößern (Zampatti et al. 2012).

Obwohl die ARCL2A, bzw. das Wrinkly Skin Syndrom (WSS,#278250) zu derselben Krankheitsfamilie wie die *PYCR1*-abhängige CL gehört, sind beide Krankheitsbilder klinisch sowohl durch den fazialen Aspekt als auch durch den Verlauf klar abzugrenzen. Kornak und Kollegen konnten zeigen, dass Mutationen im *ATP6V0A2* Gen ursächlich für beide Erkrankungen sind, und sie tatsächlich nur unterschiedliche Schweregrade derselben Pathologie widerspiegeln (Kornak et al. 2008). Diese Form der CL ist durch einen kombinierten N- und O-Glykosylierungsdefekt im Serum gekennzeichnet und zählt damit zu der Gruppe der angeborenen Erkrankungen mit Glykosylierungsstörungen (CDG) (Kornak et al. 2008). In weiteren Untersuchungen konnte das Phänotyp- und Genotypspektrum vergrößert und vertieft werden (Fischer et al. 2012; Huchtagowder et al. 2009). Ein Großteil der identifizierten Mutationen hat Leseraster-verschiebende Wirkung, bzw. es handelt sich um Stop-Mutationen. Immunfärbungen auf fixierten Zellen ergaben, dass ATP6V0A2 in Kontroll-Fibroblasten im Golgi-Apparat lokalisiert ist, wohingegen es in Patienten-Fibroblasten je nach Mutationstyp gar nicht bzw. stark vermindert nachweisbar ist (Fischer et al. 2012). Weiterführende Untersuchungen ergaben, dass in ATP6V0A2-defizienten Zellen unter konfluenten Kulturbedingungen der Golgi-Apparat stark fragmentiert ist. Gleiches gilt bei akutem Verlust des Proteins durch RNA Interferenz in HeLa Zellen. Ebenfalls sind abnormal viele und große sekretorische Vesikel nachweisbar. Darüber hinaus konnte in

matrixproduzierenden Zellen gezeigt werden, dass die Reifung bzw. der Transport von Tropoelastin beeinträchtigt ist (Huchtagowder et al. 2009). In vorangegangenen Arbeiten wurde bei *ATP6V0A2*-Defizienz ein Transportdefekt von Membranen aus dem Golgi-Apparat in das endoplasmatische Retikulum (ER) nach Brefeldin A Behandlung gezeigt (Kornak et al. 2008). Dieses Experiment wurde nun mit Zellen durchgeführt, die Mutationen in den Genen *PYCR1* oder *GORAB* aufwiesen. In diesen Zellen konnte eine solche Verzögerung nicht nachgewiesen werden. Damit eignet sich dieses Experiment als möglicher „Vortest“ für die *ATP6V0A2*-abhängige CL. Angesichts der Veränderungen in der EZM bei CL und des engen Zusammenhangs zwischen elastischen Fasern und TGF-Signalübertragung wurde dieser Signaltransduktionsweg genauer betrachtet. Diese Untersuchungen ergaben, dass sowohl die TGFbeta1 Konzentration im Zellkulturmedium erhöht ist, als auch eine stärkere Phosphorylierung von Smad2 auftritt. Dies weist auf eine verstärkte Aktivierung dieses Signaltransduktionsweges hin (Fischer et al. 2012).

In einer Familie mit skelettalen Auflälligkeiten wurde nach Homozygotiekartierung und Kandidatengensequenzierung eine Mutation im *B3GAT3* Gen als ursächlich identifiziert. Diese Aminosäuresubstitution liegt nahe am katalytischen Zentrum des Genprodukts GlcAT-I, einem an der Synthese von Glukosaminoglykan-Seitenketten beteiligten Enzym. Durch Immunfärbungen von Fibroblasten sowie von HeLa Zellen nach Überexpression konnte gezeigt werden, dass das Protein im Golgi-Apparat lokalisiert ist. Die Mutation, die das katalytische Zentrum verändert, führt in Patienten-Fibroblasten zur Degradation des GlcAT-I Proteins. Entsprechend ist in Patientenzellen die enzymatische Aktivität stark herabgesetzt. Interessanterweise ist das mutierte Protein nach Überexpression in HeLa Zellen stabil, zeigt jedoch ebenfalls eine drastisch herabgesetzte enzymatische Aktivität. Die resultierenden Proteoglykane mit vermindertem Glykosaminoglykan-Anteil lassen sich gut mit den beobachteten klinischen Manifestationen in Einklang bringen (Baasanjav et al. 2011).

Zusammenfassend konnten in dieser Arbeit zwei neue Gendefekte identifiziert werden, die durch Störungen unterschiedlicher Funktionen des sekretorischen Pathways zu Syndromen mit Haut- und Knochenanomalien führen. Darüber hinaus wurde durch Untersuchung von vielen weiteren Patienten mit autosomal rezessiver CL das Klinische- und das Mutationsspektrum für die jeweiligen Gendefekte erweitert. Daran schlossen sich zellbiologische und proteinbiochemische Untersuchungen an. Die meisten bekannten rezessiven Syndrome mit CL werden entweder durch Veränderungen in Proteinen der EZM bzw. des sekretorischen Pathways verursacht. Im Gegensatz hierzu konnten wir durch die Untersuchung der *PYCR1*-abhängigen Form darlegen, dass auch eine veränderte Funktion der Mitochondrien zu solchen Erkrankungen führen kann.

Diskussion

Vergleich der Merkmale der hier betrachteten CL Phänotypen

Patienten mit CL Syndromen zeigen als gemeinsames klinisches Charakteristikum angeborene Veränderungen der Haut. Diese Symptome sind besonders ausgeprägt im Bereich des Gesichts, der Hand- und Fußrücken und des Abdomens. Darüber hinaus wurden, bei dieser Gruppe von Erkrankungen, Abweichungen in der Struktur und Häufigkeit der elastischen Fasern in der Dermis nachgewiesen.

Das Skelett ist ebenfalls betroffen. Dies kann sich als Osteopenie (*ATP6V0A2*- und *PYCR1*-abhängige CL) oder als schwere Osteoporose mit kindlichen Frakturen (*GORAB*-abhängige CL) manifestieren. Es kommt häufig zu Fehlstellungen der Füße, dislozierten Hüftgelenken und im Fall der *ATP6V0A2*-abhängigen CL schließt sich die vordere Fontanelle erst im späten Kindesalter (Rajab et al. 2008).

Ebenfalls ein wichtiges Charakteristikum sind die fazialen Auffälligkeiten. Patienten mit *PYCR1* Mutationen zeigen eine typische dreieckige Gesichtsform, die durch gering ausgebildete Kieferknochen bedingt ist und verhältnismäßig große, oft abstehende Ohren (Reversade et al. 2009; Zampatti et al. 2012). Dagegen ist bei Patienten mit *ATP6V0A2* Mutationen das Gesicht eher lang und durch nach außen abfallende Lidspalten gekennzeichnet (Fischer et al. 2012; Kornak et al. 2008). Bei der GO stehen fazial v.a. eine Hypoplasie der Kieferknochen und hängende Wangen im Vordergrund, die das vorgealterte Aussehen bestimmen (Hennies et al. 2008; Rajab et al. 2008).

Außer Geroderma osteodysplastica sind diese Syndrome durch das Auftreten einer MR unterschiedlicher Schwere definiert. Außerdem zeigen sich häufig Veränderungen des zentralen Nervensystems (ZNS) wie z. B. Migrationsdefekte bei *ATP6V0A2*- und eine Corpus callosum Agenesie bei *PYCR1*-Defizienz, die zu teilweise schwerer MR führen (Kornak et al. 2008; Reversade et al. 2009; Van Maldergem et al. 2008). Der Hautphänotyp und die Auffälligkeiten des Skeletts werden teilweise beim Heranwachsen der Betroffenen milder, was eine klinische Diagnose im höheren Alter oft schwierig macht. Infolgedessen ist die Dunkelziffer vermutlich hoch. Darüber hinaus ist die klinische Bewertung sehr subjektiv und oft nicht im Einklang mit dem zugrundeliegenden molekulargenetischen Defekt (Kouwenberg et al. 2011; Yildirim et al. 2011). Durch die Identifikation der betroffenen Gene ist es nun möglich, frühzeitig eine gesicherte Diagnose zu stellen, was es erlaubt, die Familien hinsichtlich Komplikationen und Prognose besser zu beraten.

Die schwerwiegendsten Manifestationen treten bei diesen Patienten, wie schon erwähnt, im ZNS und im Bindegewebe auf. Wie können diese jedoch mit der jeweiligen Proteinfunktion in Zusammenhang gebracht werden?

