

**Aus dem Institut für Klinische Neurobiologie**

**der Universität Würzburg**

**Vorstand: Univ.-Professor Dr. Michael Sendtner**

***SLC7A10* als neues Gen für humane Hyperekplexie**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

**vorgelegt von**

**Paul Drehmann**

**aus Leipzig**

**Würzburg, August 2017**



**Referentin:** Prof. Dr. Carmen Villmann

**Korreferent:** Prof. Dr. Erhard Wischmeyer

**Dekan:** Prof. Dr. Matthias Frosch

**Tag der mündlichen Prüfung: 26.03.2018**

**Der Promovend ist Zahnarzt**

## **Meiner Familie**

# Inhalt

<b>1</b>	<b>Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
1.1	Summary.....	1
<b>2</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>2</b>
2.1	Hyperekplexie.....	2
2.2	Historie der Hyperekplexie.....	2
2.2.1	Der Glycin-Rezeptor als potentieller Faktor .....	4
2.2.1.1	Aufbau von GlyR.....	5
2.2.1.2	Glycin-Rezeptor Struktur.....	5
2.2.1.3	Studienlage und bekannte Mutationen.....	5
2.2.2	Der Einfluss von Gephyrin.....	7
2.2.3	Collybistin als Kandidatengen für Hyperekplexie .....	7
2.2.4	Die Rolle von Glycin Transporter 2 (GlyT2) bei STHE.....	8
2.2.4.1	Aufbau und Funktion .....	8
2.2.4.2	Studienergebnisse .....	9
2.2.4.3	Resumé.....	11
2.3	Der ASC-1 Transporter .....	12
2.3.1	Die <i>SLC7</i> Familie .....	12
2.3.2	Oberflächenexprimierung.....	12
2.3.3	Funktion auf neuronaler Ebene .....	15
2.3.4	ASC-1 als neuer Faktor bei Hyperekplexie.....	17
<b>3</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>19</b>
<b>4</b>	<b>Methoden und Material.....</b>	<b>19</b>
4.1	Materialliste.....	19
4.1.1	Geräte .....	19
4.1.2	Polymerase .....	21
4.1.3	Enzyme.....	21
4.1.4	Puffer .....	21
4.1.5	Kits .....	22
4.1.6	Zellen.....	22
4.2	Isolation genomischer DNA aus antikoaguliertem, humanem Vollblut.....	23
4.3	Konzentrationsmessungen .....	23
4.4	Herstellung von Aliquotes .....	24

4.5	Polymerase-Kettenreaktion .....	24
4.5.1	PCR Pipettierschema.....	24
4.6	Überprüfung des eluierten PCR Produkts mittels Gelelektrophorese .....	26
4.7	Agarosegel Präparation bei Doppelbanden .....	26
4.8	DNA Extraktion aus Agarosegelen .....	27
4.9	Aufreinigung des PCR Produkts .....	28
4.10	Sequenzierung .....	28
4.11	Auswertung der Sequenzierungen.....	29
4.12	Plasmid Amplifikation.....	30
4.13	Synthese der Ausgangsfragmente mittels PCR-Mutagenese.....	30
4.14	Overlap Extension PCR.....	31
4.15	Restriktionsverdau .....	32
4.16	Gel-Extraktion Insert und Vektor .....	33
4.17	Ligation.....	33
4.18	Transformation .....	34
4.19	Plasmid Präparation.....	35
4.20	Transfektion.....	35
4.21	Biotinylierung.....	36
4.22	Analyse des gesamten Zell Lysates .....	36
4.23	Immunzytochemische Färbung .....	37
4.24	Glycintransport Assay .....	37
<b>5</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>46</b>
6.1	Zusammenfassung der Hauptergebnisse .....	46
6.2	Diskussion der Methoden .....	47
6.2.1	Einsatz von Silikat-Membranen.....	47
6.2.2	Diskussion von Modifikationsmöglichkeiten der Polymerase-Kettenreaktion.....	48
6.2.2.1	Denaturierung .....	48
6.2.2.2	Annealing.....	49
6.2.2.3	Elongation.....	50
6.2.2.4	Alternativen und Ausblick .....	51
6.2.3	Feinjustierung der Gelelektrophorese .....	52
6.2.3.1	Agarosen .....	52
6.2.3.2	Puffer .....	52

6.2.3.3	Effektive Nutzspannung .....	53
6.2.4	Kompensation von UV-Licht produzierten Schäden .....	53
6.2.5	DNA Extraktion .....	54
6.2.6	Reinigung der Produkte.....	55
6.2.7	Klonierung - Rolle des Vektors.....	55
6.2.8	Klonierung - Restriktionstechnik .....	56
6.2.9	Klonierung - Ligation.....	56
6.3	Diskussion der Ergebnisse.....	57
6.4	Ausblick.....	61
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis .....</b>	<b>62</b>
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>70</b>
<b>9</b>	<b>Danksagung</b>	
<b>10</b>	<b>Lebenslauf</b>	

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1:	Homologie Modell humaner Glycin-Rezeptor-Untereinheiten .....	6
Abbildung 2:	Darstellung relativer Positionen von GlyT2 Mutationen in <i>SLC6A5</i> ...	9
Abbildung 3:	Aminosäuresequenz von humanem GlyT2 (Gen <i>SLC6A5</i> ) .....	10
Abbildung 4:	Schaubild des molekularen Aufbaus von ASC-1 .....	13
Abbildung 5:	Darstellung der strukturellen Beziehung innerhalb der SLC7 Familie .....	14
Abbildung 6:	Darstellung von Transportvorgängen am Präsynaptischen Bouton, Astrozyt und postsynaptischen Neuron in Bezug auf ASC-1 .....	16
Abbildung 7:	Darstellung der Glycin- und L-Serin Aufnahme am präsynaptischen Bouton via ASC-1 und GlyT2 .....	18
Abbildung 8:	Vereinfachte Darstellung der Rolle von ASC-1 .....	18
Abbildung 9:	PCR Pipettierschema für Mastermixansätze .....	25
Abbildung 10:	PCR Pipettierschema für Mastermixansätze .....	26
Abbildung 11:	Flipchart - methodischer Ablauf der Versuchsreihe Teil 1 .....	29
Abbildung 12:	PCR Standardprogramm für Klonierung .....	30
Abbildung 13:	Darstellung der Synthese der Ausgangskonstrukte .....	31
Abbildung 14:	Fließschema zum Ablauf der Overlap Extension PCR .....	32
Abbildung 15:	Darstellung des Ligationsverfahrens .....	34
Abbildung 16:	Zusammenfassung der gescreenten Mutationen in ASC-1 .....	39
Abbildung 17:	Darstellung der Lokalisation der einzelnen Mutationen .....	40
Abbildung 18:	Darstellung der mutierten Sequenz mit G307R .....	41
Abbildung 19:	Proteinsequenz von ASC-1 .....	41
Abbildung 20:	Gesamtzellexpression von ASC-1 .....	42
Abbildung 21:	Übersichtsbilder von ASC-1 / Immuncytochemische Färbung. ....	43
Abbildung 22:	Vergleich von Oberflächenexprimierung und Gesamt-Zelllysat der ASC-1 Transporterproteine .....	44
Abbildung 23:	Funktionelle Analyse der Glycintransportraten von ASC-1 .....	45
Abbildung 24:	Vergleich des Einflusses von inhibitorischem Isoleucin auf ASC-1 ..	46
Abbildung 25:	Darstellung des durch ASC-1 modulierten Glycinhaushaltes .....	60
Abbildung 26:	Darstellungen der Exone für ASC-1 .....	72

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1:	Primer sense für die PCR .....	70
Tabelle 2:	Primer antisense für die PCR .....	71
Tabelle 3:	Primer sense und antisense für <i>SLC7A10</i> -Klon (G307R) .....	71

## Abkürzungsverzeichnis

Asc-1	Alanin-Serin-Cystein-1
ASC-1	Alanin-Serin-Cystein-1 (human)
STHE	startle disease
DNA	Desoxyribonukleinsäure
gDNA	genomische Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
dNTP	desoxy-Nukleosidtriphosphate
PCR	Polymerasekettenreaktion
HEK293-Zellen	Humane-Embryo-Nieren-293-Zellen
EEG	Elektroenzephalografie
EMG	Elektromyografie
5HT	5-Hydroxytryptamin
RH	Radiation-hybrid
PP	Polypeptid
CSF1	Colony-stimulationg-factor-1
GABA	$\gamma$ -Aminobuttersäure
GABRA1	GABA-Rezeptor Alpha 1 (Genabschnitt)
GABRG2	GABA S Empfänger Untereinheit (Genabschnitt)
GlyR	Glycin-Rezeptor
GLRA1	Glycin Rezeptor Alpha 1 (Genabschnitt)
GLRB	Glycin Rezeptor Beta (Genabschnitt)
ARHGEF9	Genabschnitt für Collybistin
GPHN	Genabschnitt für Gephyrin
GlyT2	Glycin-Transporter-2
SLC6A5	Genabschnitt für Glycin-Transporter-2
SH3	Src-homology 3 (Proteindomäne)
VGAT	vesikulärer-GABA-Transporter



VIAAT	vesikulärer-inhibitorischer-Aminisäuren-Transporter
ZNS	Zentralnervensystem
TM	Transmembran
LeuT	Leucin-Transporter
GAT1	GABA transporter 1
SERT	Serotonintransporter
CAT	kationischer Aminosäuretransporter
4F2hc	schwere Kette vom Typ 4F2
NMDA-R	N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptor
SHMT	Serin-Hydroxymethyltransferase
SR	Serin-Racemase
KO	knock-out
MEM	Membranmarker
LAMP	schleifen-modulierte isothermale Amplifikation
NASBA	nukleinsäuresequenz-basierte Amplifikation
LMP	niedrig-schmelzende (low melting point)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
TTE	Tris-Taurin-EDTA
TBE	Tris-Borat-EDTA
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
BSA	Bovine Serum Albumin
UV	ultraviolett
LED	light-emitting diode
PAC	P1 artificial Chromosom
BAC	bacterial artificial Chromosom
YAC	yeast artificial Chromosom
SNP	Einzelnukleotid Polymorphismus
Exo I	Exonuklease I
rSAP	Shrimp-Alkaline-Phosphatase

SNP	(single) Einzelnukleotid-Polymorphismus
SOC	Super Optimal Broth with Catabolic Repressor (Wachstumsmedium mit katabolischem Repressor)
LTD	Langzeitdepression
LTP	Langzeitpotenzierung
AMPA	Aminomethylphosphonsäure
GCS	Glycin-Cleavage-System
IPSP	inhibitorisches postsynaptisches Potential
i.p.	intraperitoneal
rev.	reverse (rückwärts)
for.	forward (vorwärts)
min	Minuten
sec	Sekunden
rpm	Umdrehungen pro Minute
pmol	picomol
°C	Grad Celsius
g	Gramm
ng	nano Gramm
kb	Kilobase
mL	Milliliter
μL	Mikroliter
x g	mal Schwerkraft
%	Prozent

# 1 Zusammenfassung

Neueste Studien haben ergeben, dass Asc-1 Knock-out Mäuse aufgrund einer verminderten intrazellulären Glycinkonzentration in synaptischen Boutons im Gehirn, einen Hyperekplexie-ähnlichen Phänotyp entwickeln. Aufgrund nicht vollständig geklärter Ursachen für die Entstehung des Krankheitsbildes der Hyperekplexie beim Menschen, wurde eine Kohorte von 51 Patienten zusammengetragen, um vor dem Hintergrund der Forschungsergebnisse zu Asc-1 im Tiermodell, das kodierende Gen beim Menschen *SLC7A10* als mögliches Kandidatengen auf Sequenzalterationen zu untersuchen. Hierfür wurde aus Vollblut der an Hyperekplexie erkrankten Patienten genomische DNA isoliert, um mittels PCR und anschließendem Screening der Sequenzen, Mutationen innerhalb funktionell wichtiger Bereiche des Gens zu eruieren. Neben weiteren Sequenzunterschieden, die meist in Introns gefunden wurden, wurde die codierende Mutation G307R innerhalb von Exon 7 identifiziert, die letztendlich der Grund für eine Versuchsreihe war, um zu hinterfragen, ob dieser Aminosäureaustausch in der Proteinsequenz funktionelle Konsequenzen zur Folge hat. HEK293-Zellen wurden mit dem zuvor hergestellten Klon G307R transfiziert, um über Biotinylierung, immunocytochemische Färbungen und funktionelle Untersuchungen die Aktivität des Transporters zu beurteilen. Hier zeigte sich ein Funktionsverlust von über 95 %, bei uneingeschränkter Oberflächenexpression. ASC-1 bestätigt sich damit als neue Ursache in der Ausprägung von Hyperekplexie. Ferner können Zusammenhänge mit geistiger Retardierung und eingeschränkter neuronaler Plastizität bestehen.

## 1.1 Summary

Recent studies have shown that Asc-1 knock-out mice leads to reduced intracellular glycine concentration in synaptic boutons in the brain followed by a development of a hyperekplexia-like phenotype. In humans, the underlying cause for hyperekplexia is not complexly understood. Based on findings in the Asc-1 knockout mouse model, a patient cohort of 51 patients was used to identify possible sequence alterations in the corresponding Gen *SLC7A10* as a novel candidate gene for human hyperekplexia.

For this purpose, genomic DNA was extracted from blood samples of patients suffering from hyperekplexia to identify mutations within functionally important areas of the gene by means of PCR and subsequent analyses of the determined sequences. Besides

other sequence alterations mainly in introns, the coding mutation G307R within exon 7 was identified and used to investigate functional consequences of this amino acid exchange in an experimental series. The clone ACS-1 G307R was transfected into HEK293 cells to assess the activity of the transporter via biotinylation, immunocytochemical stainings, and functional uptake assays. Our results showed an almost loss of function with more than 95 % reduction in the transport activity although surface expression was unaffected. In conclusion, the ASC-1 mutation was confirmed as a novel cause for human hyperekplexia. In addition, mental retardation and restricted neuronal plasticity might play a role during disease manifestation.

## **2 Einleitung**

### **2.1 Hyperekplexie**

Humane Hyperekplexie (Startle-Disease, stiff-baby-syndrome) wird als neuromotorische Störung beschrieben, die durch eine fehlregulierte, Glycin-modulierte, inhibitorische Neurotransmission auf neuronaler Ebene verursacht wird. Mutationen in Genen, die für Untereinheiten von Glycin-Rezeptoren, Glycin-Transportern beziehungsweise assoziierten Proteinen der inhibitorischen Synapse codieren, wurden bereits bei an Hyperekplexie erkrankten Patienten identifiziert. Phänotypische Merkmale äußern sich in klassischen Symptomen wie: exzessive Schreckreaktionen auf unerwartete akustische und taktile Stimuli, episodische Muskelsteifheit, einhergehend mit Apnoe sowie dem Verlust der posturalen Kontrolle.