Die Funktionen der Genprodukte und ihre mögliche Konvergenz

Verschiedene Genprodukte sind in die Pathogenese der in dieser Arbeit betrachteten Syndrome mit Haut- und Knochenanomalien involviert. Die klassische Funktion des ATP6V0A2 Proteins als Protonenkanal der V-Typ-H⁺ ATPase impliziert eine veränderte pH Homöostase in den vermutlich betroffenen Kompartimenten (Guillard et al. 2009). Das Protein scheint unterschiedliche subzelluläre Lokalisationen einnehmen zu können und befindet sich je nach Funktion des jeweiligen Zelltyps entweder in frühen Endosomen oder im Golgi-Apparat, in manchen Zellen in beiden (Fischer et al. 2012; Gilchrist et al. 2006; Hurtado-Lorenzo et al. 2006). Durch die Erzeugung von pH-Gradienten in Membransystemen könnte das $\alpha 2$ -Protein dadurch z. B. die Aktivitäten bzw. Sortierung von unterschiedlichsten Proteinen in das jeweils korrekte Kompartiment beeinflussen. Weiterhin wurde für ATP6V0A2 eine SNARE-ähnliche Funktion (*soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor*) postuliert. Ein solches Protein ist direkt an der Fusion von Membranen in intrazellulären Transportprozessen beteiligt. Diese Funktion suggeriert eine direkte Beteiligung an intrazellulärem Membrantransport (Wada 2007).

Für das GORAB Protein ist die Funktion nur wenig untersucht. Es ist wie das ATP6V0A2 Protein ebenfalls im Golgi-Apparat lokalisiert und interagiert mit der kleinen GTPase RAB6. Auf Grund der Interaktion mit diesem klassischen Regulator des intrazellulären Transports kann vermutet werden, dass GORAB ebenfalls in die Regulation und den Ablauf von Membrantransportprozessen involviert ist (Hennies et al. 2008).

Das *B3GAT3* Genprodukt GlcAT-I ist auch im Golgi-Apparat lokalisiert. Die Funktion ist im Gegensatz zu den anderen in dieser Arbeit beleuchteten Proteinen relativ gut verstanden. Dieses Enzym katalysiert einen der letzten Schritte in der Linker-Synthese von Glukosaminoglykan-Seitenketten und ist damit essentieller Bestandteil dieser posttranslationalen Modifikationsmaschinerie (Baasanjav et al. 2011; Prydz and Dalen 2000).

Alle bislang beschriebenen Proteine sind Teil des sekretorischen Pathways, was unter anderem eine mögliche Funktion in Protein-Reifung, -Modifikation und -Transport nahelegt. Mutationen in diesen Proteinen und daraus folgend eine Dysfunktion des sekretorischen Pathways scheint sehr wahrscheinlich die Ursache für die in dieser Arbeit betrachteten Erkrankungen zu sein. PYCR1 dagegen ist Mitochondrien-assoziiert (De Ingeniis et al. 2012; Reversade et al. 2009). Seine Funktion in diesem Organell ist weitestgehend unklar. Als Teil eines konservierten Pathways zur Synthese der Aminosäure Prolin aus Glutamat kann man sich drei möglicherweise an der Pathogenese beteiligte Szenarien vorstellen. Zum einen könnte durch PYCR1-Defizienz die Prolin-Konzentration verringert werden. Prolin selbst wird eine Funktion als Radikalfänger zugeschrieben (Hagedorn and Phang 1983; Krishnan et al. 2008). Durch

die mitochondriale Lokalisation könnte lokal erzeugtes Prolin an der Detoxifizierung bestimmter Nebenprodukte, z.B. reaktive Sauerstoffspezies (ROS) aus der oxidativen Phosphorylierung, beteiligt sein. Eine Reduktion der Prolin-Konzentration hätte also eine Anreicherung dieser toxischen Verbindungen zur Folge. Die erhöhte Sensitivität gegenüber oxidativem Stress könnte also durch eine reduzierte Verfügbarkeit des Radikalfängers Prolin zu erklären sein. Auf der anderen Seite könnte durch PYCR1-Defizienz der Metabolit Pyrrolin-5-carboxylat (P5C) akkumulieren, der inhibierende Wirkung auf die Funktion der Atmungskette zu haben scheint (Nishimura et al. 2012). Wenn unter oxidativem Stress mehr Prolin zu dessen Kompensation gebildet werden muss, würde in PYCR1-Defizienten Zellen eine erhöhte Menge an P5C entstehen. Durch die beschriebene Beeinträchtigung der Atmungskette durch P5C könnte somit auch der beobachtete Kollaps des mitochondrialen Membranpotential in den Patienten-Fibroblasten unter Stressbedingungen zu erklären sein. Darüber hinaus wird bei der Reaktion von P5C zu Prolin NADP^+ aus NADPH gebildet. Eine gestörte enzymatische Funktion von PYCR1 hätte also neben den bereits erwähnten Veränderungen ebenfalls Auswirkungen auf das Redoxsystem im betroffenen Kompartiment. Diese beschriebenen Abweichungen von der normalen Funktion von PYCR1 könnten also, abhängig von der genauen submitochondrialen Lokalisation, die beobachteten Phänomene und sehr wahrscheinlich daraus folgend die Erhöhung der Apoptoserate erklären.

Der sekretorische Pathway und die Mitochondrien sind über unterschiedliche, noch nicht im Detail verstandene, Wege miteinander verbunden. Von der Synthese und Modifikation mitochondrialer Protein am ER bis zur Regulation von Kalzium Ionen in beiden Organellen bestehen aber auch bekannte Verbindungen, die bei Störungen entweder das eine oder das andere Organell negativ beeinflussen würden (Ferri and Kroemer 2001). Wie ist es jedoch möglich, dass Veränderungen in den beschriebenen Funktionen des sekretorischen Pathways und der Mitochondrien Manifestationen im ZNS und überlappende Symptome im Bindegewebe erzeugen können?

Veränderungen im ZNS von CL Patienten:

Der ZNS Phänotyp ist in den unterschiedlichen Gruppen des rezessiven Spektrums von CL-Syndromen, wie bereits erwähnt, sehr variabel und eignet sich daher auch für differentialdiagnostische Zwecke. Die Gerodermia osteodysplastica weist keine nennenswerte MR auf. Das *GORAB* Gen ist im Gehirn nur schwach exprimiert, was möglicherweise die Ursache dafür ist (Hennies et al. 2008). Im Gegensatz dazu ist die *ATP6V0A2* bzw. *PYCR1* mRNA im ZNS stärker nachweisbar (Reversade et al. 2009). Welche Rolle spielen jedoch beide Proteine im Gehirngewebe?

Im Falle des *ATP6V0A2* Proteins wäre z.B. in Neuronen eine Lokalisation in endosomen bzw. sekretorischen Vesikeln denkbar, wobei *ATP6V0A1* scheinbar die

wichtigste Untereinheit der Protonenpumpe auf synaptischen Vesikeln ist (Guillard et al. 2009). Ein Verlust von ATP6V0A2 könnte jedoch fehlerhafte Sortierungen verschiedener Proteine nach sich ziehen (Foulquier et al. 2012). Darüber hinaus könnte das Fehlen zu Abweichungen in der Ausschüttung von Neurotransmittern oder anderen Signalmolekülen führen. Veränderungen in Membrantransport-Prozessen könnten hierbei eine Rolle spielen. Kürzlich wurde gezeigt, dass die V-ATPase bei derartigen Prozessen eine essentielle Bedeutung hat, was sich mit unseren Beobachtungen deckt (Kozik et al. 2013). Das wiederum könnte zu veränderten Recycling-Kinetiken von Membranen z. B. zur Plasmamembran führen. Die Folge wäre möglicherweise eine veränderte Polarisierung und daraus folgend Positionierung der betroffenen Zellen, was den Migrationsdefekt erklären könnte (Li and DiFiglia 2012). Nicht ausgeschlossen werden kann jedoch auch eine fehlerhafte Modifikation oder Synthese der EZM, welche den migrierenden Neuronen als Leitschiene dient (Franco and Muller 2011). Neben der MR werden bei der *PYCR1*-abhängigen CL häufig für diese Erkrankung spezifische, athetotische Bewegungsstörungen beobachtet. Diese weisen auf eine Schädigung des Striatums hin. Als wichtiges System der motorischen Kontrolle könnten fehlerhafte Abläufe in dessen Neuronen zu einer veränderten Freisetzung von bestimmten Neurotransmittern führen. Ein Beispiel wäre die sog. exzitatorische glutamaterge Transmission. Hierbei fungiert Glutamat selbst als Neurotransmitter. Es wurde gezeigt dass hohe Prolin Konzentrationen antagonistische Wirkungen auf die synaptische Aktivität haben, wohingegen geringe Konzentrationen eine Erhöhung des depolarisations Grades der synaptischen Membran erzeugen (Van Harreveld and Strumwasser 1981). In diesem Zusammenhang kann man sich vorstellen, dass die Prolin zu Glutamat Ratio nahe der Synapse durch das Mitochondrium moduliert wird. Sollte diese Ratio im Falle der *PYCR1*-Defizienz zugunsten des Glutamates verschoben werden, hätte das Auswirkungen auf die synaptische Aktivität im Striatum was dann die athetotische Bewegungsstörungen erklären könnte. Sowohl bei der *ATP6V0A2*- als auch bei der *PYCR1*-abhängiger CL konnten *in vitro* erhöhte Apoptoseraten beobachtet werden. Die beschriebenen Veränderungen könnten also in letzter Konsequenz eine erhöhte Apoptoserate *in vivo* hervorrufen, die zu den strukturellen Auffälligkeiten des Gehirns in beiden Syndromen führt.

Veränderungen im Bindegewebe von CL Patienten:

Der Bindegewebsphänotyp in den rezessiven Syndromen mit CL überlappt zum Teil sehr stark. Die allen Formen der CL gemeinsame Fragmentierung und Reduktion der elastischen Fasern in der Dermis ist einer der Gründe für diese Symptomatik. Wie können die hier beobachteten Veränderungen in der EZM Architektur jedoch entstehen? Im Falle der Mutationen in *FBLN4*, *-5* und *LTBP4*, die zu autosomal rezessiven CL Typ 1 führen, liegt es mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit an der

Bildung/Reifung der EZM (Callewaert et al. 2012; Huchtagowder et al. 2006; Loeys et al. 2002; Urban et al. 2009). Interessanterweise, werden bei vielen dieser Syndrome Erhöhungen in der TGFbeta Signaltransduktion beobachtet (Callewaert et al. 2011; Hoyer et al. 2009; Urban et al. 2009). Dies könnte ein sekundärer Effekt der Veränderten EZM Zusammensetzung sein, die möglicherweise weniger der latenten TGFbeta Form binden kann (Callewaert et al. 2011). Die in dieser Arbeit betrachteten Gene sind in Haut und Knochen stark exprimiert (Hennies et al. 2008; Reversade et al. 2009). Das kann als Hinweis gewertet werden, dass die Genprodukte in diesen Geweben eine besondere Rolle spielen. Wie beobachtet wurde, sind Prozesse im Transport aus dem Golgi-Apparat zum ER bzw. aus der Zelle in ATP6V0A2 defizienten Zellen gestört (Fischer et al. 2012; Huchtagowder et al. 2009; Kornak et al. 2008). Veränderungen in solchen Abläufen können z.B. zu Stresssituationen im Golgi-Apparat bzw. im ER und dadurch zu Apoptose führen (Hashimoto et al. 2003). Ebenso wie in neuronalen Geweben unterliegen bestimmte Zelltypen des Bindegewebes ebenfalls nur einer geringen Proliferationsrate. Sollte also das Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose dieser matrixproduzierenden Zellen gestört sein, könnte das die abnormalen Matrixstrukturen in der Haut und möglicherweise auch im Knochen erklären. Durch falsch gebildete Matrixvorstufen und mögliche Akkumulationen in sekretorischen Organellen könnten ebenfalls Stresssituationen entstehen, die letztlich zum Zelltod führen. Ebenso wäre es möglich, dass die betroffenen Zellen durch veränderte Proteinreifung bzw. Exozytose weniger EZM in ihrer reifen Form ablagern können. Wie bereits erwähnt, ist der Skelettphänotyp in den Syndromen mit CL unterschiedlich stark ausgeprägt. In der Knochen-Homöostase spielt die EZM ebenfalls eine entscheidende Rolle. Anormale Matrixdeposition im Knochen kann je nach Grad zu fehlerhaften Mineralisierungen führen. Das würde dann die Knochenstruktur in ihrer Qualität beeinflussen und, je nach Ursache, zu unterschiedlich schweren Skeletterkrankungen führen (Kornak and Mundlos 2003). Darüber hinaus können Veränderungen an Proteinmodifikationen zu solchen Manifestationen führen. Wie wir zeigen konnten, gehen Mutationen im *B3GAT3* Gen ebenfalls mit Veränderungen im Skelett einher (Baasanjav et al. 2011). Diese überlappen nur wenig mit den Veränderungen in den Cutis laxa betroffenen Individuen, zeigen jedoch wie Veränderungen von Posttranslationalen-Modifikationen zu Manifestationen im Knochengewebe führen können. Proteoglykanstrukturen sind unter anderem in die Bindung bestimmter Moleküle und die Signaltransduktion unterschiedlicher Stoffwechselwege involviert (Lin 2004). Mutationen z. B. in Galactosyltransferase I sind ursächlich für das Ehlers-Danlos Syndrome vom progeroiden Typ (EDS,#130070). Dieses Syndrom, das Überlappungen zu den Syndromen mit CL aufweist, ist durch fehlerhafte Proteoglykanstrukturen als Resultat dieser Mutation gekennzeichnet (Seidler et al. 2006). Sind solche Veränderungen ebenfalls in den Syndromen mit CL denkbar?

Veränderungen der Proteoglykanstrukturen könnten möglicherweise durch eine gestörte pH-Homöostase im Golgi-Apparat entstehen. Dadurch wäre es möglich, dass einige Enzyme nicht korrekt arbeiten können und es dadurch zu abnormalen Proteinmodifikationen kommt. Ebenso könnten Transport-Kinetiken bestimmter, für die Glukosaminoglykan-Synthese essentieller, Enzyme gestört sein. Dies könnte ebenfalls eine Erklärung für den CDG in Patienten mit *ATP6V0A2*-abhängiger CL darstellen. Ein Großteil der beschriebenen Mutationen, die zu autosomal rezessiven Formen von CL führen, betreffen Gene, deren Produkte entweder Komponenten der elastischen Fasern darstellen, oder die im Golgi- oder endosomalen Kompartiment lokalisiert sind (Basel-Vanagaite et al. 2009; Hennies et al. 2008; Huchtagowder et al. 2006; Kornak et al. 2008; Loeys et al. 2002; Urban et al. 2009). Überraschenderweise erzeugen Mutationen in den Genen *ALDH18A1* und *PYCR1*, die für mitochondriale Gene kodieren, einen überlappenden Phänotyp (Bicknell et al. 2008; Reversade et al. 2009). Wie können aber Mutationen in diesen Genen zu den beobachteten Veränderungen der EZM führen? Beide Proteine sind in die Prolin-Biosynthese involviert (Mohamed et al. 2011). Da die Aminosäure Prolin aus der Nahrung freigesetzt und von extrazellulär aufgenommen werden kann, bleibt hier die Frage warum Limitierungen in der Prolinsynthese zu diesen Veränderungen führen können. Eine verringerte Produktion von Prolin kann sicher bis zu einem gewissen Maß von der Zelle durch eine erhöhte Aufnahme kompensiert werden. Wenn jedoch der komplette Prolinzyklus innerhalb des Mitochondriums, z.B. im Intermembranraum, lokalisiert sein sollte könnte Prolin zwar durch die äußere mitochondriale Membran frei diffundieren, jedoch wäre der Prozess durch bestimmte Transporter in der inneren Membran limitiert bzw. streng kontrolliert. Wenn Prolin z.B. in der Matrix für dort ansässige Translationsprozesse benötigt würde, könnte man sich eine verringerte Translation und dadurch sekundäre Veränderungen in z.B. der Atmungskette vorstellen, die zur Apoptose führen könnten. Ebenfalls könnte es durch eine verringerte Prolinsynthese zu Limitierungen dieser Aminosäure am ER kommen. Mitochondrien und das ER sind in vielen Situationen eng verbunden (Ferri and Kroemer 2001). Würde Prolin beispielsweise vom Mitochondrium produziert, könnte dies zu einer lokalen Erhöhung der Prolin Konzentration am ER kommen. Da auch Komponenten der EZM wie Kollagene am ER translatiert werden, könnte man sich dadurch z.B. eine veränderte Kollagensynthese/Kollagenreifung vorstellen. Interessanterweise treten in diesen Patienten tatsächlich Veränderungen in den Kollagenstrukturen der tieferen Dermissschichten auf (Kretz et al. 2011; Martinelli et al. 2012). Da Kollagen das häufigste Protein in der Knochenmatrix darstellt, wäre hier möglicherweise ebenfalls ein Grund für die veränderten Knochenstrukturen in den CL Patienten zu sehen (Kornak and Mundlos 2003).