### **2.2 Historie der Hyperekplexie**

Den Grundstein für die spätere Definition der heute als Hyperekplexie (OMIM 149400, STHE – startle disease) bekannten Krankheit wurden bei Versuchen von Owen und Sherrington (1911) gelegt. Hierbei wurde gezeigt, dass Strychnin, ein Pflanzenalkaloid aus der Brechnuss *Nux vomica*, in der Lage ist, inhibitorische Reflexe in exzitatorische Reflexe umzuwandeln [1]. Erste Beschreibungen der Krankheit basierten auf gemeinsamen klinischen Merkmalen wie Steifigkeit, Erschrecken und Hinfallen, der Erbllichkeit der Erkrankung, als auch der phänotypischen Variabilität, die als große und kleine Varianten beschrieben wurden [2]. 1966 wurden anhand von 25 Individuen aus 5

Generationen Hyperekplexie als dominante Erbkrankheit charakterisiert. Diese Patienten zeigten vorübergehende angeborene Hypertonien im Wachzustand, teilweise Leistenhernien, Hypokinesie, Steifigkeitsreaktionen assoziiert mit Stürzen, deutlich hyperaktive Hirnstammreflexe sowie Zuckungen beim Einschlafen. Mittels Hochgeschwindigkeitsaufnahmen, EEG- und EMG-Untersuchungen konnte die Dominanz eines nicht-inhibierten primitiven nozizeptiven Reflexmusters als Ursache identifiziert werden. Diese basiert auf einer mangelhaften Kontrolle durch nicht-physiologische Hirnreifung im höheren Nervensystem. Des Weiteren konnte die Erkrankung klar von dem Krankheitsbild der Epilepsie getrennt werden. Die Patienten blieben während der Anfälle bei vollem Bewusstsein und auch die gemessenen EEG-Wellen korrespondieren nicht mit denen während epileptischer Anfälle [3]. Patienten, die einen entsprechenden Phänotyp zeigten, wurden mit Clonazepam, einem Benzodiazepin, welches auch als potenter 5-HT Agonist wirkt, behandelt. Zugleich wurde berichtet, dass es möglich ist, die Intensität der Symptome mit Chlordiazepoxid, Phenobarbital und Alkohol effektiv zu lindern [4]. 1981 wurde durch Lingam *et al.* (1981), bei dem Bericht über eine erkrankte Familie, der Begriff „stiff-baby syndrome“ geprägt [5]. Morley *et al.* (1982) beschrieben ein Jahr später einen Fall, bei dem mehrere Personen einer Familie Flexor-Hypertonien und Hypokinesien während der Kindheit zeigten. Später und während des gesamten Lebens zeigten sie übertriebene Schreckreaktionen mit unwillkürlichen Muskelkrämpfen, welche gelegentlich zu Stürzen führten. Mittels EEG und evozierten Hirnstamm-Potentialen wurden Art und Lokalisation der neuromotorischen Dysfunktion untersucht und letztendlich eine fehlregulierte Hemmung der Hirnstamm-vermittelten Schreckreaktion als Ursache in Betracht gezogen [6]. Weitere Fall-Studien von an Hyperekplexie erkrankten Familien wurden von Kurczynski (1983), sowie Saenz-Lope *et al.* (1984) veröffentlicht [7, 8]. Letztere definierten ebenfalls eine klare Abgrenzung zur Epilepsie, als auch zur Kataplexie. Zusätzlich beschrieben sie eine Unwirksamkeit von Clonazepam in drei Fällen. Valproinsäure, 5-Hydroxytryptophan und Piracetam konnten hingegen bei ebenfalls drei Patienten die Schreckreaktionen deutlich mindern [8]. Bei 6 untersuchten Patienten von 15 Betroffenen aus Familien mit Hyperekplexie Erkrankung konnten durch umfangreiche elektrophysiologische Evaluationen, Abnormalitäten in Form einer prominenten C-Welle, 60-75ms nach Stimulation des Median- und Peroneal-Nervs festgestellt werden. Die somatosensorische Antwort zeigte hier ebenfalls Auffälligkeiten anhand erhöhter Amplituden. Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass

hyperaktive Reflexkreise durch höhere Zentren eine Basis für STHE bilden könnten [9]. 1991 wurde ein weiterer Bericht über die Untersuchung zweier Familien ohne verwandtschaftliche Beziehungen, bei denen jeweils mehrere Personen an Hyperekplexie erkrankten, von Hayashi *et al.* (1991) veröffentlicht. Die Betroffenen zeigten typische, bereits beschriebene Symptome. Auch hier konnten erfolgreich alle betroffenen Säuglinge und Kinder mit Clonazepam behandelt werden. Außerdem stellte sich durch eine vollständig genetische Analyse heraus, dass es sich bei den beiden Familien um eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung handelte [10]. Bereits ein Jahr später, konnten Ryan *et al.* (1992) mit Hilfe von Kopplungs-Analysen und Radiation-hybrid-mapping (RH-mapping), die genetische Position von Hyperekplexie auf dem langen Arm von Chromosom 5q, zwischen *CSF1-R* (colony-stimulating factor 1 receptor) und *D5S379*, bestimmt werden. Aufgrund der Tatsache, dass STHE stark auf das Benzodiazepin Clonazepam anspricht, welches mit Gamma-Aminobuttersäure Rezeptoren (GABA-A) interagiert, wurden *GABRA1* und *GABRG2* als mögliche Kandidatengene definiert. *GABRA1* und *GABRG2* kodieren für GABA-A Rezeptor Untereinheiten, konnten jedoch letztendlich durch RH-mapping ausgeschlossen werden. Drei weitere Loci: *RPS14*, *SPARC* und *GLRI* wurden als mögliche implizierende Faktoren genannt [11].

### **2.2.1 Der Glycin-Rezeptor als potentieller Faktor**

Letztendlich wurde *GLRA1* als ausschlaggebendes Gen für die Ausprägung hyperekplexischer Phänotypen, durch sequenzielle Alterationen von Shiang *et al.* (1993) identifiziert. Ein Grund hierfür war, dass *GLRA1* auf dem langen Arm von Chromosom 5q in der Nähe von *SPARC* und *RPS14* lokalisiert wurde. Laut Mapping Analyse befinden sich diese innerhalb der Hyperekplexie Region. Des Weiteren befindet sich *GLRA1* in der Mitte des für Hyperekplexie spezifischen Genabschnittes und codiert für eine Untereinheit des inhibitorischen Glycin-Rezeptors [12]. Dieser ist mit Strychnin antagonistisch [13]. Strychnin bewirkt hier in subletalen Dosen in Maus Modellen analoge Symptome zur humanen STHE [14]. Inhibitorische Glycin Rezeptoren waren die ersten Neurotransmitter-Rezeptorproteine, die aus einem Säugetier-Zentral-Nervensystem isoliert werden konnten [15].

### **2.2.1.1 Aufbau von GlyR**

Die Aufreinigung beziehungsweise Extraktion von Glycin-Rezeptoren aus dem Rückenmark von Ratten, mittels Strychnin-Affinitätschromatographie, zeigte drei deutliche Polypeptide (PP) mit molekularen Massen von 48, 58 und 93 kDa [15]. Das 48 kDa schwere PP, sowie das 58 kDa schwere PP, wurden respektive als alpha1- und beta-Untereinheit des Glycin-Rezeptors erkannt [16, 17]. Das 93 kDa schwere Polypeptid hingegen, wurde erst später als zytoplasmatisches Protein Gephyrin, welches durch Interaktionen mit der beta-Untereinheit essentiell für die transmembrane Verankerung des Rezeptors ist, identifiziert [18].

### **2.2.1.2 Glycin-Rezeptor Struktur**

Humane Glycin-Rezeptoren sind heteropentamere Liganden-gesteuerte Ionenkanäle [19], die aus drei ligandenbindenden alpha 1 (GlyR $\alpha$ ) Untereinheiten, sowie zwei beta Untereinheiten (GlyR $\beta$ ) bestehen [20, 21]. Sie gehören zur Superfamilie der Cys-Loop Rezeptoren, in welcher GABA-Rezeptoren (Typ A und C), nikotinerge Acetylcholinrezeptoren und 5-Hydroxytryptamin Rezeptoren (Typ-3) ebenfalls inkludiert sind [22-25]. Alle Mitglieder dieser Rezeptorfamilie besitzen eine gemeinsame topologische Architektur in Bezug auf die Anordnung der Untereinheiten innerhalb der pentameren Strukturen. Der extrazellulären Domäne, welche die Ligandenbindung ermöglicht, folgen vier alpha-helikale Transmembrandomänen, die mit intra- und extrazellulären Schleifen untereinander verbunden sind [26-28].

### **2.2.1.3 Studienlage und bekannte Mutationen**

In 4 Familien wurden zwei verschiedene Mutationen in Exon 6 von *GLRA1* bei betroffenen Individuen gefunden. Es handelt sich hier jeweils um eine Substitution an gleicher Stelle, jedoch unterschiedliche Allele betreffend. Zum einen wird durch den G/T Basenaustausch an Position 1192 der Nukleotidsequenz, an Stelle von Arginin die Aminosäure Leucin (R271L) codiert. Zum anderen wird durch G zu A Substitution Glutamin statt Arginin als Aminosäure (R271Q) des Proteins translatiert. Als Kontrollgruppe dienten 50 Probanden ohne phänotypische STHE Merkmale. [12] Mittlerweile sind eine Vielzahl von Mutationen innerhalb der Glycin-Rezeptor Untereinheiten (*GLRA1* und *GLRB*), aus einer Fülle an wissenschaftlich fundierten

Sreening-Projekten, bekannt, welche mit einem Hyperekplexie Phänotyp assoziiert sind. Eine Übersicht zur Lokalisation gelisteter Mutationen innerhalb der Struktur von GlyR bietet die folgende Grafik (vgl. Abb.1)

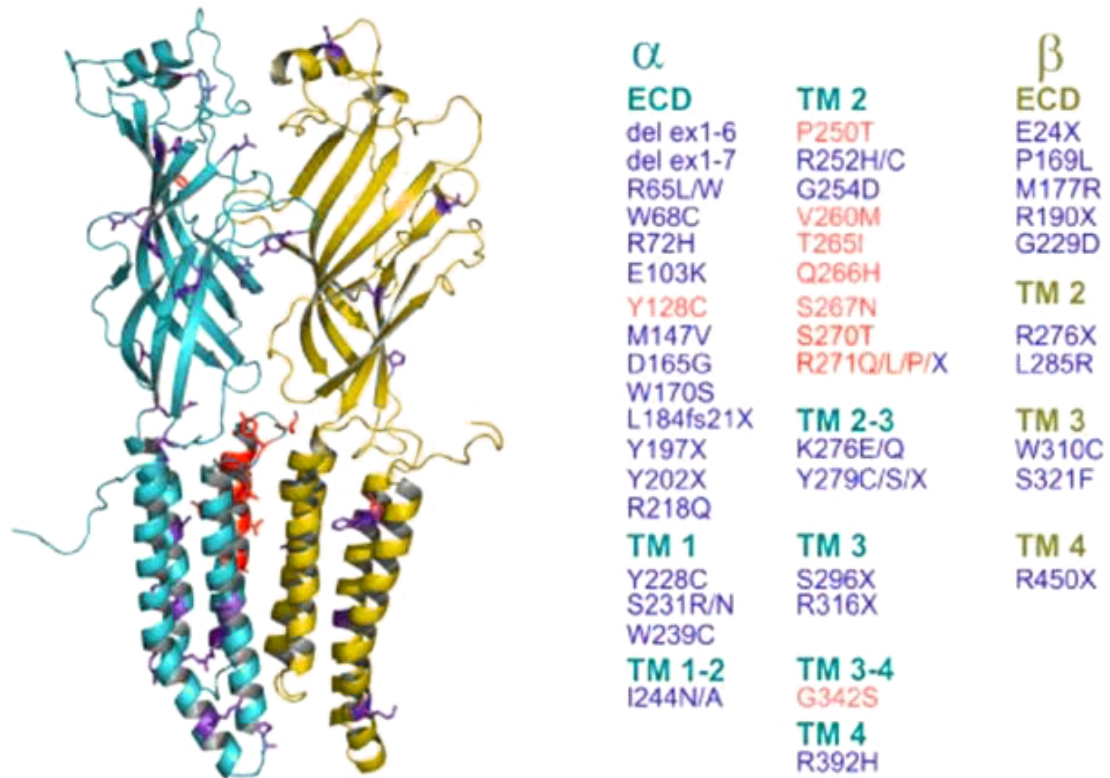


Abbildung 1: Homologie Modell humaner (türkis -  $\alpha$ -Untereinheit, gelb -  $\beta$ -Untereinheit) Glycin-Rezeptor-Untereinheiten auf der Basis der Kristallstruktur des *Caenorhabditis elegans* Glutamat-gesteuerten Chlorid-Kanals (*GluCl*), veröffentlicht von Hibbs und Gouaux (2011) [29]. Markiert sind die betroffenen Aminosäuren Positionen bei bekannten Hyperekplexie Fällen. Zu sehen sind 2 Untereinheiten eines pentameren Rezeptors. Aminosäureaustausche aufgrund rezessiver Mutationen, Verbindungen heterozygoter Mutationen oder Deletionen mit Rasterverschiebungen, sowie diejenigen ohne bekannte Art der Vererbung sind lilafarbig dargestellt, während Aminosäureaustausche basierend auf dominanten Mutationen in orange gekennzeichnet sind [30].



### 2.2.2 Der Einfluss von Gephyrin

Eine weitere Schlüsselrolle spielen die hochaffinen Interaktionen zwischen Glycin-Rezeptor beta Untereinheiten und dem synaptischen Molekül Gephyrin (GPHN), welches postsynaptisch eine hexagonale Struktur ausbildet [18]. Studien haben ergeben, dass die membran-assoziierten Gephyrin Moleküle eine Voraussetzung für die postsynaptische Anreicherung von Glycin-Rezeptoren darstellen [31]. Daher erschien es naheliegend, dass Hyperekplexie, die sich weder auf Mutationen in *GLRA1*, als auch in *GLRB* begründet, auch durch Mutationen in anderen Proteinen der inhibitorischen Synapse ausgelöst werden kann. Auf der Grundlage der Gephyrin Erkenntnisse untersuchten Rees *et al.* (2003) die Exone des *GPHN* Gens von Patientenproben mit Verdacht auf Hyperekplexie auf mögliche Mutationen. Eine missense Mutation, die einen Aminosäureaustausch (N10Y) im translatierten Protein zur Folge hat wurde identifiziert. Dieser Aminoaustausch hatte jedoch laut funktioneller Analyse keinen Einfluss auf die GlyR-Gephyrin Interaktionen, als auch auf die Collybistin induzierten Clustereigenschaften auf Zelloberflächen. Diese Daten deuteten darauf hin, dass andere Wechselwirkungen, entweder mit dem Zytoskelett oder mit Gephyrin-assoziierten Hilfsmolekülen Gründe für die Ausbildung von STHE Symptomen sein müssen [32].

### 2.2.3 Collybistin als Kandidatengen für Hyperekplexie

Ein weiteres Kandidatengen in der Ausprägung dieses Krankheitsbildes könnte laut Studien von Harvey *et al.* (2004) Collybistin (*ARHGEF9*) sein [33]. Collybistin ist ein gehirn-spezifischer GDP-GTP Austauschfaktor, welcher für die Interaktion und Verankerung von Gephyrin, letztendlich also für die synaptische Lokalisation inhibitorischer Rezeptoren, maßgeblich ist. Sie charakterisierten neue Formen von N- und C-Termini eines alternativ gespleißten Collybistins. Die Anwesenheit einer alternativ gespleißten SH3 Domäne (N-Terminus) wirkte sich laut ihren Untersuchungen negativ auf die submembranöse Mikroaggregation von Gephyrin aus. Die Tatsache, dass die meisten Isoformen von Collybistin eine solche SH3 Domäne besitzen, ließ vermuten, dass die Aktivität und Funktionalität durch Protein-Protein Wechselwirkungen an dieser SH3 Domäne reguliert werden. Die Wichtigkeit von Collybistin in Bezug auf die inhibitorische Synaptogenese wird deutlich in der Entdeckung einer Mutation in Exon 2 von *ARHGEF9*. Diese G55A missense Mutation, bei lediglich einem der gescreenten Patienten, stört die Struktur und Funktion der SH3

Domäne und führt zur verminderten Bindung von Gephyrin. Der Phänotyp der jungen Patientin zeigte hier die typischen Symptome für Hyperekplexie [33].