Abschlussbetrachtung

Die Forschung zur Pathogenese der autosomal rezessiven Syndrome mit CL hat in den letzten Jahren große Fortschritte gemacht. Dies hat zu einer besseren Versorgung der Patienten hinsichtlich genetischer Beratung und Prognosebewertung geführt. Zusätzlich konnten erste Informationen zur Funktion der betroffenen Genprodukte erarbeitet werden. Wie in Ansätzen dargelegt werden konnte, ist es möglich, dass die in dieser Arbeit betrachteten unterschiedlichen Gendefekte – trotz ihrer auf den ersten Blick eklatanten funktionellen Unterschiede - primär oder sekundär ähnliche Abläufe in der Zelle stören, was die Ähnlichkeiten der Symptomatik erklären könnte. Auf der einen Seite sind Prozesse in der Proteinsynthese und Reifung, besonders im Zusammenhang mit der EZM, als wichtigen Ansatzpunkt für den Pathomechanismus zu betrachten. Auf der anderen Seite sind Transportprozesse in und aus der Zelle weiterführend zu analysieren. Die *PYCR1*-abhängige CL zeigt, dass die oben genannten Abläufe möglicherweise auch durch mitochondriale Dysfunktionen verursacht werden können. Als zelluläre „Endstrecke“ der hier betrachteten Syndrome mit CL könnte ein Ungleichgewicht in der Proliferation/Apoptose Ratio vorliegen. Diese Gruppe von Erkrankungen bietet die Möglichkeit, ein vorher nicht offensichtliches Zusammenspiel zwischen dem Golgi-Apparat, den Mitochondrien und der EZM zu postulieren und zu erforschen. Somit konnte ich durch meine Arbeit nicht nur zu einer Verbesserung der Diagnose und des Verständnisses des klinischen Bildes und der Prognose beitragen, sondern auch neue Aspekte der zellulären Funktion und des Zusammenspiels der zellulären Kompartimente aufdecken.

Referenzen

- Baasanjav S, Al-Gazali L, Hashiguchi T, Mizumoto S, Fischer B, Horn D, Seelow D, Ali BR, Aziz SA, Langer R, Saleh AA, Becker C, Nurnberg G, Cantagrel V, Gleeson JG, Gomez D, Michel JB, Stricker S, Lindner TH, Nurnberg P, Sugahara K, Mundlos S, Hoffmann K (2011) Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects. *Am J Hum Genet* 89: 15-27
- Basel-Vanagaite L, Sarig O, Hershkovitz D, Fuchs-Telem D, Rapaport D, Gat A, Isman G, Shirazi I, Shohat M, Enk CD, Birk E, Kohlhase J, Matysiak-Scholze U, Maya I, Knopf C, Peffekoven A, Hennies HC, Bergman R, Horowitz M, Ishida-Yamamoto A, Sprecher E (2009) RIN2 deficiency results in macrocephaly, alopecia, cutis laxa, and scoliosis: MACS syndrome. *Am J Hum Genet* 85: 254-63
- Bicknell LS, Pitt J, Aftimos S, Ramadas R, Maw MA, Robertson SP (2008) A missense mutation in ALDH18A1, encoding Delta1-pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS), causes an autosomal recessive neurocutaneous syndrome. *Eur J Hum Genet* 16: 1176-86
- Callewaert B, Renard M, Huchtagowder V, Albrecht B, Hausser I, Blair E, Dias C, Albino A, Wachi H, Sato F, Mecham RP, Loeyls B, Coucke PJ, De Paepe A, Urban Z (2011) New insights into the pathogenesis of autosomal-dominant cutis laxa with report of five ELN mutations. *Hum Mutat* 32: 445-55
- Callewaert B, Su CT, Van Damme T, Vlummens P, Malfait F, Vanakker O, Schulz B, Mac Neal M, Davis EC, Lee JG, Salhi A, Unger S, Heimdal K, De Almeida S, Kornak U, Gaspar H, Bresson JL, Prescott K, Gosendi ME, Mansour S, Pierard GE, Madan-Khetarpal S, Scieurba FC, Symoens S, Coucke PJ, Van Maldergem L, Urban Z, De Paepe A (2012) Comprehensive Clinical and Molecular Analysis of 12 Families with Type 1 Recessive Cutis Laxa. *Hum Mutat*
- De Ingeniis J, Ratnikov B, Richardson AD, Scott DA, Aza-Blanc P, De SK, Kazanov M, Pellecchia M, Ronai Z, Osterman AL, Smith JW (2012) Functional specialization in proline biosynthesis of melanoma. *PLoS One* 7: e45190
- Ferri KF, Kroemer G (2001) Organelle-specific initiation of cell death pathways. *Nat Cell Biol* 3: E255-63
- Fischer B, Dimopoulou A, Egerer J, Gardeitchik T, Kidd A, Jost D, Kayserili H, Alanay Y, Tantcheva-Poor I, Mangold E, Daumer-Haas C, Phadke S, Peirano RI, Heusel J, Desphande C, Gupta N, Nanda A, Felix E, Berry-Kravis E, Kabra M, Wevers RA, van Maldergem L, Mundlos S, Morava E, Kornak U (2012) Further characterization of ATP6V0A2-related autosomal recessive cutis laxa. *Hum Genet*
- Foulquier F, Amyere M, Jaeken J, Zeevaert R, Schollen E, Race V, Bammens R, Morelle W, Rosnoble C, Legrand D, Demaegd D, Buist N, Cheillan D, Guffon N, Morsomme P, Annaert W, Freeze HH, Van Schaftingen E, Vikkula M, Matthijs G (2012) TMEM165 deficiency causes a congenital disorder of glycosylation. *Am J Hum Genet* 91: 15-26

- Franco SJ, Muller U (2011) Extracellular matrix functions during neuronal migration and lamination in the mammalian central nervous system. *Dev Neurobiol* 71: 889-900
- Gilchrist A, Au CE, Hiding J, Bell AW, Fernandez-Rodriguez J, Lesimple S, Nagaya H, Roy L, Gosline SJ, Hallett M, Paiement J, Kearney RE, Nilsson T, Bergeron JJ (2006) Quantitative proteomics analysis of the secretory pathway. *Cell* 127: 1265-81
- Guillard M, Dimopoulou A, Fischer B, Morava E, Lefeber DJ, Kornak U, Wevers RA (2009) Vacuolar H⁺-ATPase meets glycosylation in patients with cutis laxa. *Biochim Biophys Acta* 1792: 903-14
- Hagedorn CH, Phang JM (1983) Transfer of reducing equivalents into mitochondria by the interconversions of proline and delta 1-pyrroline-5-carboxylate. *Arch Biochem Biophys* 225: 95-101
- Hashimoto Y, Tomiyama T, Yamano Y, Mori H (2003) Mutation (D472Y) in the type 3 repeat domain of cartilage oligomeric matrix protein affects its early vesicle trafficking in endoplasmic reticulum and induces apoptosis. *Am J Pathol* 163: 101-10
- Hennies HC, Kornak U, Zhang H, Egerer J, Zhang X, Seifert W, Kuhnisch J, Budde B, Natebus M, Brancati F, Wilcox WR, Muller D, Kaplan PB, Rajab A, Zampino G, Fodale V, Dallapiccola B, Newman W, Metcalfe K, Clayton-Smith J, Tassabehji M, Steinmann B, Barr FA, Nurnberg P, Wieacker P, Mundlos S (2008) Geroderma osteodysplastica is caused by mutations in SCYL1BP1, a Rab-6 interacting golgin. *Nat Genet* 40: 1410-2
- Hoyer J, Kraus C, Hammersen G, Geppert JP, Rauch A (2009) Lethal cutis laxa with contractural arachnodactyly, overgrowth and soft tissue bleeding due to a novel homozygous fibulin-4 gene mutation. *Clin Genet* 76: 276-81
- Huchtagowder V, Morava E, Kornak U, Lefeber DJ, Fischer B, Dimopoulou A, Aldinger A, Choi J, Davis EC, Abuelo DN, Adamowicz M, Al-Aama J, Basel-Vanagaite L, Fernandez B, Greally MT, Gillessen-Kaesbach G, Kayserili H, Lemyre E, Tekin M, Turkmen S, Tuysuz B, Yuksel-Konuk B, Mundlos S, Van Maldergem L, Wevers RA, Urban Z (2009) Loss-of-function mutations in ATP6V0A2 impair vesicular trafficking, tropoelastin secretion and cell survival. *Hum Mol Genet* 18: 2149-65
- Huchtagowder V, Sausgruber N, Kim KH, Angle B, Marmorstein LY, Urban Z (2006) Fibulin-4: a novel gene for an autosomal recessive cutis laxa syndrome. *Am J Hum Genet* 78: 1075-80
- Hurtado-Lorenzo A, Skinner M, El Annan J, Futai M, Sun-Wada GH, Bourgoin S, Casanova J, Wildeman A, Bechoua S, Ausiello DA, Brown D, Marshansky V (2006) V-ATPase interacts with ARNO and Arf6 in early endosomes and regulates the protein degradative pathway. *Nat Cell Biol* 8: 124-36
- Kornak U, Mundlos S (2003) Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *Am J Hum Genet* 73: 447-74

- Kornak U, Reynders E, Dimopoulou A, van Reeuwijk J, Fischer B, Rajab A, Budde B, Nurnberg P, Foulquier F, Lefeber D, Urban Z, Gruenewald S, Annaert W, Brunner HG, van Bokhoven H, Wevers R, Morava E, Matthijs G, Van Maldergem L, Mundlos S (2008) Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2. *Nat Genet* 40: 32-4
- Kouwenberg D, Gardeitchik T, Wevers RA, Haberle J, Morava E (2011) Recognizable phenotype with common occurrence of microcephaly, psychomotor retardation, but no spontaneous bone fractures in autosomal recessive cutis laxa type IIB due to PYCR1 mutations. *Am J Med Genet A* 155A: 2331-2; author reply 2333-4
- Kozik P, Hodson NA, Sahlender DA, Simecek N, Soromani C, Wu J, Collinson LM, Robinson MS (2013) A human genome-wide screen for regulators of clathrin-coated vesicle formation reveals an unexpected role for the V-ATPase. *Nat Cell Biol* 15: 50-60
- Kretz R, Bozorgmehr B, Kariminejad MH, Rohrbach M, Hausser I, Baumer A, Baumgartner M, Giunta C, Kariminejad A, Haberle J (2011) Defect in proline synthesis: pyrroline-5-carboxylate reductase 1 deficiency leads to a complex clinical phenotype with collagen and elastin abnormalities. *J Inherit Metab Dis* 34: 731-9
- Krishnan N, Dickman MB, Becker DF (2008) Proline modulates the intracellular redox environment and protects mammalian cells against oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 44: 671-81
- Kunze J, Majewski F, Montgomery P, Hockey A, Karkut I, Riebel T (1985) De Barsy syndrome--an autosomal recessive, progeroid syndrome. *Eur J Pediatr* 144: 348-54
- Li X, DiFiglia M (2012) The recycling endosome and its role in neurological disorders. *Prog Neurobiol* 97: 127-41
- Lin X (2004) Functions of heparan sulfate proteoglycans in cell signaling during development. *Development* 131: 6009-21
- Loeys B, Van Maldergem L, Mortier G, Coucke P, Gerniers S, Naeyaert JM, De Paepe A (2002) Homozygosity for a missense mutation in fibulin-5 (FBLN5) results in a severe form of cutis laxa. *Hum Mol Genet* 11: 2113-8
- Martinelli D, Haberle J, Rubio V, Giunta C, Hausser I, Carrozzo R, Gougéard N, Marco-Marin C, Goffredo BM, Meschini MC, Bevivino E, Boenzi S, Colafati GS, Brancati F, Baumgartner MR, Dionisi-Vici C (2012) Understanding pyrroline-5-carboxylate synthetase deficiency: clinical, molecular, functional, and expression studies, structure-based analysis, and novel therapy with arginine. *J Inherit Metab Dis*
- Mohamed M, Kouwenberg D, Gardeitchik T, Kornak U, Wevers RA, Morava E (2011) Metabolic cutis laxa syndromes. *J Inherit Metab Dis* 34: 907-16

- Morava E, Guillard M, Lefeber DJ, Wevers RA (2009) Autosomal recessive cutis laxa syndrome revisited. *Eur J Hum Genet* 17: 1099-110
- Nishimura A, Nasuno R, Takagi H (2012) The proline metabolism intermediate Delta1-pyrroline-5-carboxylate directly inhibits the mitochondrial respiration in budding yeast. *FEBS Lett* 586: 2411-6
- Prydz K, Dalen KT (2000) Synthesis and sorting of proteoglycans. *J Cell Sci* 113 Pt 2: 193-205
- Rajab A, Kornak U, Budde BS, Hoffmann K, Jaeken J, Nurnberg P, Mundlos S (2008) Geroderma osteodysplasticum hereditaria and wrinkly skin syndrome in 22 patients from Oman. *Am J Med Genet A* 146A: 965-76
- Reversade B, Escande-Beillard N, Dimopoulou A, Fischer B, Chng SC, Li Y, Shboul M, Tham PY, Kayserili H, Al-Gazali L, Shahwan M, Brancati F, Lee H, O'Connor BD, Schmidt-von Kegler M, Merriman B, Nelson SF, Masri A, Alkazaleh F, Guerra D, Ferrari P, Nanda A, Rajab A, Markie D, Gray M, Nelson J, Grix A, Sommer A, Savarirayan R, Janecke AR, Steichen E, Sillence D, Hausser I, Budde B, Nurnberg G, Nurnberg P, Seemann P, Kunkel D, Zambruno G, Dallapiccola B, Schuelke M, Robertson S, Hamamy H, Wollnik B, Van Maldergem L, Mundlos S, Kornak U (2009) Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features. *Nat Genet* 41: 1016-21
- Schuelke M (2000) An economic method for the fluorescent labeling of PCR fragments. *Nat Biotechnol* 18: 233-4
- Schwarz JM, Rodelsperger C, Schuelke M, Seelow D (2010) MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods* 7: 575-6
- Seelow D, Schuelke M, Hildebrandt F, Nurnberg P (2009) HomozygosityMapper--an interactive approach to homozygosity mapping. *Nucleic Acids Res* 37: W593-9
- Seidler DG, Faiyaz-UI-Haque M, Hansen U, Yip GW, Zaidi SH, Teebi AS, Kiesel L, Gotte M (2006) Defective glycosylation of decorin and biglycan, altered collagen structure, and abnormal phenotype of the skin fibroblasts of an Ehlers-Danlos syndrome patient carrying the novel Arg270Cys substitution in galactosyltransferase I (beta4GalT-7). *J Mol Med (Berl)* 84: 583-94
- Thiele H, Nurnberg P (2005) HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics* 21: 1730-2
- Urban Z, Huchtagowder V, Schurmann N, Todorovic V, Zilberberg L, Choi J, Sens C, Brown CW, Clark RD, Holland KE, Marble M, Sakai LY, Dabovic B, Rifkin DB, Davis EC (2009) Mutations in LTBP4 cause a syndrome of impaired pulmonary, gastrointestinal, genitourinary, musculoskeletal, and dermal development. *Am J Hum Genet* 85: 593-605
- Van Harreveld A, Strumwasser F (1981) Glutamate agonistic and antagonistic activity of L-proline investigated in the hippocampal slice. *Neuroscience* 6: 2495-503

- Van Maldergem L, Yuksel-Apak M, Kayserili H, Seemanova E, Giurgea S, Basel-Vanagaite L, Leao-Teles E, Vigneron J, Foulon M, Grealley M, Jaeken J, Mundlos S, Dobyns WB (2008) Cobblestone-like brain dysgenesis and altered glycosylation in congenital cutis laxa, Debre type. *Neurology* 71: 1602-8
- Wada Y (2007) Vacuolar-type proton ATPase as regulator of membrane dynamics in multicellular organisms. *J Bioenerg Biomembr*: 53–57
- Yildirim Y, Tolun A, Tuysuz B (2011) The phenotype caused by PYCR1 mutations corresponds to geroderma osteodysplasticum rather than autosomal recessive cutis laxa type 2. *Am J Med Genet A* 155A: 134-40
- Zampatti S, Castori M, Fischer B, Ferrari P, Garavelli L, Dionisi-Vici C, Agolini E, Wischmeijer A, Morava E, Novelli G, Haberle J, Kornak U, Brancati F (2012) De Barsy Syndrome: a genetically heterogeneous autosomal recessive cutis laxa syndrome related to P5CS and PYCR1 dysfunction. *Am J Med Genet A* 158A: 927-31

Ausgewählte Publikationen / Anteilserklärung an den erfolgten Publikationen

Dipl. Ing. (FH) Björn Fischer hatte folgenden Anteil an den folgenden Publikationen:

Publikation 1:

Fischer B, Dimopoulou A, Egerer J, Gardeitchik T, Kidd A, Jost D, Kayserili H, Alanay Y, Tantcheva-Poor I, Mangold E, Daumer-Haas C, Phadke S, Peirano RI, Heusel J, Desphande C, Gupta N, Nanda A, Felix E, Berry-Kravis E, Kabra M, Wevers RA, van Maldergem L, Mundlos S, Morava E, Kornak U.