#### **2.2.4 Die Rolle von Glycin Transporter 2 (GlyT2) bei STHE**

Wenn man die bisher betrachteten 3 Faktoren sieht, wird klar, dass Glycin-Rezeptoren, Gephyrin und Collybistin ein komplexes Symposium auf neuronaler Ebene bilden, deren Dysfunktionen mit der Ausprägung von STHE einhergehen. Trotzdem ließen sich hyperekplexische Phänotypen nicht ausschließlich durch Mutationen in den bereits genannten Genen erklären. Als neue mögliche Ursache wurde die fehlregulierte beziehungsweise ausbleibende Funktionalität des Glycin Transporters 2 (GlyT2) von Gomeza *et al.* (2003) spezifiziert. Ein GlyT2 knockout bei Mäusen führte zur postnatalen Sterblichkeit und der Ausbildung eines Hyperekplexie-ähnlichen Phänotyps in knockout Tieren [34].

##### **2.2.4.1 Aufbau und Funktion**

Glycin Transporter (GlyT) sind integrale Membranproteine und gehören zur Superfamilie der  $\text{Na}^+/\text{Cl}^-$ -abhängigen Transporter für Neurotransmitter. Diese nutzen elektrochemische Gradienten, um Neurotransmitterkonzentrationen in zentralen Synapsen zu steuern. GlyTs haben je nach Lokalisation, an inhibitorischen glycerinergen oder exzitatorischen Synapsen, spezifische Funktionen. GlyT1 wird überwiegend in Gliazellen exprimiert [23, 35, 36] und ist hauptverantwortlich für die Regulation extrazellulärer Glycin Konzentrationen [37, 38]. GlyT2 hingegen, welcher als Cotransporter  $3\text{Na}^+/1\text{Cl}^-/1\text{Gly}$  von extrazellulär in die präsynaptischen Boutons befördert, wurde in glycinergen Axonen im Rückenmark, Hirnstamm und geringfügig im Cerebellum lokalisiert [39, 40]. Des Weiteren wird GlyT2 eine wesentliche Rolle in der Aufrechterhaltung und Anlage eines Glycin-reichen Pools innerhalb der präsynaptischen Axone zugeschrieben [34]. Dies erleichtert signifikant die Aufnahme von Glycin in synaptische Vesikel durch den niedrig-affinen und niedrig-spezifischen Transporter VGAT/VIAAT [40]. Glycin moduliert als nicht essentielle Aminosäure die schnelle inhibitorische Neurotransmission im ZNS und hyperpolarisiert spinale Motoneuronen [41, 42]. Die Wirkung ergibt sich aus der Bindung an bereits erwähnte Strychnin-sensitive, Glycin-bindende Chlorid-Ionenkanäle (GlyR). Damit verbunden ist

eine Inhibition exzitatorischer Signaltransduktion durch erhöhte Durchlässigkeit für Chlorid-Ionen [16]. Die Bedeutung funktionsfähiger Glycin Transporter 2 in Bezug auf eine Erkrankung an Hyperekplexie ist also auch hier naheliegend. Gomeza *et al.* (2003) lieferten hier wie bereits beschrieben entscheidende Überlegungsgrundlagen für weitere Studien zum möglichen Kandidatengen *SLC6A5* bei STHE [34].

#### 2.2.4.2 Studienergebnisse

2006 folgten bereits die ersten erfolgreichen Ergebnisse aus einer großangelegten Screening-Studie von Rees *et al.* (2006). Diese untersuchten alle 16 Exone von *SLC6A5* bei 83 internationalen sporadisch und familiär an Hyperekplexie erkrankten Patienten, welche keine bereits bekannten Mutationen in *GLRA1*, *GLRB*, *GPHN* und *ARHGEF9* aufwiesen. Dabei wurden 10 verschiedene Mutationen bei insgesamt 6 Patienten gefunden. Hierbei handelt es sich hauptsächlich um missense Mutationen – zwei mit zusätzlichen Stop Codons und eine Mutation mit Frameshift. Alle Patienten zeigten klassische Hyperekplexie Symptome [43]. Die beiden folgenden Graphiken (vgl. Abb. 2 und 3) verdeutlichen visuell die genauen Positionen der mutierten Genabschnitte innerhalb der Struktur des Glycin Transporters 2 (GlyT2).

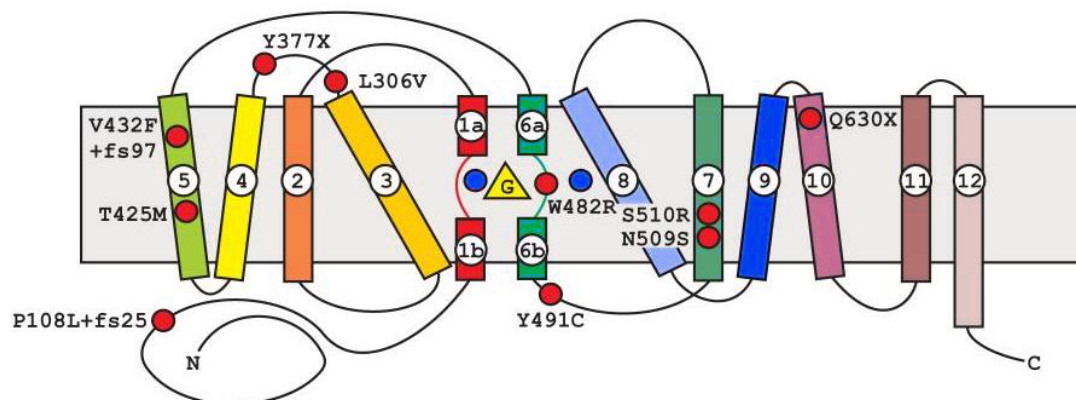


Abbildung 2: Schematische Darstellung relativer Positionen von GlyT2 Mutationen (rote Kreise) in *SLC6A5*, Yamashita *et al.* (2005) [44], modifiziert von Rees *et al.* (2006) [43]. Die Position von Glycin ist mit einem gelben Dreieck, die Positionen von 2 der 3 Natriumionen mit blauen Kreisen markiert.

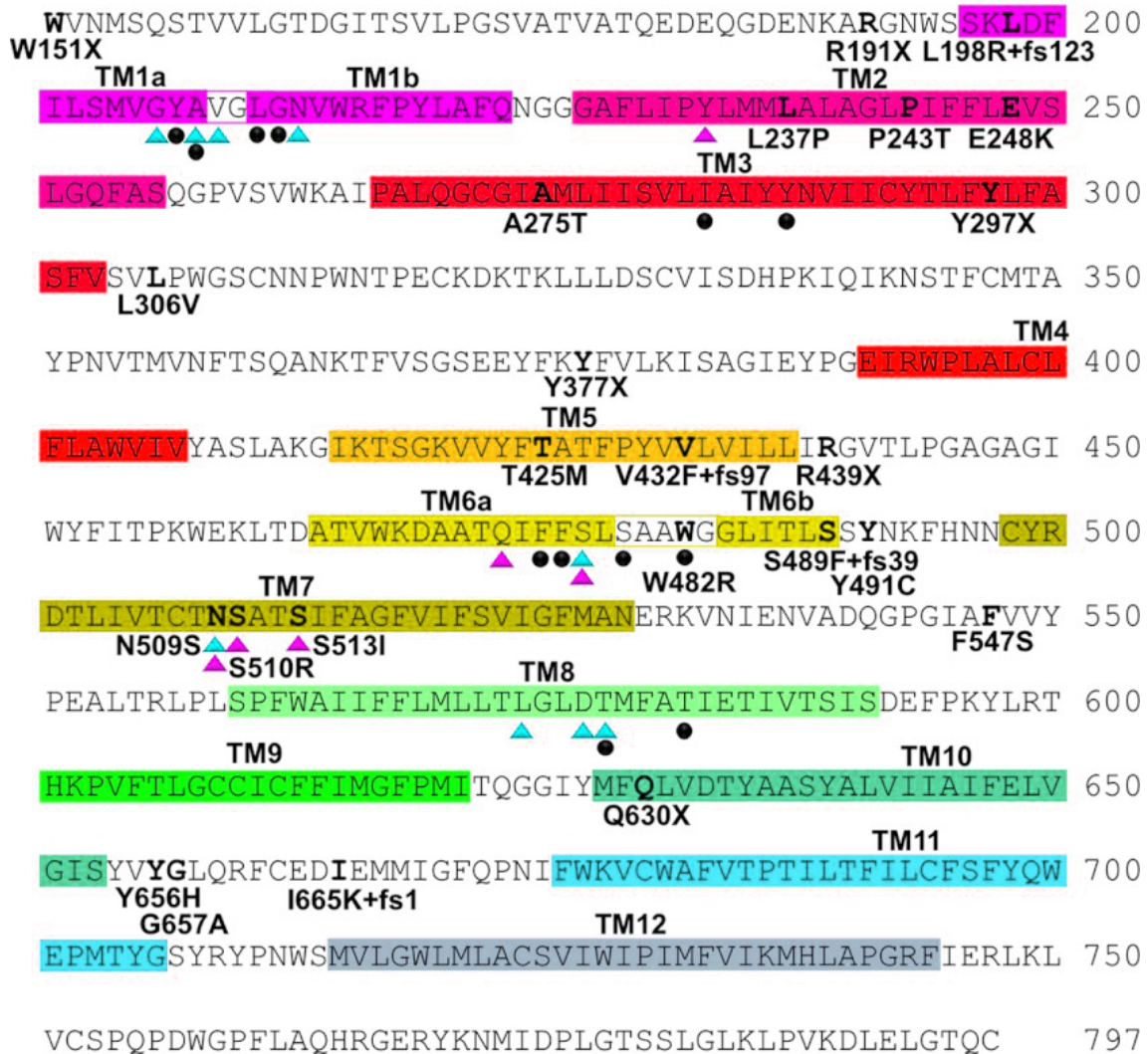


Abbildung 3: Gezeigt wird die Aminosäuresequenz von humanem GlyT2 (Gen SLC6A5), die die Positionen von vermeintlichen Transmembran (TM) Domänen (farbige Kästchen) und die Aminosäurereste von Hyperekplexie-Mutationen enthalten. Rosa- und türkisfarbene Dreiecke zeigen Rückstände in humanem GlyT2 die wahrscheinlich Na<sup>+</sup> und Cl<sup>-</sup> -Ionen koordinieren, bezogen auf Struktur-/Funktionsstudien des bakteriellen Leucin-Transporters (LeuT) und anderer Säuger Neurotransmitter-Transporter wie GAT-1 und SERT. Gefüllte schwarze Kreise zeigen Stellen an, die wahrscheinlich an der Glycin-Bindung beteiligt sind. Rees et al. (2006) [43], modifiziert von Carta et al. (2012) [45].

Auch Carta *et al.* (2012) begannen durch ähnliche Reflexionen eine großangelegte Studie, auf der Suche nach Mutationen in Glycintransportern (GlyT2), aufgrund der Annahme, dass es sich bei Hyperekplexie um eine Synaptopathie handeln würde [45]. Begründungen für diese Tatsache liegen in der Überlegung, dass sich hyperekplexische Erkrankungen nicht nur durch bereits bekannte Mutationen in Glycin-Rezeptoren, Gephyrin und Collybistin ausbilden. Genotyp-Phänotyp Analysen ergaben eine hohe Rate an Neugeborenen Apnoen, sowie Lernschwierigkeiten bei Kindern mit *SLC6A5* Mutationen. Von den 20 in der Studie festgestellten genetischen Varianten wurden bei 16 neuen Mutationen der direkte Einfluss auf einen defekten Glycin-Transport nachgewiesen. Die mehrheitlichen Gründe für dieses Szenario sind die mutationsbedingten verkürzten Proteine, aber auch neue pathogene Mechanismen, wie Spleißstellen-Mutationen. Ausführliche elektrophysiologische Untersuchungen einer Mutation (A275T) bei GlyT2 haben gezeigt, dass diese Substitution durch eine geringere Na<sup>+</sup> Affinität im Endeffekt eine Abnahme des Glycin Transports zur Folge hat. Außerdem konnten im Vergleich mit bereits erfolgten Studien über Mutationen in Glycin-Rezeptoren ermittelt werden, dass rezessive Erbgänge dieser Erkrankung die weitaus größere Basis innerhalb der menschlichen Population, als dominante Erbgänge bilden. Dies erklärt letztendlich auch den sporadischen vertretenen Charakter von Hyperekplexie [45].

### 2.2.4.3 Resumé

Die wesentlichen genetischen Dispositionen, welche hyperekplexische Phänotypen auslösen wurden durch zahlreiche Studien offengelegt. Mutationen in der alpha-Untereinheit des Glycin-Rezeptors (GlyR), sowie genetische Alterationen in der Codierung für den Glycin-Transporter 2 (GlyT2) sind hier die beiden häufigsten Ursachen vor Mutationen in *GLRB*, Gephyrin und Collybistin. Nichts desto trotz, lassen sich immer noch nicht alle Hyperekplexie-Fälle mit vorhandenen Forschungsdaten erklären [46, 47]. Erst durch den veröffentlichten Forschungsbericht von Safory *et al.* (2015) reiht sich ein weiterer Faktor in die Liste der möglichen Ursachen ein; der Alanin-Serin-Cystein-1 Transporter – ASC-1 [48].

## 2.3 Der ASC-1 Transporter

ASC-1 (*SLC7A10*) ist ein in Neuronen lokalisierter Plasmamembran-Antiporter, der mit hoher Affinität kleine Aminosäuren wie Glycin, L- und D-Serin, Alanin und Cystein transportiert [49, 50]. Ursprünglich wurde nach einer Antwort gesucht, wie die Aufnahme und Mobilisation von D-Serin im Gehirn funktioniert. In Studien wurden verschiedene Aminosäure-Transporter, wie unter anderem Na<sup>+</sup>-abhängige Systeme (ASC) untersucht [51, 52]. Untersuchungen mit klonierten ASC-Transportern zeigten hohe Affinitäten zu L-Alanin, L-Cystein und L-Serin. Aufgrund der niedrigen Affinität zu D-Isomeren, welches auch D-Serin mit einschließt, kam man zu der Annahme, dass es zusätzliche Systeme geben musste, die in der Lage sind, die relativ niedrigen D-Serin Level im extrazellulären Fluid des Gehirns aufrecht zu erhalten [53].

### 2.3.1 Die *SLC7* Familie

Der ASC-1 Transporter gehört zur *SLC7* Familie, welche in 2 Untergruppen, die der kationischen Aminosäuretransporter (CAT / *SLC7 A1-4*) und die der glykoprotein-assoziierten Aminosäuretransporter (gpaAT / *SLC7 A5-11*) unterteilt wird. ASC-1 kodiert von *SLC7A10* gehört folglich zur zweiten Untergruppierung der Superfamilie, welche auch als leichte Ketten, beziehungsweise katalytische Ketten heterodimerer Aminosäuretransporter bezeichnet werden [54]. Insgesamt wurden bis dato sieben leichte Ketten (LAT1, LAT2, y<sup>+</sup>LAT1, y<sup>+</sup>LAT2, ascAT1, xCT und b<sup>0+</sup>AT) durch zahlreiche Forschungsprojekte identifiziert. Auf Basis homologer und hydropathischer Diagramme konnten für die Klasse der gpaATs 12 Transmembrandomänen mit intrazellulärem Amino- (NH<sub>2</sub>) und Carboxy- (COOH) Terminus nachgewiesen werden [49, 55].

### 2.3.2 Oberflächenexprimierung

Im Gegensatz zu CATs die aufgrund ihrer 14 Transmembran-Segmente und Glykosylierung auf Oberflächen exprimiert werden können, benötigen gpaATs die Verbindung zu Glycoproteinen der *SLC3* Familie [54]. Maßgeblich für die Expression der leichten Kette von *SLC7A10* (ASC-1) ist 4F2hc, ein 94kDa schweres, 529 Aminosäuren langes, glycosyliertes Protein, mit lediglich einer Transmembran-Helix. Der NH<sub>2</sub> -Terminus wurde intrazellulär, der COOH -Terminus extrazellulär lokalisiert

[56, 57]. Eine Interaktion zwischen leichter und schwerer Kette wird über eine prominente Disulfid-Brückenbindung zwischen Cystein an Position 109 der 4F2-heavy-chain und einem Cystein zwischen dritter und vierter Transmembrandomäne der ASC-1 Kette hergestellt [58-60]. In seiner strukturellen Gesamtheit besteht der Aminosäuren-Transporter ASC-1 folglich aus zwei kooperierenden, über Stickstoffatome kovalent verknüpften, Untereinheiten (vgl. Abb. 4).