Further characterization of ATP6V0A2-related autosomal recessive cutis laxa.

Hum Genet. 2012

Anteilserklärung: B. Fischer war am Design der Studie beteiligt. Die genetischen und zellbiologischen Arbeiten wurden von B. Fischer durchgeführt. Ebenso erfolgte die Datenanalyse und Interpretation durch B. Fischer, der ebenfalls maßgeblich an der Entstehung des Manuskriptes beteiligt war.

(Anteil 40 Prozent) JCR Impact Factor: 5.069

Publikation 2:

Zampatti S, Castori M, **Fischer B**, Ferrari P, Garavelli L, Dionisi-Vici C, Agolini E, Wischmeijer A, Morava E, Novelli G, Häberle J, Kornak U, Brancati F.

De Bary Syndrome: a genetically heterogeneous autosomal recessive cutis laxa syndrome related to P5CS and PYCR1 dysfunction.

Am J Med Genet A. 2012

Anteilserklärung: Teile der molekulargenetischen Arbeiten wurden von B. Fischer durchgeführt

(Anteil 5 Prozent) JCR Impact Factor: 2,391

Publikation 3:

Baasanjav S, Al-Gazali L, Hashiguchi T, Mizumoto S, **Fischer B**, Horn D, Seelow D, Ali BR, Aziz SA, Langer R, Saleh AA, Becker C, Nürnberg G, Cantagrel V, Gleeson JG, Gomez D, Michel JB, Stricker S, Lindner TH, Nürnberg P, Sugahara K, Mundlos S, Hoffmann K.

Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects.

Am J Hum Genet. 2011

Anteilserklärung: Anteilig wurden die zellbiologischen Lokalisationsexperimente sowie Expressionsanalysen von B. Fischer durchgeführt und es wurden Vorschläge zur Interpretation gemacht.

(Anteil 5 Prozent) JCR Impact Factor: 10,603

Publikation 4:

Reversade B, Escande-Beillard N, Dimopoulou A, **Fischer B**, Chng SC, Li Y, Shboul M, Tham PY, Kayserili H, Al-Gazali L, Shahwan M, Brancati F, Lee H, O'Connor BD, Schmidt-von Kegler M, Merriman B, Nelson SF, Masri A, Alkazaleh F, Guerra D, Ferrari P, Nanda A, Rajab A, Markie D, Gray M, Nelson J, Grix A, Sommer A, Savarirayan R, Janecke AR, Steichen E, Sillence D, Hausser I, Budde B, Nurnberg G, Nurnberg P, Seemann P, Kunkel D, Zambruno G, Dallapiccola B, Schuelke M, Robertson S, Hamamy H, Wollnik B, Van Maldergem L, Mundlos S and Kornak U.

Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features.

Nat Genet. 2009

Anteilserklärung: Die genetischen und zum Großteil zellbiologischen Daten wurden von B. Fischer erhoben. Anteilig wurden die Zebrafisch Daten von B. Fischer erzeugt. Vorschläge zur Interpretation der Daten wurden ebenfalls durch B. Fischer gemacht. B. Fischer war behilflich bei der Entstehung des Manuskriptes.

(Anteil 15 Prozent) JCR Impact Factor: 35,532

Publikation 5:

Huchtagowder V, Morava E, Kornak U, Lefeber DJ, **Fischer B**, Dimopoulou A, Aldinger A, Choi J, Davis EC, Abuelo DN, Adamowicz M, Al-Aama J, Basel-Vanagaite L, Fernandez B, Grealley MT, Gillessen-Kaesbach G, Kayserili H, Lemyre E, Tekin M, Turkmen S, Tuysuz B, Yuksel-Konuk B, Mundlos S, Van Maldergem L, Wevers RA and Urban Z.

Loss-of-Function Mutations in ATP6V0A2 Impair Vesicular Trafficking, Tropoelastin Secretion, and Cell Survival.

Hum Mol Genet. 2009

Anteilserklärung: Teile der genetischen Arbeiten wurden von B. Fischer erbracht. Ebenfalls wurden die Experimente zur Golgi Fragmentierung von B. Fischer durchgeführt und interpretiert.

(Anteil 10 Prozent) JCR Impact Factor: 7,636

Further characterization of ATP6V0A2-related autosomal recessive cutis laxa.

Fischer B, Dimopoulou A, Egerer J, Gardeitchik T, Kidd A, Jost D, Kayserili H, Alanay Y, Tantcheva-Poor I, Mangold E, Daumer-Haas C, Phadke S, Peirano RI, Heusel J, Desphande C, Gupta N, Nanda A, Felix E, Berry-Kravis E, Kabra M, Wevers RA, van Maldergem L, Mundlos S, Morava E, Kornak U.

Autosomal recessive cutis laxa (ARCL) syndromes are phenotypically overlapping, but genetically heterogeneous disorders. Mutations in the ATP6V0A2 gene were found to underlie both, autosomal recessive cutis laxa type 2 (ARCL2), Debré type, and wrinkly skin syndrome (WSS). The ATP6V0A2 gene encodes the $\alpha 2$ subunit of the V-type H(+)-ATPase, playing a role in proton translocation, and possibly also in membrane fusion. Here, we describe a highly variable phenotype in 13 patients with ARCL2, including the oldest affected individual described so far, who showed strikingly progressive dysmorphic features and heterotopic calcifications. In these individuals we identified 17 ATP6V0A2 mutations, 14 of which are novel. Furthermore, we demonstrate a localization of ATP6V0A2 at the Golgi-apparatus and a loss of the mutated ATP6V0A2 protein in patients' dermal fibroblasts. Investigation of brefeldin A-induced Golgi collapse in dermal fibroblasts as well as in HeLa cells deficient for ATP6V0A2 revealed a delay, which was absent in cells deficient for the ARCL-associated proteins GORAB or PYCR1. Furthermore, fibroblasts from patients with ATP6V0A2 mutations displayed elevated TGF- β signalling and increased TGF- β 1 levels in the supernatant. Our current findings expand the genetic and phenotypic spectrum and suggest that, besides the known glycosylation defect, alterations in trafficking and signalling processes are potential key events in the pathogenesis of ATP6V0A2-related ARCL.

Hum Genet. 2012 Nov;131(11):1761-73.

Dieser Artikel ist unter der folgenden URL lesbar:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22773132>

De Barsy Syndrome: a genetically heterogeneous autosomal recessive cutis laxa syndrome related to P5CS and PYCR1 dysfunction.

Zampatti S, Castori M, **Fischer B**, Ferrari P, Garavelli L, Dionisi-Vici C, Agolini E, Wischmeijer A, Morava E, Novelli G, Häberle J, Kornak U, Brancati F.

Am J Med Genet A. 2012 Apr;158A(4):927-31.

Kein Abstract hinterlegt!

Dieser Artikel ist unter der folgenden URL lesbar:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22411858>

Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects.

Baasanjav S, Al-Gazali L, Hashiguchi T*, Mizumoto S, **Fischer B**, Horn D, Seelow D, Ali B, Aziz S, Langer R, Saleh A, Becker C, Nürnberg G, Cantagrel V, Gleeson J, Gomez D, Michel J, Stricker S, Lindner T, Nürnberg P, Sugahara K, Mundlos S, Hoffmann K.

Proteoglycans are a major component of extracellular matrix and contribute to normal embryonic and postnatal development by ensuring tissue stability and signaling functions. We studied five patients with recessive joint dislocations and congenital heart defects, including bicuspid aortic valve (BAV) and aortic root dilatation. We identified linkage to chromosome 11 and detected a mutation (c.830G>A, p.Arg277Gln) in B3GAT3, the gene coding for glucuronosyltransferase-I (GlcAT-I). The enzyme catalyzes an initial step in the synthesis of glycosaminoglycan side chains of proteoglycans. Patients' cells as well as recombinant mutant protein showed reduced glucuronyltransferase activity. Patient fibroblasts demonstrated decreased levels of dermatan sulfate, chondroitin sulfate, and heparan sulfate proteoglycans, indicating that the defect in linker synthesis affected all three lines of O-glycanated proteoglycans. Further studies demonstrated that GlcAT-I resides in the cis and cis-medial Golgi apparatus and is expressed in the affected tissues, i.e., heart, aorta, and bone. The study shows that reduced GlcAT-I activity impairs skeletal as well as heart development and results in variable combinations of heart malformations, including mitral valve prolapse, ventricular septal defect, and bicuspid aortic valve. The described family constitutes a syndrome characterized by heart defects and joint dislocations resulting from altered initiation of proteoglycan synthesis (Larsen-like syndrome, B3GAT3 type).

Am J Hum Genet. 2011 Jul 15;89(1):15-27.

Dieser Artikel ist unter der folgenden URL lesbar:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21763480>

Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features.

Reversade B, Escande-Beillard N, Dimopoulou A, **Fischer B**, Chng SC, Li Y, Shboul M, Tham PY, Kayserili H, Al-Gazali L, Shahwan M, Brancati F, Lee H, O'Connor BD, Schmidt-von Kegler M, Merriman B, Nelson SF, Masri A, Alkazaleh F, Guerra D, Ferrari P, Nanda A, Rajab A, Markie D, Gray M, Nelson J, Grix A, Sommer A, Savarirayan R, Janecke AR, Steichen E, Sillence D, Hausser I, Budde B, Nurnberg G, Nurnberg P, Seemann P, Kunkel D, Zambruno G, Dallapiccola B, Schuelke M, Robertson S, Hamamy H, Wollnik B, Van Maldergem L, Mundlos S and Kornak U.

Autosomal recessive cutis laxa (ARCL) describes a group of syndromal disorders that are often associated with a progeroid appearance, lax and wrinkled skin, osteopenia and mental retardation. Homozygosity mapping in several kindreds with ARCL identified a candidate region on chromosome 17q25. By high-throughput sequencing of the entire candidate region, we detected disease-causing mutations in the gene PYCR1. We found that the gene product, an enzyme involved in proline metabolism, localizes to mitochondria. Altered mitochondrial morphology, membrane potential and increased apoptosis rate upon oxidative stress were evident in fibroblasts from affected individuals. Knockdown of the orthologous genes in *Xenopus* and zebrafish led to epidermal hypoplasia and blistering that was accompanied by a massive increase of apoptosis. Our findings link mutations in PYCR1 to altered mitochondrial function and progeroid changes in connective tissues.

Nat Genet. 2009 Sep;41(9):1016-21.

Dieser Artikel ist unter der folgenden URL frei lesbar:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19648921>

Loss-of-function mutations in ATP6V0A2 impair vesicular trafficking, tropoelastin secretion and cell survival.

Huchtagowder V, Morava E, Kornak U, Lefeber DJ, **Fischer B**, Dimopoulou A, Aldinger A, Choi J, Davis EC, Abuelo DN, Adamowicz M, Al-Aama J, Basel-Vanagaite L, Fernandez B, Grealley MT, Gillessen-Kaesbach G, Kayserili H, Lemyre E, Tekin M, Türkmen S, Tuysuz B, Yüksel-Konuk B, Mundlos S, Van Maldergem L, Wevers RA, Urban Z.

Autosomal recessive cutis laxa type 2 (ARCL2), a syndrome of growth and developmental delay and redundant, inelastic skin, is caused by mutations in the $\alpha 2$ subunit of the vesicular ATPase H⁺-pump (ATP6V0A2). The goal of this study was to define the disease mechanisms that lead to connective tissue lesions in ARCL2. In a new cohort of 17 patients, DNA sequencing of ATP6V0A2 detected either homozygous or compound heterozygous mutations. Considerable allelic and phenotypic heterogeneity was observed, with a missense mutation of a moderately conserved residue p.P87L leading to unusually mild disease. Abnormal N- and/or mucin type O-glycosylation was observed in all patients tested. Premature stop codon mutations led to decreased ATP6V0A2 mRNA levels by destabilizing the mutant mRNA via the nonsense-mediated decay pathway. Loss of ATP6V0A2 either by siRNA knockdown or in ARCL2 cells resulted in distended Golgi cisternae, accumulation of abnormal lysosomes and multivesicular bodies. Immunostaining of ARCL2 cells showed the accumulation of tropoelastin (TE) in the Golgi and in large, abnormal intracellular and extracellular aggregates. Pulse-chase studies confirmed impaired secretion and increased intracellular retention of TE, and insoluble elastin assays showed significantly reduced extracellular deposition of mature elastin. Fibrillin-1 microfibril assembly and secreted lysyl oxidase activity were normal in ARCL2 cells. TUNEL staining demonstrated increased rates of apoptosis in ARCL2 cell cultures. We conclude that loss-of-function mutations in ATP6V0A2 lead to TE aggregation in the Golgi, impaired clearance of TE aggregates and increased apoptosis of elastogenic cells.

Hum Mol Genet. 2009 Jun 15;18(12):2149-65.

Dieser Artikel ist unter der folgenden URL frei lesbar:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19321599>

Persönliche Informationen (Lebenslauf)

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

Publikationsliste

Original (peer-reviewed) Publikationen

1. Keupp K, Beleggia F, Kayserili H, Barnes AM, Steiner M, Semler O, **Fischer B**, Yigit G, Janda CY, Becker J, Breer S, Altunoglu U, Grünhagen J, Krawitz P, Hecht J, Schinke T, Makareeva E, Lausch E, Cankaya T, Caparrós-Martín J, Lapunzina P, Temtamy S, Aglan M, Zabel B, Eysel P, Koerber F, Leikin S, Garcia C, Netzer C, Schönau E, Ruiz-Perez V, Mundlos S, Amling M, Kornak U, Marini J and Wollnik B . **Mutations in WNT1 Cause Different Forms of Bone Fragility**. Am J Hum Genet. 2013 März (IF=10,603)
2. **Fischer B**, Dimopoulou A, Egerer J, Gardeitchik T, Kidd A, Jost D, Kayserili H, Alanay Y, Tantcheva-Poor I, Mangold E, Daumer-Haas C, Phadke S, Peirano RI, Heusel J, Desphande C, Gupta N, Nanda A, Felix E, Berry-Kravis E, Kabra M, Wevers RA, van Maldergem L, Mundlos S, Morava E, Kornak U. **Further characterization of ATP6V0A2-related autosomal recessive cutis laxa**. Hum Genet. 2012 Jul. (IF= 5.069)
3. Zampatti S, Castori M, **Fischer B**, Ferrari P, Garavelli L, Dionisi-Vici C, Agolini E, Wischmeijer A, Morava E, Novelli G, Häberle J, Kornak U, Brancati F. **De Barsy Syndrome: a genetically heterogeneous autosomal recessive cutis laxa syndrome related to P5CS and PYCR1 dysfunction**. Am J Med Genet A. 2012 Apr. (IF=2,391)
4. Skidmore DL, Chitayat D, Morgan T, Hinek A, **Fischer B**, Dimopoulou A, Somers G, Halliday W, Blaser S, Diambomba Y, Lemire EG, Kornak U, Robertson SP. **Further expansion of the phenotypic spectrum associated with mutations in ALDH18A1, encoding Δ^1 -pyrroline-5-carboxylate synthase (P5CS)**. Am J Med Genet A. 2011 Aug. (IF=2,391)
5. Baasanjav S, Al-Gazali L, Hashiguchi T, Mizumoto S, **Fischer B**, Horn D, Seelow D, Ali BR, Aziz SA, Langer R, Saleh AA, Becker C, Nürnberg G, Cantagrel V, Gleeson JG, Gomez D, Michel JB, Stricker S, Lindner TH, Nürnberg P, Sugahara K, Mundlos S, Hoffmann K. **Faulty initiation of proteoglycan synthesis causes cardiac and joint defects**. Am J Hum Genet. 2011 Jul. (IF=10,603)
6. Kolanczyk M, Pech M, Zemojtel T, Yamamoto H, Mikula I, Calvaruso MA, van den Brand M, Richter R, **Fischer B**, Ritz A, Kossler N, Thurisch B, Spoerle R, Smeitink J, Kornak U, Chan D, Vingron M, Martasek P, Lightowlers RN, Nijtmans L, Schuelke M, Nierhaus KH, Mundlos S. **NOA1 is an essential GTPase required for mitochondrial protein synthesis**. Mol Biol Cell. 2010 Dec. (IF=4,942)
7. Phadke SR, **Fischer B**, Gupta N, Ranganath P, Kabra M, Kornak U. **Novel mutations in Indian patients with autosomal recessive infantile malignant osteopetrosis**. Indian J Med Res. 2010 Apr. (IF=1,837)