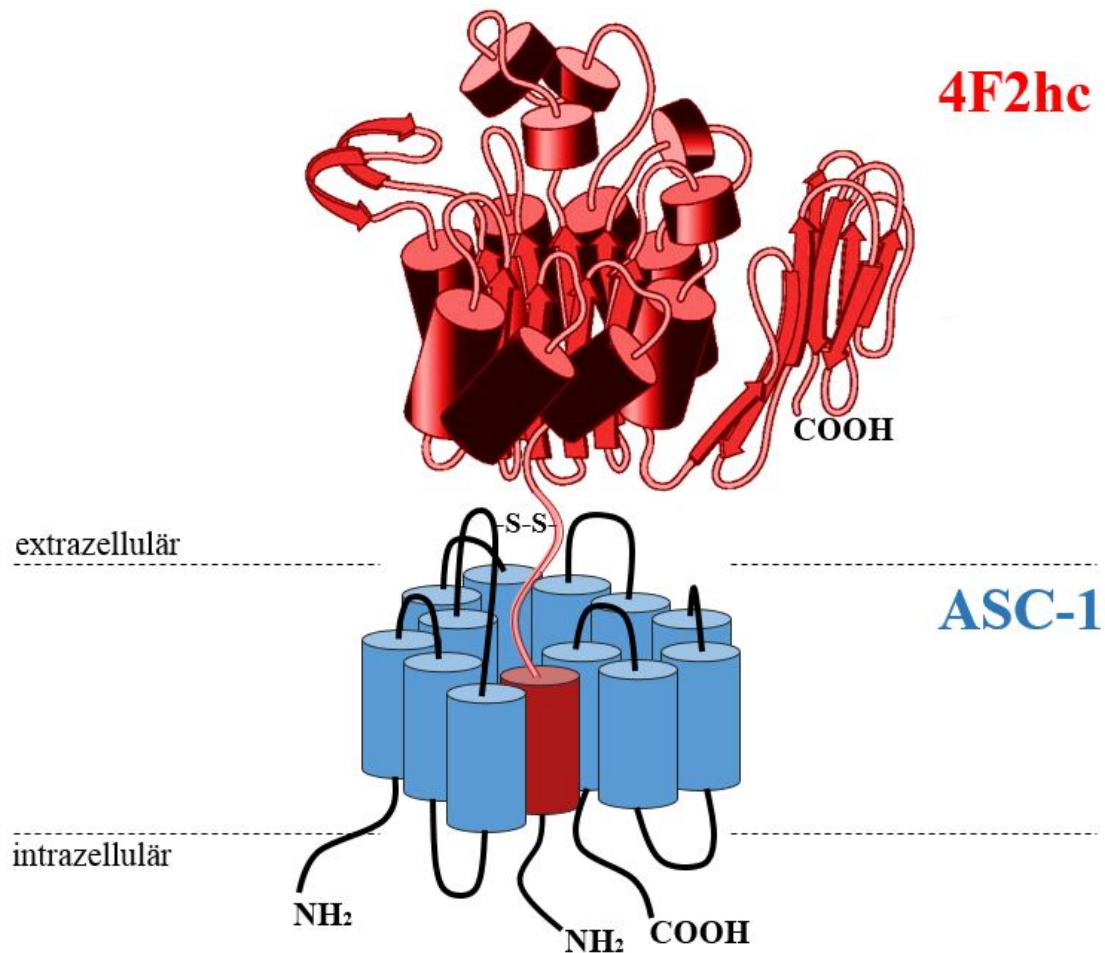


Abbildung 4: vereinfachtes Schaubild des molekularen Aufbaus von ASC-1. Der funktionelle Serin-Transporter besteht aus zwei Untereinheiten, dem polytopischen Membranprotein und leichten Kette (ASC-1), sowie einem damit verbundenen Typ-II-Membranprotein und schweren Kette (4F2hc). 4F2hc vermittelt über Disulfidbrückenbildung zur leichten Kette die Bindung des funktionellen Komplexes an die Plasmamembran. Die schwere Kette 4F2hc besteht aus einer Transmembranhelix. Der NH<sub>2</sub>-Terminus von 4F2hc liegt intrazellulär, der große C-terminale Teil des Proteins ist extrazellulär lokalisiert. Die leichte Kette ASC-1 besteht aus 12 Transmembrandomänen, wobei beide N- und C-Termini intrazellulär lokalisiert sind.

Sequenziell lassen sich Glycoprotein-assoziierte Aminosäuren-Transporter in einer Art Familienstammbaum vergleichen, wobei eine 60 prozentige, strukturelle Übereinstimmung zwischen ASC-1 und LAT2 eruiert ist (vgl. Abb.5). Die cDNA von ASC-1 kodiert letztendlich für ein 523 Aminosäuren langes Transmembranprotein mit einer Masse von 53 kDa. Nakauchi *et al.* (2000) lokalisierten in ihrer Forschungsarbeit das humane Gen für ASC-1 auf dem Chromosom 19q12-q13.1. Darüber hinaus konnten RNA Detektionen in humaner Niere, Gehirn, Placenta, Herz, quergestreifter Muskulatur, Lunge, Leber und Pancreas nachgewiesen werden [61]. Die höchste Expression wurde laut Studienberichten im Gehirn und in der Niere gefunden [49].

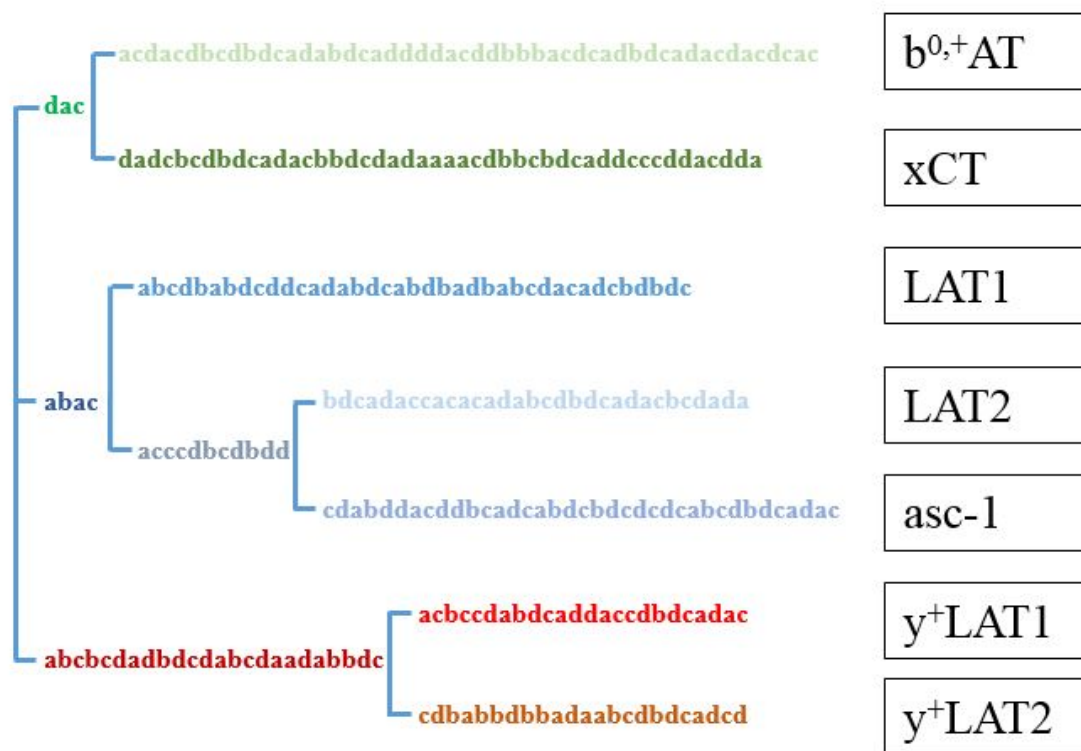


Abbildung 5: Schematische Darstellung der strukturellen Beziehung innerhalb der SLC7 Familie für Glykoprotein-assoziierte Aminosäuretransporter (gpaAT). Deutlich wird, dass für einige Ketten, wie für ASC-1 und LAT2 gewisse sequenzielle Übereinstimmungen vorhanden sind.



### 2.3.3 Funktion auf neuronaler Ebene

ASC-1 ist ein hauptsächlich in Neuronen lokalisierter Plasmamembran-Antiporter mit hoher Affinität zu kleinen neutralen Aminosäuren wie Glycin, L-Serin, D-Serin, Alanin und Cystein. L-Serin, welches in Astrozyten produziert wird, nutzt den Alanin-Serin-Cystein-Transporter-1 als Shuttlemechanismus, um in Neuronen zu gelangen. Dort wird es als Ausgangssubstanz genutzt, um *de novo* D-Serin katalytisch über Serin-Racemase zu synthetisieren. Im Umkehrschluss gelangt D-Serin als Austauschprodukt im Antiport zu L-Serin über ASC-1 in den extrazellulären Raum und final in Astrozyten, wo es in Vesikeln akkumuliert wird. Neuronales D-Serin wird folglich durch Depolarisation via ASC-1 freigesetzt. Die Ausschüttung von D-Serin in Astrozyten hingegen folgt einer über aktivierte Plasmamembranrezeptoren ausgelösten Exozytose. Die neuronale Bereitstellung von Glycin über ASC-1 Antiport kann, wenn auch in einem geringeren Ausmaß, im Vergleich zu D-Serin, N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren (NMDAR) stimulieren. Zusammenfassend lässt sich sagen, dass D-Serin letztendlich über Transportmechanismen ASCT (Alanin-Serin-Cystein-Transporter) und ASC-1 aus dem synaptischen Spalt befördert wird. Darüber hinaus trägt ASC-1 über einen direkten Transport von Glycin im Zusammenspiel mit GlyT2 hauptsächlich zu dessen Akkumulation in präsynaptischen Boutons im Rückenmark und Hirnstamm bei, als auch durch den Symport von L-Serin, welches durch Serin-Hydroxymethyltransferase in Glycin umgewandelt wird (vgl. Abb. 6) [62-66].

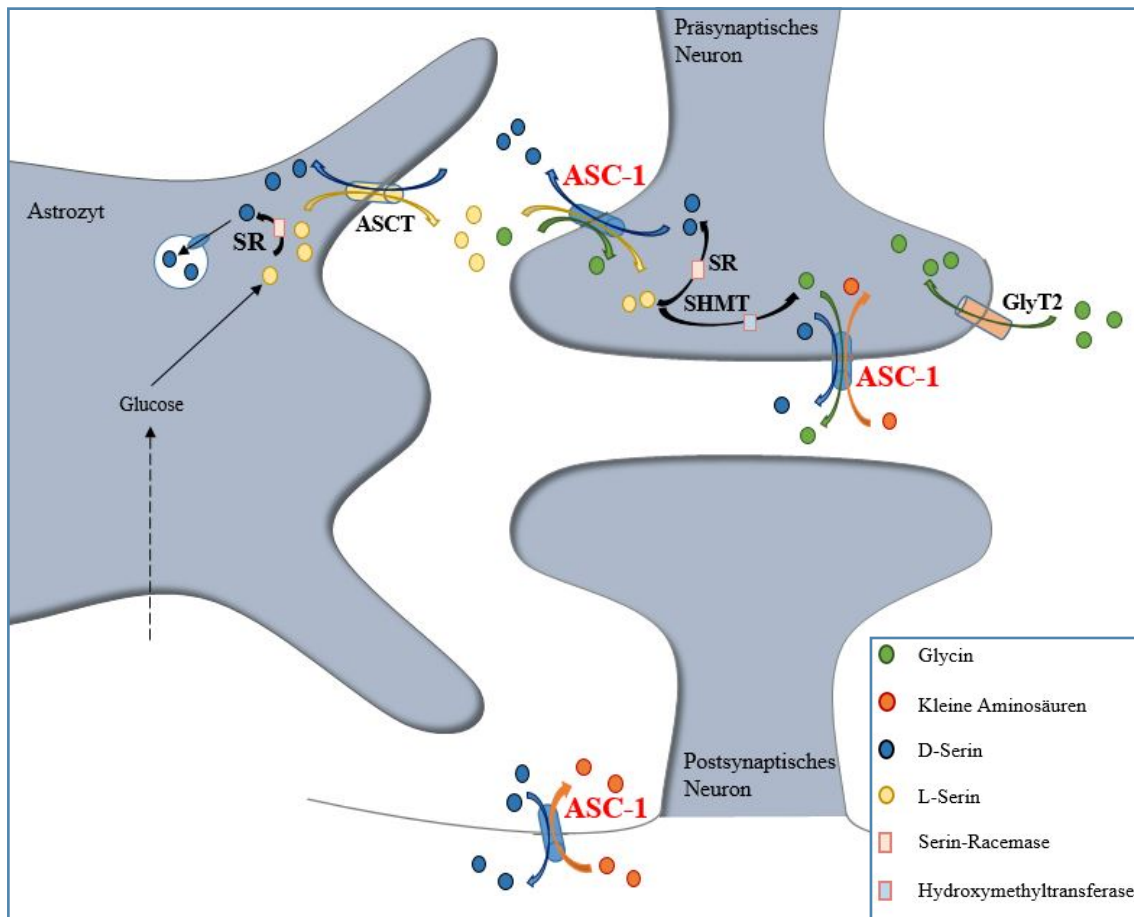


Abbildung 6: Schematische Darstellung von Transportvorgängen am Präsynaptischen Bouton, Astrozyt und postsynaptischen Neuron in Bezug auf ASC-1. L-Serin wird über Shuttles (ASCT) aus Astrozyten nach extrazellulär und letztendlich durch Alanin-Serin-Cystein Transporter 1 (ASC-1) in Neuronen transportiert. Die neuronale Anwesenheit von L-Serin bildet die Voraussetzung für die Bildung von D-Serin durch Serin-Racemase (SR). D-Serin wiederum nutzt ein rückläufiges Shuttle-System über ASC-1, sowie ASCT, um von Neuronen in Astrozyten zu gelangen, wo es in Vesikeln gespeichert wird. Die neuronale Ausschüttung von D-Serin wird über Depolarisation von ASC-1 gesteuert, während astrogliales D-Serin durch Exozytose nach der Aktivierung von Rezeptoren auf der Plasmamembran freigesetzt wird. D-Serin wird schließlich aus dem synaptischen Spalt über ASCT und ASC-1-Transporter entfernt. Direkter Transport von Glycin durch ASC-1 ist neben dem Glycin-Transport über GlyT2 einer der Hauptmechanismen zur Anreicherung von Glycin im Rückenmark und Hirnstamm. ASC-1 scheint auch L-Serin, welches anschließend durch Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) in Glycin umgewandelt wird, bereitzustellen.