8. Clayton P, **Fischer B**, Mann A, Mansour S, Rossier E, Veen M, Lang C, Baasanjav C, Kieslich M, Brossuleit K, Gravemann S, Schnipper N, Karbasyian M, Demuth I, Zwerger M, Vaya A, Utermann G, Mundlos S, Stricker S, Sperling K and Hoffmann K. **Mutations causing greenberg dysplasia but not pelger anomaly uncouple enzymatic from structural functions of a nuclear membrane protein.** Nucleus 2010. (IF=nicht Angegeben)
9. Reversade B, Escande-Beillard N, Dimopoulou A, **Fischer B**, Chng SC, Li Y, Shboul M, Tham PY, Kayserili H, Al-Gazali L, Shahwan M, Brancati F, Lee H, O'Connor BD, Schmidt-von Kegler M, Merriman B, Nelson SF, Masri A, Alkazaleh F, Guerra D, Ferrari P, Nanda A, Rajab A, Markie D, Gray M, Nelson J, Grix A, Sommer A, Savarirayan R, Janecke AR, Steichen E, Sillence D, Hausser I, Budde B, Nurnberg G, Nurnberg P, Seemann P, Kunkel D, Zambruno G, Dallapiccola B, Schuelke M, Robertson S, Hamamy H, Wollnik B, Van Maldergem L, Mundlos S and Kornak U. **Mutations in PYCR1 cause cutis laxa with progeroid features.** Nat Genet 2009 (IF=35,532)
10. Huchtagowder V, Morava E, Kornak U, Lefeber DJ, **Fischer B**, Dimopoulou A, Aldinger A, Choi J, Davis EC, Abuelo DN, Adamowicz M, Al-Aama J, Basel-Vanagaite L, Fernandez B, Grealley MT, Gillessen-Kaesbach G, Kayserili H, Lemyre E, Tekin M, Turkmen S, Tuysuz B, Yuksel-Konuk B, Mundlos S, Van Maldergem L, Wevers RA and Urban Z. **Loss-of-Function Mutations in ATP6V0A2 Impair Vesicular Trafficking, Tropoelastin Secretion, and Cell Survival.** Hum Mol Genet 2009 (IF= 7,636)
11. Kornak, U, Reynders, E, Dimopoulou, A, van Reeuwijk, J, **Fischer, B**, Rajab, A, Budde, B, Nürnberg, P, Foulquier, F, ARCL study group, Lefeber, D, Urban, Z, Gruenewald, S, Annaert, W, van Bokhoven, H, Brunner, H, Wevers, R, Morava, E, Matthijs, G, Van Maldergem, L & Mundlos, S. **Impaired glycosylation and cutis laxa caused by mutations in the vesicular H⁺-ATPase subunit ATP6V0A2.** Nat Genet 2008 (IF= 35,532)
12. Gedicke MM, Traupe H, **Fischer B**, Tinschert S, Hennies HC. **Towards characterization of palmoplantar keratoderma caused by gain-of-function mutation in loricrin: analysis of a family and review of the literature.** Br J Dermatol. 2006 Jan. (IF=3,666)

Reviews

1. Guillard M, Dimopoulou A, **Fischer B**, Morava E, Lefeber DJ, Kornak U and Wevers RA. **Vacuolar H(+)-ATPase meets glycosylation in patients with cutis laxa.** Biochim Biophys Acta 2009. (IF=2)

Poster Beiträge

Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GFH) 2009; Aachen

Poster-Titel: Mutational spectrum in Autosomal rezessiv cutis laxa Debré type and functional analyses of ATP6V0A2

Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GFH) 2010; Hamburg

Poster-Titel: Loss of ATP6V0A2 impairs multiple intracellular functions and results in apoptotic cell death

Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GFH) 2011; Regensburg

Poster-Titel: Role of mitochondrial dynamics and function in autosomal recessive cutis laxa due to *PYCR1* mutations

Moosbach Kolloquium 2011; Moosbach

Poster-Titel: Loss of ATP6V0A2 impairs multiple intracellular functions and results in apoptotic cell death

FEBS/EMBO Course: Mitochondria in Life, Death and Disease, Crete, Greece (2012)

Poster-Titel: Further molecular characterization of *PYCR1*-related cutis laxa

European Society of Human Genetics (ESHG), 2012: Nürnberg

Poster-Titel: Further molecular characterization of *PYCR1*-related cutis laxa

Deutsche Gesellschaft für Humangenetik (GFH) 2013; Dresden

Poster-Titel: Exome sequencing reveals a diagnosis dismissed on clinical grounds: SLC2A10 mutations in individuals with cutis laxa, but without arterial tortuosity

Vorträge

Metabolic-Seminar (NMC-Nijmegen), Nijmegen, The Netherlands (2011)

Gastgeber: Dr. Eva Morava/Dr. Leo Nijtmans

Vortrags-Titel: Autosomal recessive cutis laxa due to *PYCR1* mutations

FEBS/EMBO Course: Mitochondria in Life, Death and Disease, Crete, Greece (2012)

Vortrags-Titel: Further molecular characterization of *PYCR1*-related cutis laxa

Eidesstattliche Versicherung

„Ich, Björn Fischer, versichere an Eides statt durch meine eigenhändige Unterschrift, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Thema: **„Syndrome mit Haut- und Knochenanomalien Identifikation zugrundeliegender Gendefekte und funktionelle Analyse der betroffenen Genprodukte“** selbstständig und ohne nicht offengelegte Hilfe Dritter verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel genutzt habe. Alle Stellen, die wörtlich oder dem Sinne nach auf Publikationen oder Vorträgen anderer Autoren beruhen, sind als solche in korrekter Zitierung kenntlich gemacht. Die Abschnitte zu Methodik (insbesondere praktische Arbeiten, Laborbestimmungen, statistische Aufarbeitung) und Resultaten (insbesondere Abbildungen, Graphiken und Tabellen) entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet. Meine Anteile an den ausgewählten Publikationen entsprechen denen, die in der untenstehenden gemeinsamen Erklärung mit dem Betreuer, angegeben sind. Sämtliche Publikationen, die aus dieser Dissertation hervorgegangen sind und bei denen ich Autor bin, entsprechen den URM (s. o) und werden von mir verantwortet. Die Bedeutung dieser eidesstattlichen Versicherung und die strafrechtlichen Folgen einer unwahren eidesstattlichen Versicherung (§156,161 des Strafgesetzbuches) sind mir bekannt und bewusst.“

Datum:

Dipl. Ing. (FH) Björn Fischer
(Promovend)

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen danken, die zum Gelingen dieser Arbeit und den zugrunde liegenden Publikationen beigetragen haben.

Als Erstes möchte ich mich bei Herrn Prof. Stefan Mundlos für die Möglichkeit bedanken, dass ich meine Promotion unter seiner Betreuung am Institut für Medizinische Genetik und Humangenetik der Charité Universitätsmedizin Berlin durchführen durfte.

Bei Herrn Prof. Uwe Kornak möchte ich mich dafür bedanken, dass er mir dieses Thema zur Bearbeitung überlassen und dieses in wissenschaftlicher Hinsicht exzellent betreut hat. Auch möchte ich mich bei ihm für seine stets offene Tür und das erfreulich gute Arbeitsklima in seiner Arbeitsgruppe bedanken, was die lange Zeit als Doktorand für mich unvergessen machen wird.

Bei Frau Dr. Aikaterini Dimopoulou möchte ich mich ebenfalls im besonderen Maße bedanken. Die Zusammenarbeit mit ihr in den letzten Jahren war für mich eine Freude und ich konnte durch sie mein doch sehr beschränktes Wissen in klinischen Dingen vergrößern. Sie hat mich immer unterstützt und es ist ihr gelungen, mich immer wieder auch für scheinbar nebensächliche Dinge zu begeistern und meinen Forscherdrang stets wach zu halten.

Frau Claire Schlack möchte ich an dieser Stelle ebenfalls besonders danken. Ihre Hilfsbereitschaft und ihr exzellentes Fachwissen waren während meiner Doktorarbeit und auch davor eine wahre Bereicherung!

Ich möchte mich auch bei allen Kollegen der Arbeitsgruppe Kornak, insbesondere Denise Emmerich, Dr. Johannes Egerer, Phillipe Schröter, Magdalena Steiner, Dr. Hardy Chan, Dr. Claus-Eric Ott, Sabine Stumpp und Johannes Grünhagen für die Schaffung einer unvergleichlichen Arbeitsatmosphäre, den wissenschaftlichen und sozialen Austausch sowie die großartige Unterstützung bedanken.

Last but not least möchte ich mich bei André Zirnsak bedanken. In den letzten acht Jahren hat er die Höhen und Tiefen meines Lebens mit mir durchgestanden. Er hat mich immer unterstützt und mir dadurch immer die Möglichkeit gegeben, mich wissenschaftlich zu verwirklichen.