#### 2.3.4 ASC-1 als neuer Faktor bei Hyperekplexie

2015 gelang es Safory *et al.* (2015) durch eine umfangreiche Studie mit Asc-1 Knock-Out Mäusen erstmals eine potentielle Relevanz bei hyperekplexischen Erkrankungen und glycerinergen Störungen aufzuzeigen [48]. Die Studie befasst sich mit der Rolle von Asc-1 als neuromotorisches Regulationselement. Hierfür dienten zahlreiche Untersuchungen, zum Teil auf elektrophysiologischer Ebene an Asc-1 KO und Wildtyp Mäusen. In folgender Listung soll ein kurzer Überblick der Forschungsergebnisse gegeben werden: Glycin-Konzentrationen sind in allen Gehirnarealen bei Asc-1 KO Mäusen signifikant verringert; Glycin wird *de novo* im Gehirn synthetisiert; niedrige Glycin-Konzentrationen im Gehirn werden nicht durch periphere Minderverfügbarkeit verursacht; Glycin passiert die Blut-Hirn-Schranke nicht; in geringerem Umfang gilt gleiches für L-Serin bei Asc-1 KO; D-Serin Konzentrationen sind nicht signifikant verringert bei Asc-1 KO; Asc-1 KO Mäuse zeigen typische Symptome: Ausschlagen der hinteren Gliedmaßen bei Körperberührung, typische Schrecksymptomaten, stark erhöhte Latenzzeiten beim Aufrichten; Injektionen mit Glycin oder L-Serin intraperitoneal (i.p.) ermöglichten eine Aufhebung der Krankheitssymptomatik; Injektionen mit D-Serin oder Saline (i.p.) taten dies nicht; erhöhter Tremor und verringerte Open-Field Aktivität bei Asc-1 KO; Normalisierung durch Glycin Injektion (i.p.); die akustische Startle Antwort ist bei Wildtyp und Asc-1 KO unverändert, wird jedoch durch Glycin Injektion (i.p.) zusätzlich bei Asc-1 KO verringert; verringerte Frequenz glycinerner spontaner, inhibitorischer, postsynaptischer Ströme mit unveränderter Amplitude bei Asc-1 KO Mäusen, D-Isoleucin erhöht die Ausschüttung von Glycin und D-Serin in Wildtyp Mäusen und sorgt letztendlich für niedrigere intrazelluläre Konzentrationen im Wildtyp, nicht aber bei Asc-1 KO; Glycin wird mittels Serin-Hydroxymethyltransferase aus L-Serin intrazellulär *in vivo* synthetisiert; Glycin wird im Symport mit L-Serin, über Asc-1 in neuronale Boutons transportiert (vgl. Abb. 7). Diese Sachlage verdeutlicht eine entscheidende, bisher unbekannte Rolle des Alanin-Serin-Cystein-1 Transporters, als Regulator des Glycin Metabolismus im Gehirn (vgl. Abb. 8), als auch seinen Einfluss in der Ausbildung von Hyperekplexie [48].

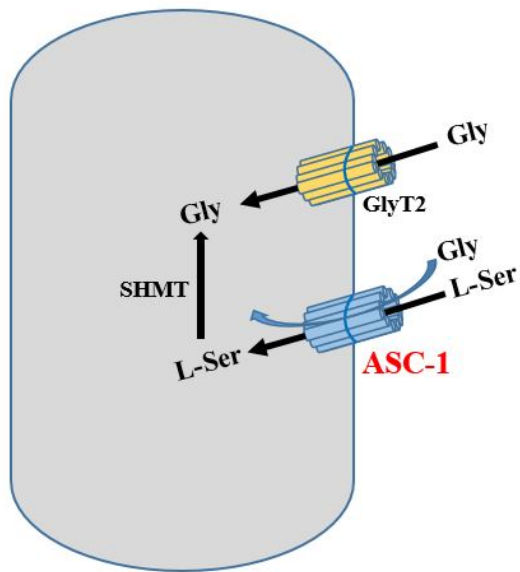


Abbildung 7: Schematische Darstellung der Glycin- und L-Serin Aufnahme am präsynaptischen Bouton via ASC-1 und GlyT2; nach den Erkenntnissen der Studie von Safory et al. (2015) [48]. Die Umwandlung von L-Serin in Glycin wird durch Serin-Hydroxy-methyltransferase (SHMT) katalysiert.

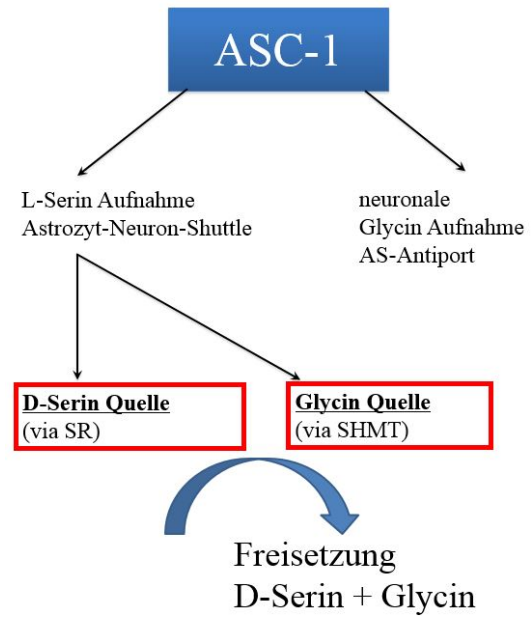


Abbildung 8: Vereinfachte Darstellung der Rolle von ASC-1 im Bezug auf Glycinakkumulation und Freisetzung auf neuronaler Ebene. ASC-1 hat sich als wichtiger Regulator im Glycinhaushalt neben GlyT2 etabliert.

### **3 Zielsetzung**

Anhand der bereits beschriebenen Studien und neu gewonnenen Erkenntnissen, kann man klar sagen, dass es bei einer genetischen Veränderung und damit gestörter oder ausbleibender Funktionalität des ASC-1 Transporters zur Ausprägung eines hyperekplexischen Krankheitsbildes kommen kann. Das Ziel unserer Screening-Studie ist, zu eruieren, ob Patienten die an Hyperekplexie erkrankt sind, die jedoch keine der bisher bekannten Mutationen tragen, Mutationen innerhalb des ASC-1 Transporters besitzen. Falls Mutationen innerhalb codierender exonischer Sequenzen detektierbar sind, soll anschließend geprüft werden, ob die Mutationen die Funktion des Transporters beeinflussen. Die Ergebnisse dieser experimentellen Studie sollen anschließend ergänzend zur Ermittlung der Ursachen von an Hyperekplexie erkrankten Patienten dienen.

### **4 Methoden und Material**

Unsere zu analysierende Patientenkohorte umfasst 51 Probanden. Erste Voraussetzung für die Auswahl der Patienten war die Diagnose Hyperekplexie mit entsprechender Symptomatik. Zweitens wurden die Patienten ausgewählt, bei denen nach Screening keine der bekannten Mutationen in den Genen *GLRA1*, *GLRB* und *SLC6A5*, welche mit Hyperekplexie assoziiert sind, identifiziert wurden. Die vorhandenen Patientenproben bestehen teilweise aus gefrorenen, antikoagulierten (durch Citrat) Vollblutproben (- 80 °C gelagert), sowie bereits isolierter genomischer DNA (gDNA gelagert bei 4 °C).

#### **4.1 Materialliste**

##### **4.1.1 Geräte**

PCR:

- Biometra Professional Thermocycler / T Professional Basis
- Ligation: Applied Biosystems 2720 Thermal Cycler

Zentrifugen:

- Eppendorf mini Spin

- Biozym Sprout
- Eppendorf Centrifuge 5424

Heizblöcke:

- Eppendorf Thermomixer comfort
- Stuart block heater SBH130D

Gelelektrophorese:

- Pharmacia LKB GPS 200/400
- Biometra Compact M
- Biometra Casting System Compact M
- Biometra WT12

Vortex-Gerät:

- Scientific Industries Vortex Genie 2

Mikrowelle:

- Bosch AM925ELS

Waagen:

- Kern EMB 220-1
- VWR Sartorius WR124

UV-Belichtungsgerät

- Biometra BioDoc Analyze

Kamera:

- Canon EOS 1100D

Thermopapierdrucker:

- Mitsubishi P95

Inkubator:

- Innova 42 - Inkubator Shaker Series

#### 4.1.2 Polymerase

- HotStar HiFidelity DNA Polymerase von QIAamp
- Pfu-Polymerase

#### 4.1.3 Enzyme

- Sal I 10 u/μL von Promega
  - o aus einem *Escherichia coli* Stamm, welcher das klonierte Sal I Gen von *Streptomyces albus G* enthält
- Not I 10000 u/μL von NE Biolabs
  - o aus einem *Escherichia coli* Stamm, welcher das klonierte Not I Gen von *Nocardia otitidis-caviarum* enthält
- Exo I 1000 Rxns/mL von NE Biolabs (Exonuklease1)
  - o Aus einem *Escherichia coli* Stamm mit Genkonstrukt zur Codierung für *Escherichia coli* Exonuklease 1
- rSAP 1000 Rxns/mL von NE Biolabs (Shrimp Alkaline Phosphatase)
  - o aus einem *Pichia pastoris* Stamm, welcher das Gen für Garnelen Alkaline Phosphatase, aus der nördlichen Garnelenpopulation *Pandalus borealis*, enthält
- T4 DNA Ligase 400000 u/mL von NE Biolabs
  - o aus *Escherichia coli* C600 pcl857 pPLc28 lig8

#### 4.1.4 Puffer

- 10x TBE (1 Liter)
  - o 108 g Tris
  - o 55 g Borsäure
  - o 40 mL 0,5M Na<sub>2</sub> EDTA pH 8
- 50x TAE (1 Liter)
  - o 242 g Tris
  - o 57,1 mL Eisessig
  - o 100 mL 500 mM EDTA pH 8

- 10x TBS (1 Liter)
  - 60,6 g Tris
  - 87,6 g NaCl
  - 1 M HCl
  - Deionisiertes Wasser
  
- Blaumarker/Ladepuffer
  - 15 g 30 % Glycerin
  - 20 µL 0,5 M EDTA
  - Spatelspitze 0,05 % Bromphenolblau
  - Spatelspitze 0,05 % Xylencyanol FF
  
- Qiagen 5x Puffer (1,5 mM dNTPs, 7,5 mM MgSO<sub>4</sub>)
- Qiagen 5x Q Solution Puffer
- T4 DNA Ligase Puffer 10x mit 10 mM ATP
- 3.1 NE Puffer 10x von NE Biolabs
- BSA purified 10x von NE Biolabs

#### **4.1.5 Kits**

- DNA Blood Mini Kit von QIAamp
  - RNase, Protease, Mini Spin Column, Collection Tubes, Puffer: AW1, AW2, AE
- Rapid PCR Cleanup Enzyme Set von NE Biolabs
  - Exonuklease 1, rSAP
- PCR clean-up Gel extraction von Machery-Nagel
  - Nucleo Spin Column, Collection Tubes, Puffer: NTI, NE, NT3
- NucleoSpin Plasmid von Machery-Nagel
  - RNase A, NucleoSpin Plasmid Columns, Collection Tubes, Puffer: A1, A2, A3, A4, AE

#### **4.1.6 Zellen**

- Für Transformation: NEB 5-alpha C2987H von NE Biolabs
  - Medium: SOC outgrowth Medium
  - ausplattiert auf: YT (yeast tryptone = Hefe Trypton) + Amp Platten



## **4.2 Isolation genomischer DNA aus antikoaguliertem, humanem Vollblut**

Für die Vollblutpräparationen wurde das Blood Mini Kit QIAamp der Firma Qiagen verwendet. Vorbereitend wurden die Pufferlösungen AW1 (19 mL Konzentrat plus 25 mL Ethanol 100 % reinst) und AW2 (13 mL Konzentrat + 30 mL Ethanol 100 % reinst) hergestellt. Im ersten Schritt – der Zelllyse wurden 20 µL Protease in ein 1,5 mL Eppendorfcup je Probe pipettiert, plus 200 µL Vollblutprobe. Für den RNase Verdau wurden 4 µL RNase A (100 mg/mL) hinzugefügt und kurz auf und ab pipettiert; anschließend 200 µL AL Puffer addiert und für 15 Sekunden pulsierend gevortext. Nach 10-minütiger Inkubation bei 56 °C, erreicht die Lyse ihr Maximum. Danach wurden die Probengefäße kurz anzentrifugiert, dann 400 µL Ethanol 100 % reinst je Probe hinzugefügt, 15 Sekunden pulsierend gevortext und anschließend wiederholt anzentrifugiert. Um die genomische DNA an die Membranen der Mini Spin-Säulen zu binden, wurden diese erst jeweils mit 650 µL Blutlysat beladen und eine Minute bei 10000 x g in einem Collection Tube zentrifugiert. Danach folgte die Beladung der Säulen, mit dem restlichen Blutlysat der jeweiligen Proben, sowie wiederholter Zentrifugation zu gleichen Bedingungen. Anschließend folgte das Waschen der Membranen durch Zugabe von 500 µL AW1 Puffer je Säule in einem neuen Collection Tube, mit anschließender Zentrifugation bei 10000 x g für eine Minute. Daraufhin wurde der Durchlauf verworfen, die Säule mit 500 µL AW2 Puffer beladen und für 3 Minuten bei 14000 x g zentrifugiert; der Durchlauf wiederum verworfen und die Säule nochmals für eine Minute bei 14000 x g in das Tube zentrifugiert, um die letzten Ethanol Reste zu entfernen. Die Elution der genomischen DNA wurde durch das Hinzufügen von 100 µL AE Puffer direkt auf die Mitte der Membran, ohne diese zu berühren und anschließende Zentrifugation bei 10000 x g für eine Minute erreicht.

## **4.3 Konzentrationsmessungen**

Die Messung der Konzentrationen der gewonnenen genomischen DNA, sowie der gDNA im bestehenden Kollektiv erfolgte mittels NanoDrop 1000 Spektrophotometer. Hierfür wurde entsprechend der Herstellerangaben das Messungsverfahren mit AE Puffer auf 0 ng/µL eingestellt. Anschließend wurden die Konzentrationen der Proben jeweils durch den Einsatz von 2,5 µL Eluat im NanoDrop bestimmt und protokolliert.

#### 4.4 Herstellung von Aliquotes

Für den weiteren Verlauf der Versuchsreihe wurden anschließend 50 µL Aliquots des gDNA Materials, bei einer Konzentration von 25 ng/µL hergestellt. Hierfür wurde RNase freies, doppelt destilliertes Wasser zur Verdünnung genutzt.

#### 4.5 Polymerase-Kettenreaktion

Seit der wissenschaftlichen Veröffentlichungen von Saiki *et al.* (1985 und 1988), sowie Mullis und Fallona (1987) konnten eine bahnbrechende Methode zur spezifischen Vervielfältigung von DNA *in vitro* etabliert werden [67-69]. Fortan war es möglich, gezielt Genabschnitte zu isolieren und mithilfe thermostabiler Polymerasen exponentiell zu vermehren. Die Vorgehensweise wird durch ein Protokoll mit alternierenden Zyklen aus jeweils 3 Prozessen beschrieben. Diese Prozesse bestehen aus der Denaturierung und somit Auftrennung der DNA in Einzelstränge bei 94 Grad Celsius, dem Annealing = Anlagerung der Primer, sowie der Elongation der Zielsequenz. Für die PCR wurden thermostabile Polymerasen verwendet. Dies ist notwendig, um entsprechend hohe Temperaturen während der Denaturierung zu kompensieren. In unserem Fall wurden ‚proofreading‘ (korrekturlesende) Polymerasen HotStar HiFidelity DNA Polymerase (*Pyrococcus* Stamm) und Pfu-Polymerase (*Pyrococcus furiosus* Stamm) verwendet. Bei ‚proofreading‘ Polymerasen ist das Risiko eines fehlerhaften Einbaus von Nukleotiden durch den Korrekturmechanismus entscheidend minimiert.

##### 4.5.1 PCR Pipettierschema

Für jedes Exon wurde ein entsprechender Mastermix mit entsprechenden sense und antisense Primern angesetzt. Die Primersequenzen und Nummern sind der Tabelle (vgl. Tab. 1 und Tab. 2 Seite 70, 71) im Anhang zu entnehmen. Für den Ansatz beziehungsweise den Mastermix wurde das Hot Star HiFidelity Polymerase Kit von Qiagen verwendet. Die verwendeten Komponenten des Kits bestehen aus HotStar HiFidelity DNA Polymerase, 5x HotStar HiFidelity PCR Puffer (inklusive dNTPs), 5x Q-Solution und RNase-freiem Wasser. Bei der HotStar HiFidelity Polymerase handelt es sich um eine proofreading-Polymerase. Dadurch war es möglich, bei der späteren Auswertung der Sequenzen einen Lesefehler der Polymerase während der Kettenreaktion ausschließen. Die Lagerung der Komponenten erfolgte bei -20 °C im

Gefrierschrank. Pro Versuchsreihe lief bei der PCR für jedes Exon eine Negativkontrolle (Mastermix ohne Zugabe von gDNA) mit, um nach der anschließenden Kontrolle mittels Gelelektrophorese, eine Verunreinigung der Mastermix-Komponenten auszuschließen. Die Volumina der Mastermixansätze richteten sich nach der Anzahl der Proben je Durchlauf, für das jeweilige Exon. Die Referenzwerte für eine einzelne Probe setzten sich aus 4,5 µl RNase freiem Wasser, 5 µL 5x HotStar HiFidelity PCR Puffer, 5 µL 5x Q-Solution, 2,5 µL Primer (sense), 2,5 µL Primer (antisense) und 0,5 µL HotStar HiFidelity DNA Polymerase zusammen. So erhielt man je Probe ein Mastermixvolumen von 20 µL, dem 5 µL gDNA Material des jeweiligen Kollektivpatienten zugesetzt wurden (vgl. Abb. 9). Der Negativkontrolle wurde an Stelle von gDNA, 5 µL RNase freies Wasser beigelegt.

Agens	Vol. [µl] Pro Tube	1Pat	2Pat	3Pat	4Pat	5Pat	6Pat	7Pat	8Pat
H <sub>2</sub> O (RNA frei)	4,5	9,0	13,5	18	22,5	27	31,5	36	40,5
5x HotStar HiFidelity PCR Buffer*	5	10	15	20	25	30	35	40	45
5x Q-Solution	5	10	15	20	25	30	35	40	45
Primer for (10pmol/µl)	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5
Primer rev (10pmol/µl)	2,5	5	7,5	10	12,5	15	17,5	20	22,5
HotStar HiFidelity DNA Polymerase 2,5U/µl	0,5	1	1,5	2	2,5	3	3,5	4	4,5
	Ve= 20µl	MM 40µl	MM 60µl	MM 80µl	MM 100 µl	MM 120 µl	MM 140 µl	MM 160 µl	MM 180 µl
DNA (25ng/µl)	5								

Abbildung 9: PCR Pipettierschema für Mastermixansätze

Die Tubes wurden anschließend kurz gevortext, an zentrifugiert und entsprechend gekennzeichnet. Für die PCR wurde der T Professionell Gradient Thermocycler der Firma Biometra genutzt. Die Parameter der PCR blieben für die gesamte Versuchsreihe unverändert. Insgesamt wurden je Durchlauf 40 Zyklen gefahren (vgl. Abb. 10). Alle PCR Produkte unterschritten letztendlich eine Länge von 2000 Basen. Die programmierten Werte der PCR sind der nachfolgenden Grafik zu entnehmen.



Abbildung 10: PCR Pipettierschema für Mastermixansätze

#### 4.6 Überprüfung des eluierten PCR Produkts mittels Gelelektrophorese

Für die Herstellung des Gels wurde 1 g Agarose in 100 mL TBE-Puffer gelöst und unter gelegentlichem Schwenken in der Mikrowelle aufgeköcht. Die Agarose sollte vollständig gelöst sein. Nach Abkühlen auf Handtemperatur wurden 4 µL MidoriGreen in die Lösung pipettiert und geschwenkt, anschließend das Gel in eine Form gegossen und Ladetaschen-Negativformen ergänzt. Nach dem Trocknen des Gels wurde dieses auf dem Plateau der Gelelektrophorese-Kammer platziert und vollständig mit TBE Pufferlösung bedeckt. Auf einem Parafilm Stück wurden je Probe 2 µL Blaumarker aufgetragen und anschließend 5 µL des jeweiligen PCR-Produkts hinzugefügt. Die 2 Komponenten wurden durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren vermengt und anschließend in einer Ladetasche des Gels platziert. Als Referenz, zur Kontrolle der Bandengröße, wurde der Marker pRK7/Hinf I genutzt und entsprechend der Menge des Blaumarker-Produkt-Volumens ebenfalls in eine Ladetasche pipettiert. Die Gelelektrophorese lief anschließend für 30 Minuten bei 145 Volt. Im Anschluss wurden die Banden unter UV-Licht kontrolliert, fotografiert und entsprechend protokolliert.

#### 4.7 Agarosegel Präparation bei Doppelbanden

Im Falle des Auftretens von Doppelbanden während der Gelelektrophorese, wurde die Isolation der korrekten Bande per Gelextraktion nachgestellt, um ein sauberes Ergebnis bei der Sequenzierung zu erzielen. Hierfür wurden erneut Agarosegele hergestellt. Diese verfügten jedoch über ein höheres vertikales Volumen, um größere Ladetaschen in horizontaler und vertikaler Richtung zu ermöglichen. Von den betroffenen Produkten wurde anschließend das gesamte Restvolumen (20 µL), mit jeweils 5 µL Blaumarker, auf einem Parafilmstreifen vorsichtig vermengt und in eine Ladetasche appliziert. Auch hier wurden zusätzlich der Marker pRK7/Hinf I, sowie ein mit Blaumarker gefärbtes

PCR-Produkt, welches nur eine Bande zeigte, als Referenz mitgeführt. Das Gesamtvolumen der einzelnen Beladungen betrug 25  $\mu\text{L}$ . Die Gelelektrophorese lief ebenfalls für 30 Minuten bei 145 Volt. Anschließend wurden die Doppelbanden-PCR-Produkte von Marker und Referenzprodukt getrennt. Nur diese beiden wurden unter UV-Licht betrachtet. In der Referenzprobe wurde die korrekte Bande entfernt und verworfen. Die entstandene Lücke im Gel diente nach bündigem Anlegen des Gelstücks der übrigen Produkte als Höhenmarkierung, um die benötigten Banden exakt zu extrahieren. Eine Verfälschung durch UV-Licht verursachte Mutationen wurde so vermieden. Die gelgebundenen Banden wurden in einzelne Eppendorf-Gefäße gegeben, markiert und protokolliert.

#### **4.8 DNA Extraktion aus Agarosegelen**

Für die Gel-Extraktion diente das NucleoSpin Gel and PCR Cleanup Kit von Macherey-Nagel. Pro 100 mg Gel wurden 200  $\mu\text{L}$  NTI Puffer zu den Gelfragmenten pipettiert. Anschließend wurden die Produkte bei 50 °C und 500 rpm (1,5 mm Radius) im Thermomixer professional von Eppendorf inkubiert. Die Inkubationszeit ist von der Lösungsgeschwindigkeit des Gels im Puffer abhängig und unterliegt ständiger Sichtkontrolle. Nach vollständiger Lösung wurden die Produkte auf die NucleoSpin-Säulen geladen und in Collection Tubes eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen. Um die Membran zu waschen folgten 2 separate Durchgänge. Hier wurden jeweils 650  $\mu\text{L}$  NT3 Puffer auf die Säule gegeben und ebenfalls für eine Minute bei 11000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde ebenfalls verworfen. Die Trocknung der Membran wurde mit einer zusätzlichen Zentrifugation für nochmals eine Minute bei 11000 x g erreicht. Zwischenzeitlich erfolgte die Erwärmung des Lösungspuffers NE auf 70 °C. Hierfür wurden 30  $\mu\text{L}$  je Produkt benötigt. Für die getrockneten Säulen wurden anschließend neue sterile Eppendorfgefäße benutzt. Nach erreichter Temperatur des NE-Puffers erfolgte die Applikation von jeweils 30  $\mu\text{L}$  auf die Membranen mit zusätzlicher Inkubationszeit von zwei Minuten. Nach Zentrifugation für eine Minute bei 11000 x g wurde der Schritt noch ein weiteres Mal wiederholt, um die Ausbeute zu maximieren. Die im Nanodrop ermittelten Konzentrationen der Lösung wurden abschließend protokolliert.

#### 4.9 Aufreinigung des PCR Produkts

Die Aufreinigung des PCR Produkts erfolgte mit dem NEB Rapid-PCR Cleanup Enzym Set (NE Biolabs). Dieses besteht aus zwei rekombinanten Enzymen, Exonuclease I (Exo I) und Garnelen Alkaline Phosphatase (rSAP). Es ermöglicht einen schnellen und vollständigen enzymatischen Abbau von Rest PCR-Primer, sowie die Dephosphorylierung von dNTPs im Anschluss an die Polymerasekettenreaktion. Das Enzym rSAP entstammt einem *Pichia pastoris*-Stamm, welcher das alkalische Phosphatase-Gen der Garnelenart *Pandalus borealis* trägt. Exonuclease I hingegen wird aus *Escherichia coli*-Stämmen gewonnen, die ein zusätzliches Gen-Konstrukt tragen, welches für Exonuklease I von *E. coli* codiert. Dem PCR Produkt wurden 7,5 µL entnommen und in separate Eppendorfgefäße pipettiert. Anschließend wurden je 1,5 µL Exo I und 1,5 µL rSAP zugegeben und der Ansatz nach kurzem Vortexen für 5 Minuten bei 37 °C inkubiert. Danach folgte eine 10-minütige Inaktivierung bei 80 °C. Im Anschluss erfolgte eine erneute Konzentrationsmessung mittels Nanodrop. Die Verfahrensweise ist dem bereits beschriebenen Ablauf der Messung gleichzusetzten (s.o.).

#### 4.10 Sequenzierung

Die Sequenzierung des gereinigten PCR Produkts erfolgte extern über die Firma Eurofins Genomics. Hierfür wurden die Proben entsprechend der Firmenvorgaben vorbereitet. Von jedem Produkt wurden 15 µL in separate safe-lock Tubes pipettiert. Die Konzentration wurde vorher auf 2 ng/µL für 150-300 bp (Basenpaare) und 5 ng/µL für 300-1000 bp lange Produkte mit RNase-freiem Wasser eingestellt. Die zugehörigen antisense und sense Primer wurden der Lieferung beigelegt. Hier waren 15 µL für die erste, plus jeweils 5 µL für jede weitere Probe, bei einer Konzentration von 10 pmol/mL nötig. Für ein optimales Ergebnis gelten folgende Primerspezifikationen: die Primer sollten keine Phosphorylierungen oder Fluoreszenzfarbstoffe enthalten, eine optimale Primerlänge liegt zwischen 16 bis 25 Basen, die Primer Schmelztemperatur (T<sub>m</sub>) sollte in einem Intervall zwischen 50-62 °C liegen, der GC-Gehalt der Primer sollte 35-60 % betragen, im Idealfall sollte sich ein G oder C am 3'-Primerende befinden, die Anzahl der 3' Gs oder Cs sollte 2 nicht überschreiten und wenn möglich sollten über 3 aufeinanderfolgende identische Basen vermieden werden. Im sogenannten Value Read

wurden die Sequenzierungen erstellt und anschließend online auf der firmeneigenen Plattform bereitgestellt.

#### 4.11 Auswertung der Sequenzierungen

Die Auswertung und Bewertung der Sequenzierungsergebnisse erfolgte mittels APE- und ChromasLite Software. In APE wurden die Sequenzen mit der Ursequenz in sense und antisense verglichen und Fehler in der Basenfolge ermittelt. Diese mussten, wie alle Ergebnisse sowohl in sense, als auch in antisense vorliegen, um aussagekräftig zu sein. Außerdem wurden anhand der Daten die genaue intronische, sowie exonische Position innerhalb der Sequenz von ASC-1 bestimmt. Im nächsten Schritt wurden mit Hilfe von ChromasLite die Sequenzen chromatographisch visualisiert. Hier wurde besonderes Augenmerk auf das Vorhandensein von Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNP) gelegt, sowie in APE ermittelte, unstimmgige Basenfolgen kontrolliert. Die Gesamtheit der Ergebnisse wurde tabellarisch erfasst.

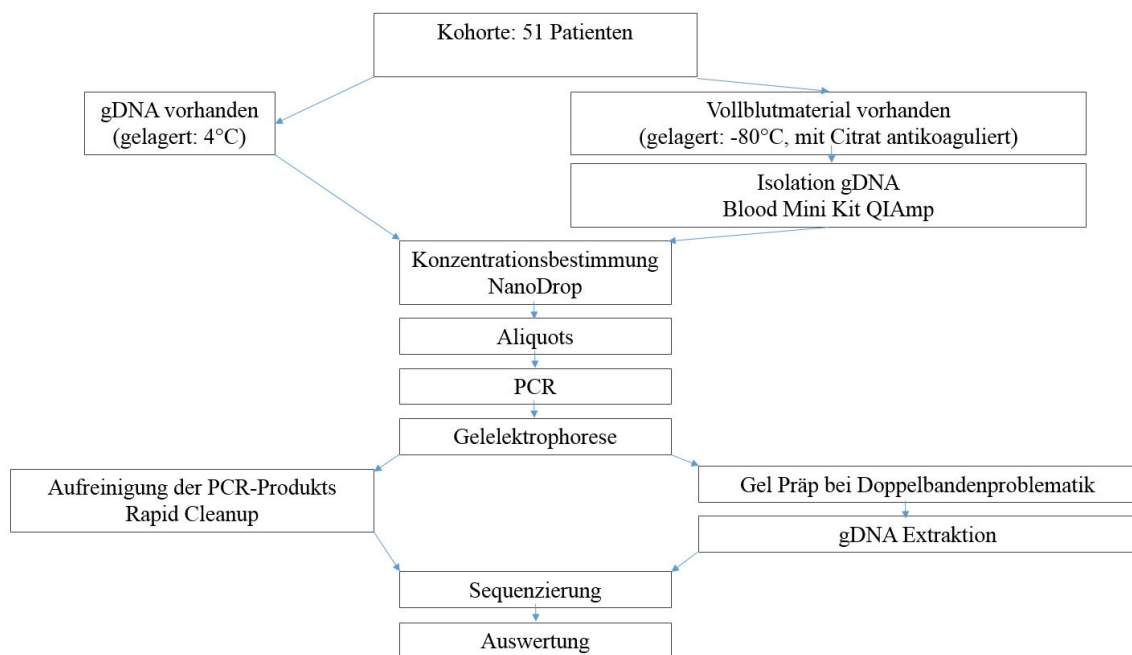


Abbildung 11: Flipchart - methodischer Ablauf der Versuchsreihe Teil 1

#### 4.12 Plasmid Amplifikation

Basierend auf den gewonnenen Sequenzierergebnissen, wurden die Versuche im Bezug auf die identifizierte missense Mutation G307R in ASC-1 weiter ausgebaut. Von Professor Robert Harvey von der UCL School of Pharmacy in London wurde die humane cDNA des Transporters ASC-1 zur Verfügung gestellt. Auf der Grundlage dieses Plasmids konnte anschließend mit dem Einbau der Punktmutation und Herstellung des Klons begonnen werden.

#### 4.13 Synthese der Ausgangsfragmente mittels PCR-Mutagenese

Ausgangspunkt für die Durchführung einer Elongation durch Überlappung, sind zwei zuvor synthetisierte PCR-Fragmente die sich in einer Region von 21-30 Basenpaaren überlappen. In diesem Überlappungsbereich befindet sich jeweils die inserierte Punktmutation G307R. Hierfür wurden die Primer PSal I + P-antisense (Kombination 1), sowie PNot I + P-sense (Kombination 2) verwendet. Die äußeren parentalen Primer PSal I und PNot I enthielten die Sequenz für die Restriktionsendonukleasen Sal I und Not I, welche im Anschluss für die Klonierung des mutierten PCR Produkts benutzt werden sollten. Die Primer P-antisense und P-sense enthielten die Sequenz, die die Mutation G307R einführt (vgl. Abb. 13). Für einen 50 µL PCR Ansatz wurden jeweils 1 µL Plasmid DNA Wildtyp (100 ng/µL) = Plasmid ASC-1, 4 µL Primerkombination 1 oder 2 zu gleichen Anteilen (je 5 pmol/µL), 1 µL dNTPs (10 mM), 2 µL Pfu-Polymerase, 5 µL Pfu Puffer 10x und 37 µL RNA freies Wasser eingesetzt. Für die anschließende PCR wurde ein Standardprogramm genutzt. Die einzelnen Parameter sind der nachfolgenden Tabelle zu entnehmen (vgl. Abb 12).

	Temperatur	Zeit	
Initiale Denaturierung	95°C	5 min	} 28x
• Denaturierung	95°C	30sec	
• Annealing	58°C	60sec	
• Elongation	72°C	2 min	
Finale Elongation	72°C	10min	

Abbildung 12: PCR Standardprogramm für Klonierung



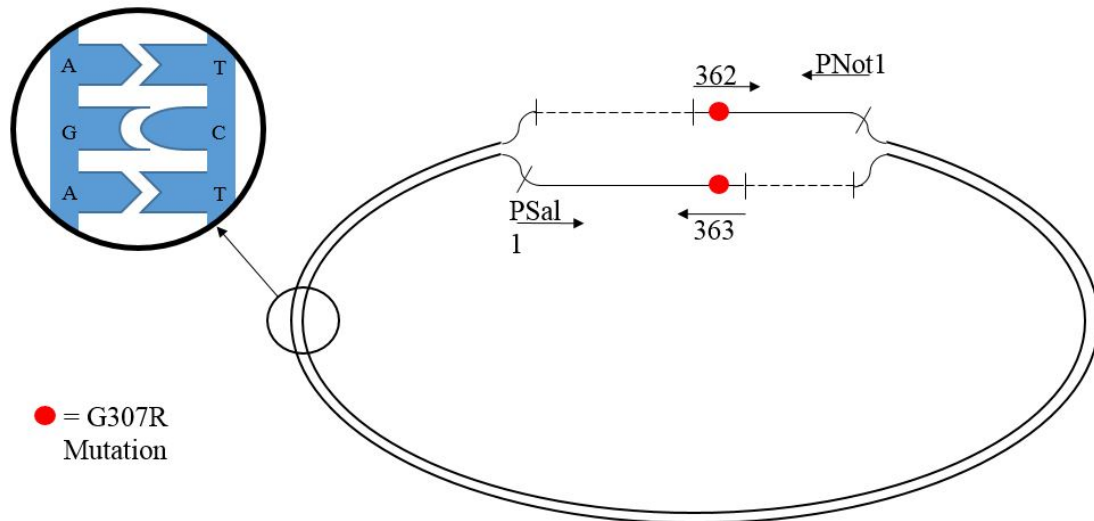


Abbildung 13: Schematische Darstellung der Synthese der Ausgangskonstrukte. Die inserierte Punktmutation G307R ist in den Mutagenese Primern 362 und 363 (vgl. Tab. 3, Seite 71) im Überlappungsbereich enthalten. Diese beiden Primer verhalten sich komplementär zueinander. Die flankierenden Primer SalI und NotI enthalten die Sequenzen für die in der weiteren Klonierung genutzten Restriktionsendonukleasen.

#### 4.14 Overlap Extension PCR

In der darauffolgenden PCR wurden innerhalb des ersten Zyklus die PCR-Fragmente aus der 1. PCR vereinigt und anschließend durch die Pfu-Polymerase zum Doppelstrang ergänzt. Während der beiden Zyklen fanden jeweils 3 Teilschritte statt. Nach Aufheizen des Blocks wurden die Tubes in einem Zyklus 5 Minuten bei 95 °C initial denaturiert, dann folgten 5 Minuten Annealing bei 54 °C und letztendlich 15 Minuten Elongation bei 72 °C. Für einen 100 µl Ansatz wurden 2 µL Pfu-Polymerase, jeweils 5 µL Fragment 1 und 2, 10 µL Pfu Puffer, 2 µL dNTPs 10 mM und 72 µL RNase freies Wasser eingesetzt. Nach diesen 2 Vorzyklen wurden die flankierenden Primer PSalI und PNotI zu jeweils 2 µL (5 pmol/µl) ergänzt und anschließend das bereits erwähnte PCR Standardprogramm für 28 weitere Zyklen ohne initiale Denaturierung gefahren (vgl. Abb. 14).

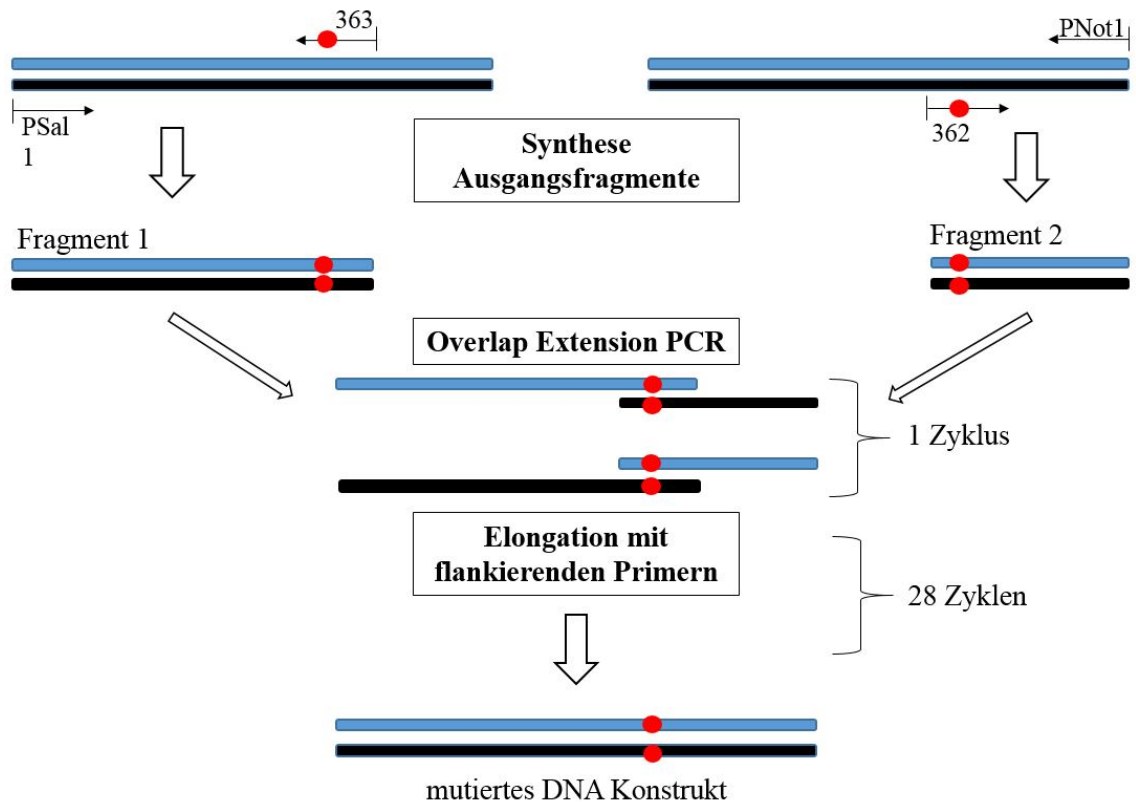


Abbildung 14: Fließschema zum Ablauf der Overlap Extension PCR mit Einbau von G307R. Der erste Schritt ist die Synthese der mutierten Ausgangsfragmente die innerhalb von 2 Zyklen der Overlap-PCR miteinander hybridisiert werden. Nach Zugabe der flankierenden Primer SalI und NotI wurden die mutierten Hybride in der fortlaufenden PCR mit komplementären Basen vervollständigt.

#### 4.15 Restriktionsverdau

Im Zuge des Restriktionsverdaus wurde in 2 unterschiedlichen Ansätzen, das durch die Overlap Extension PCR gewonnene mutierte DNA Konstrukt (Insert), sowie der Wildtyp Plasmidvektor mittels zweier Restriktionsenzyme verdaut. Bei den hierfür verwendeten Enzymen handelt es sich um Sal I und Not I der Firma New England Biolabs. Diese erzeugen durch den Verdau sequenzspezifische überhängende Enden am Insert und Vektor. Durch Spaltung der Phosphorsäurediesterbindungen entstehen sogenannte "sticky ends", die eine spätere Integration des Inserts in den geschnittenen Vektor ermöglicht. Für den Verdau des Inserts wurden 11 µL PCR Produkt (mutiertes DNA Konstrukt aus 3.14), 1,5 µL 3.1 NEB Puffer 10x, 1,5 µL BSA 10x, 0,5 µL Sal I, 0,5 µL Not I (insgesamt 15 µL) eingesetzt. Für den Verdau des Vektors wurden 1 µL Wildtyp Plasmidvektor, 6 µL RNA freies Wasser, 1 µL 3.1 NEB Puffer 10x, 1 µL BSA

10x, 0,5  $\mu\text{L}$  Sal I und 0,5  $\mu\text{L}$  Not I verwendet (insgesamt 10  $\mu\text{L}$ ). Beide Ansätze wurden anschließend eine Stunde bei 37 °C inkubiert.

#### **4.16 Gel-Extraktion Insert und Vektor**

Die Gel-Extraktion der beiden separat verdauten Komponenten erfolgte wie bereits unter 3.8 beschrieben anhand des gleichen Protokolls. Die Banden für die Extraktion wurden hier ebenfalls blind geschnitten, um eine Schädigung der Sequenzen durch UV-Licht auszuschließen. Zur Kontrolle wurden die Eluate nochmals nach abgeschlossener Extraktion durch Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

#### **4.17 Ligation**

Die Ligation beschreibt den letzten Schritt der Klonierung der G307R Mutation. Hier wird eine kovalente Verbindung der Fragmentenden mit dem Einsatz einer T4 DNA-Ligase wiederhergestellt. Diese katalysiert die Bildung von Phosphorsäurediesterbindungen und verknüpft somit die kongruenten Nukleotide dauerhaft miteinander. Dadurch wird das Insert chemisch an das Vektorgerüst gebunden (vgl. Abb. 15). Das genetisch veränderte Plasmid kann in kompetente Bakterienzellen überführt und vermehrt werden. Aufgrund der hohen Konzentration des Vektors im Vergleich zum Insert wurde hier ein Verhältnis von 1:15 Vektor:Insert gewählt. Für den Ansatz von 10  $\mu\text{L}$  wurden 0,5  $\mu\text{L}$  verdauter Vektor, 7,5  $\mu\text{L}$  verdautes G307R Insert, 1  $\mu\text{L}$  T4 Puffer 10x, sowie 1  $\mu\text{L}$  T4 DNA-Ligase verwendet. Die Ansätze wurden über Nacht bei 16 °C inkubiert und anschließend 5  $\mu\text{L}$  des Ligationsansatzes direkt für die Transformation eingesetzt.

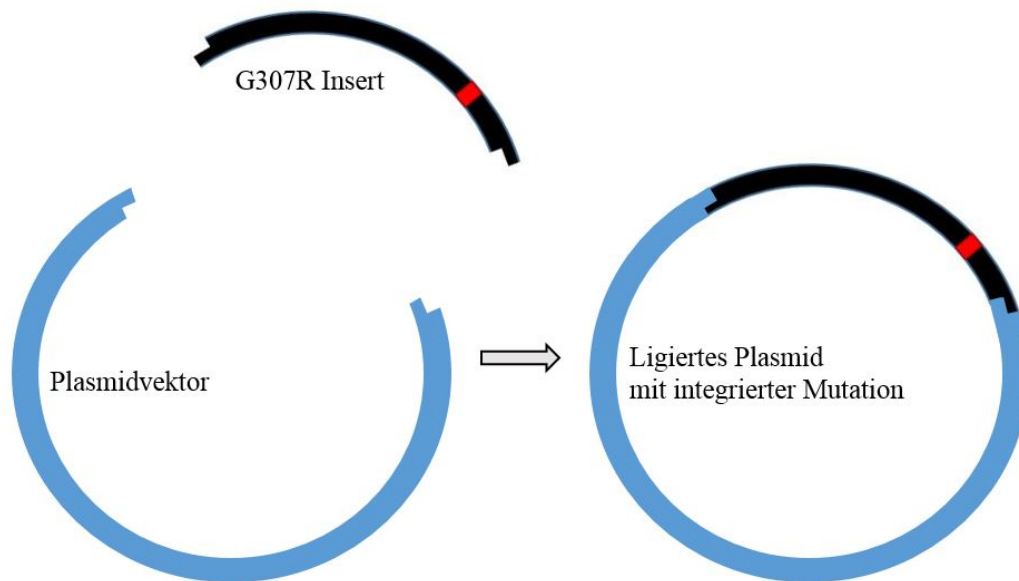


Abbildung 15: Schematische Darstellung des Ligationsverfahrens. Das in der Overlap-PCR hergestellte mutierte Insert (mit G307R), sowie ein ASC-1 Wildtyp Plasmid wurden mit *Sall* und *NotI* einem Restriktionsverdau unterzogen, um kongruente Überhänge, sogenannte "sticky ends" zu erzeugen. Durch den Einsatz von T4-Ligase, konnte durch die anschließende Ligation das G307R Insert kovalent mit dem Vektor verbunden werden.

#### 4.18 Transformation

Ziel der Transformation ist es, die genetisch veränderten Plasmide in die Wirtsbakterien einzuschleusen und anschließend zu kolonisieren. Hierfür wurden chemisch kompetente NEB5 $\alpha$  Bakterien vom *Escherichia coli*-Stamm verwendet. Diese wurden 10 Minuten auf Eis aufgetaut und anschließend 5  $\mu$ L Ligationsansatz mit 50  $\mu$ L kompetenten Zellen vermengt und invertiert. Nach 30-minütiger Lagerung auf Eis folgte ein kurzer Hitzeschock im 42 °C warmen Wasserbad für 45 Sekunden. Hierdurch wurden die G307R Plasmide, welche vorher an der Zelloberfläche adhäreren, aktiv in die Bakterienzelle aufgenommen. Nach wiederum zwei minütiger Kühlung auf Eis wurden die Zellen mit jeweils 200  $\mu$ L vorgewärmten (50 °C) SOC outgrowth Medium versetzt und anschließend im Thermomixer bei 37 °C Inkubationstemperatur für eine Stunde mit 450 rpm regeneriert. Daraufhin wurden jeweils 200  $\mu$ L der Lösung auf antibiotikahaltige (Ampicillin) Agarplatten in semisteriler Umgebung ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nach erfolgter Vermehrung wurden 12 Klone entnommen und in separate Eppendorfgefäße gegeben.

#### 4.19 Plasmid Präparation

Die einzelnen Schritte zur Isolation des Plasmids aus den jeweiligen *E. coli* Bakterien sind der Bedienungsanleitung des Plasmid DNA Reinigungskits NucleoSpin Plasmid (NoLid) von Macherey-Nagel zu entnehmen. Die einzelnen Schritte umfassen die Zelllyse, die Trennung gelöster Plasmide von ausgefällten Proteinen, die Bindung der Plasmid-DNA an die Membran, anschließendes Waschen und Eluieren. Der Elutionspuffer wird auf 70 °C vorgewärmt, 2 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert und die Probe nach Zentrifugation ein 2. Mal aufgetragen, sowie die Inkubation und Zentrifugation wiederholt, um die Endkonzentration an Plasmid DNA zu erhöhen. Um eine genaue Kontrolle der Klone vor der Sequenzierung zu gewährleisten, wurden die 12 Eluate anschließend verdaut und per Gelelektrophorese unter UV-Licht gesichtet. Hierfür wurden jeweils 3 µL des Eluates, 1 µL BSA 10x, 1 µL 3.1 NEB Puffer, 0,2 µL Sal I, 0,2 µL Not I und 4,6 µL RNase freies Wasser vereint und für eine Stunde bei 37 °C inkubiert. Die Kontrolle nach der Agarose-Gelelektrophorese zeigte, dass 3 Proben das gewünschte Insert enthielten. Die Eluatkonzentrationen dieser drei Produkte wurden mittels Nanodrop bestimmt und die Konzentrationen anhand der Firmenvorgaben von Eurofins Genomics mit RNase freiem Wasser eingestellt. Hierfür wurden jeweils 15µl Eluat bei einer Konzentration von 100 ng/µL plus 40 µL des zugehörigen Primers mit 10 pmol/µL versandt.

#### 4.20 Transfektion

Um letztendlich Aufschlüsse über eventuelle Funktionsbeeinträchtigungen oder verminderte Expressionsraten des mutierten ASC-1 Transporters zu erhalten, wurden die ligierten Plasmide, welche die Mutation G307R enthielten, als auch die Wildtyp Plasmide, in HEK-293 Zellen transient transfiziert. Bei HEK-293 Zellen handelt es sich um menschliche embryonale Nierenzellen. Die Aufzucht fand unter Standard-Wachstumsbedingungen (37 °C und 5 % CO<sub>2</sub>) statt. Hierfür wurden die HEK293 Zellen in MEM (Eagle's Minimal Essential Medium) mit 10 %igem fötalen Kälberserum, 200 mM GlutaMax, 100 mM Natrium-Pyruvat und 50 U/mL Penicillin/Streptomycin versetzt. Anschließend erfolgte die Transfektion der Zellen durch Calciumphosphatpräzipitation, durch Aufbringen eines Gemisches aus Plasmid DNA G307R oder Wildtyp Plasmid, CaCl<sub>2</sub> 2,5 M, und 2x HBS Puffer (50 mM HEPES, 12 mM Glucose, 10 mM KCl, 280 mM NaCl, 1,5 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>) und 0,1x TE Puffer.

#### **4.21 Biotinylierung**

Ziel der Biotinylierung ist es, durch eine oberflächliche, kovalente Bindung von Biotin, an den exprimierten ASC-1 Transporter (separat G307R oder WT), die Oberflächenexpression in den HEK293 Zellen mittels Westernblot darzustellen. Dies geschieht unter der Ausnutzung einer Biotin-Streptavidin Wechselwirkung. Die Zellen wurden hierfür auf 10 cm Kulturschalen aufgebracht und 48 Stunden nach der Transfektion, nach Entfernung des Mediums mit PBS (4 °C, GE Healthcare, Freiburg, Deutschland) in 3 Durchgängen gewaschen. Zur Markierung der Oberflächenproteine (ASC-1 G307R oder ASC-1 WT) folgte eine 30 minütige Inkubation mit 1 mg/mL EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce Biotechnologies, Rockford, IL, USA) und daraufhin eine 10 minütige Inkubation mit einem Quenching Puffer (192 mM Glycin, 25 mM Tris in PBS, pH 8.0). Über Zentrifugation für 10 Minuten bei 1000 x g nach Zugabe von PBS Puffer (4 °C) wurden die Zellen gelöst. Anschließend erfolgte die Zelllyse durch Beimengen von TBS (Tris- buffered saline) mit 1 % Triton-X100 und Protease-Inhibitoren (Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland) und Zentrifugation für 1 Minute bei 13000 x g. Von dieser Fraktion wurde ein Aliquot entnommen, welches der Gesamt-Protein Fraktion der Probe entspricht. Der Überstand musste im nächsten Schritt mit 50 µL Streptavidin-Agarose (Pierce Biotechnologies, Rockford, IL, USA) versetzt werden und für 2 h unter Rotation bei 4 °C inkubieren. Nach Zentrifugation wird der Überstand als intrazellulärer Pool aufgehoben und entspricht den verbleibenden intrazellulären Proteinen, die nicht biotinyliert und damit auch nicht an die Streptavidin Beads binden können. Nach dem 3-fachen Waschen der Agarose Beads mit TBS Puffer wurden die an die Beads gebundenen biotinylierten Oberflächenproteine bei 95 °C, für 5 Minuten, unter Zugabe von 50 µL 2x SDS Puffer eluiert. 40 µL des Eluats dienen der Analyse mittels Westernblot.

#### **4.22 Analyse des gesamten Zell Lysates**

Unter Standard Wachstumsbedingungen wurden HEK293 Zellen mit ASC-1 G307R oder ASC-1 WT transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion wurden die Zellen 5 Minuten mit CytoBuster Protein Extraktions-Reagenz (Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland) und Protease Inhibitor bei Raumtemperatur inkubiert. Nach der Zentrifugation für 5 min bei 16000 x g und 4 °C entsteht das Gesamtzelllysat der jeweiligen Probe. Für die anschließende SDS-PAGE Gelelektrophorese sind 11 %-ige

Polyacrylamid-Gele hergestellt worden. Der Westernblot erfolgte dann mit einer Nitrozellulose Membran (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland), die zunächst 1 h mit 5 % BSA und TBS-T (TBS mit 1 % Tween 20) geblockt wurden. Die Inkubation mit spezifischen primären ASC-1 Antikörpern über Nacht bei 4 °C ermöglicht die abschließende Detektion der jeweiligen ASC-1 Transporter (G307R oder WT) mittels ECL-System (GE Healthcare, Freiburg, Deutschland).

#### **4.23 Immunzytochemische Färbung**

Immunzytochemische Färbungen werden durch Co-Transfektion von HEK293 Zellen mit ASC-1 G307R oder ASC-1 WT und dem Fusionsprotein pDsRed-Monomer-Mem erreicht. Dieses setzt sich aus Neuromodulin (GAP-43) und einem roten Fluoreszenzprotein zusammen. Für die Oberflächenfärbung von ASC-1 G307R und ASC-1 WT auf nicht-permeabilisierten HEK293 Zellen wurde der primäre Antikörper (rabbit-anti SLC7A10, ab122751, Abcam, Cambridge, UK) 1h bei 4 °C (1:500 im Medium) verwendet, um native Epitope zu kennzeichnen. Für eine weitere Detektion der Gesamtzellexpression von ASC-1 wurden nach Fixation mit 4 % Paraformaldehyd und 4 % Saccharose die HEK293 Zellen permeabilisiert (PBS, 5 % Ziegen Serum und 0.1 % Triton-X100). Anschließend markiert der primäre Antikörper (verdünnt 1:500 in PBS und 5 % Ziegen Serum) die denaturierten Epitope. Nach 3-maligem Waschen der Zellen mit PBS konnte final der zweite Antikörper (Ziege-anti-Kaninchen-Alexa488, 1:500) für 30 Minuten appliziert werden. Um den Zellkern anzufärben, folgte die Einbettung der Zellen in Mowiol mit DAPI (1:20000). Für die Übersichtsaufnahmen wurden HEK293 Zellen (ASC-1 G307R, sowie ASC-1 WT) mit GFP co-transfiziert und die immunzytochemische Oberflächenfärbung mit Anwendung von Ziege-anti-Kaninchen-Cy3 Antikörper durchgeführt.

#### **4.24 Glycintransport Assay**

HEK293 Zellen wurden im 96-well Format ausgesät und transfiziert. Die 96-well Platte wurde zuvor mit Gelatine beschichtet, um eine bessere Adhäsion der Zellen zu gewährleisten. 48 Stunden nach der Transfektion wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen und mit radioaktiv markiertem Glycin, in verschiedenen Konzentrationen (10, 25, 50, 100, 200, 500, 750, 1000 nM), versetzt. Der Glycintransport fand für 30

Minuten bei Raumtemperatur statt. Danach wurde die Reaktion durch Abnahme der Glycinlösung gestoppt und die Zellen wieder dreimal in PBS gewaschen. Die Zellyse erfolgte mit eiskaltem Wasser für 10 Minuten bei Raumtemperatur. Anschließend wurden die Zellen durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren abgelöst und aus den lysierten Zellen die Menge an aufgenommenem, markiertem Glycin im Szintillationscounter (Beckman) ermittelt. Die quantitative Auswertung erfolgte nach Rückrechnung auf die eingesetzte Proteinmenge pro Probe. Alle Messungen wurden in 4 unabhängigen Experimenten und in jeweils Triplikaten durchgeführt.

## 5 Ergebnisse

Die Auswertungen der experimentell und diagnostisch erhobenen Daten ergaben eine Reihe von Punkt-Mutationen unterschiedlicher Häufigkeit, innerhalb der Basensequenzen unserer Kohorte. Diese erstrecken sich vom 5'UTR Sequenzbereich, über intronische und exonische Bereiche, bis hin zum 3'UTR Bereich der Sequenz von ASC-1 (vgl. Abb. 16). In den meisten Fällen handelt es sich um Substitutionen, bei denen eine Base durch eine andere ersetzt wird ohne die Proteinsequenz zu verändern. Hauptaugenmerk liegt hier auf der Punktmutation c.919G>A in Exon 7. Diese ist verantwortlich für eine missense Mutation G370R. Durch ein verändertes Codon wird während der Translation Arginin anstelle von Glycin in das Transporter-Protein eingebaut.

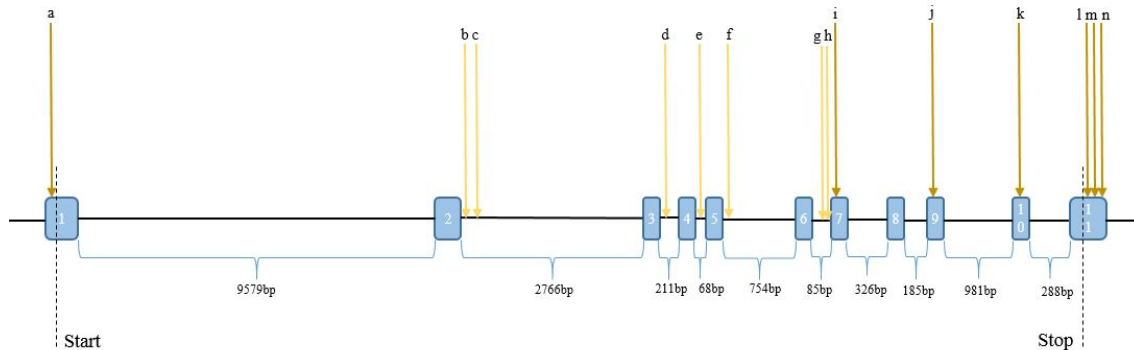


	Patienten-Nr.	Lokalisation	Nomenklatur	Mutationsart	Protein Mutation	Häufigkeit
a	129-3	Signalpeptid 5'UTR	c.-23C>A	Substitution		1 zu 50
b	10-3, 29-3, 39-3, 116-3, 142-3, 175-3	Intron 2	c.356+138G>C	Substitution		6 zu 45
c	119-3	Intron 2	c.356+162C>G	Substitution		1 zu 50
d	common SNP	Intron 3	c.508+51T>C	Substitution		37 zu 14
e		Intron 4	c.634+48C>G	Substitution		8 zu 43
f	common SNP	Intron 5	c.788+95G>A	Substitution		39 zu 12
g	102-3, 108-3, 42-3, 158-3, 159-3, 176-3	Intron 6	c.913-25T>C	Substitution splice site		10 zu 41
h	common SNP	Intron 6	c.913-11T>C	Substitution splice site		35 zu 16
i	147-3	Exon 7	c.919G>A	<b>Substitution missense</b>	G307R	1 zu 50
j	10-3, 99-3	Exon 9	c.1158G>A	Substitution silent	T386T	2 zu 49
k	109-3, 115-3, 116-3	Exon 10	c.1374G>T	Substitution silent	T458T	3 zu 48
l	common SNP	3'UTR	c.*131_132insT	Insertion Frameshift		36 zu 9 zu 6
m	32-3, 58-3, 158-3	3'UTR	c.*188C>T	Substitution		3 zu 48
n	common SNP	3'UTR	c.*262T>C	Substitution		39 zu 12

Abbildung 16: Zusammenfassung der gescreenten Mutationen in ASC-1. Zugeordnet werden konnten 14 unterschiedliche sequenzielle Alterationen, von denen es sich beim Großteil um Substitution handelt. 3 exonische Abweichungen der Wildtyp Basenfrequenz von ASC-1 wurden ermittelt, wobei es sich für Exon 7 um eine codierende Mutation (G307R) handelt. An Stelle von Glycin wird bei der Translation des Proteins die wesentlich größere und positiv geladene Aminosäure Arginin in die Proteinsequenz integriert.

Insgesamt ließen sich 14 unterschiedliche Mutationen innerhalb von ASC-1 beschreiben. Die nachfolgende Grafik (vgl. Abb. 17) verdeutlicht schematisch die Relation der Gesamtsequenz zu den codierenden exonischen Bereichen. Die blauen nummerierten Bereiche stellen die Exone, die schwarzen Verbindungslinien die

jeweiligen intronischen Sequenzen dar. Die alphabetisch markierten Pfeile geben in diesem Fall die Lokalisation der Mutation an und entsprechen der vorherigen tabellarischen Reihenfolge.



*Abbildung 17: Schematische Darstellung der Lokalisation der einzelnen Mutationen; blaue Bereiche stellen exonische Sequenzen dar (nummeriert von 1-11 entsprechend der Exone), schwarze Verbindungslinien markieren intronische Sequenzen innerhalb der humanen ASC-1 Basenfolge; die Länge der Bausteine ist annähernd proportional dargestellt. Es ergeben sich sequenzielle Alterationen im Bereich 5'UTR (a), intronisch (b, c, d, e, f, g, h) exonisch (i (codierend für G307R), j, k) und im 3'UTR Bereich (l, m, n).*

Chromatografisch zeigt sich ein Austausch von Guanin gegen Adenin in sense, sowie Cytosin gegen Thymidin in antisense Richtung bei Exon 7 (vgl. Abb. 18). Funktionell lassen sich an dieser Stelle noch keine Rückschlüsse ziehen. Der Austausch der neutralen Aminosäure Glycin gegen die basische Aminosäure Arginin kann jedoch die Funktion des Transporters durch die veränderte Proteinstruktur von ASC-1 beeinträchtigen. Die Seitenkette des basischen Arginins ist wesentlich größer und besitzt einen hydrophilen Charakter.

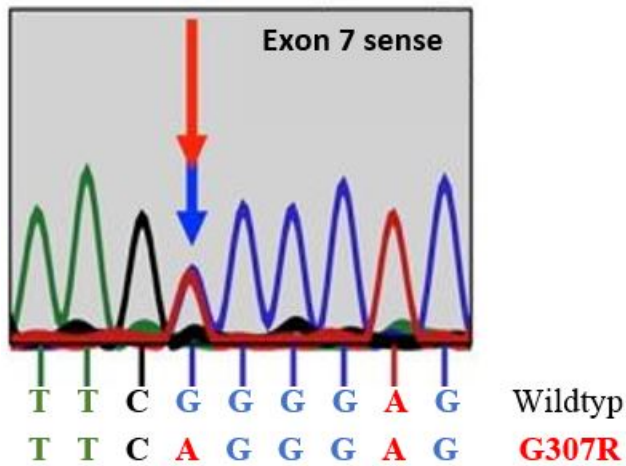


Abbildung 18: Chromatographische Darstellung der mutierten Sequenz mit G307R. Zu sehen ist die sense Punktmutation c.919G>A für G307R im Vergleich zum Wildtyp

Die Punktmutation ist auf Proteinebene in einer intrazellulären Schleife zwischen den Transmembrandomänen 7 und 8 lokalisiert (vgl. Abb. 19). Dies unterstützt zusätzlich die Hypothese möglicher fehlerhafter Interaktionen und daraus resultierender beeinträchtigter Funktionalität des ASC-1 Transporters.

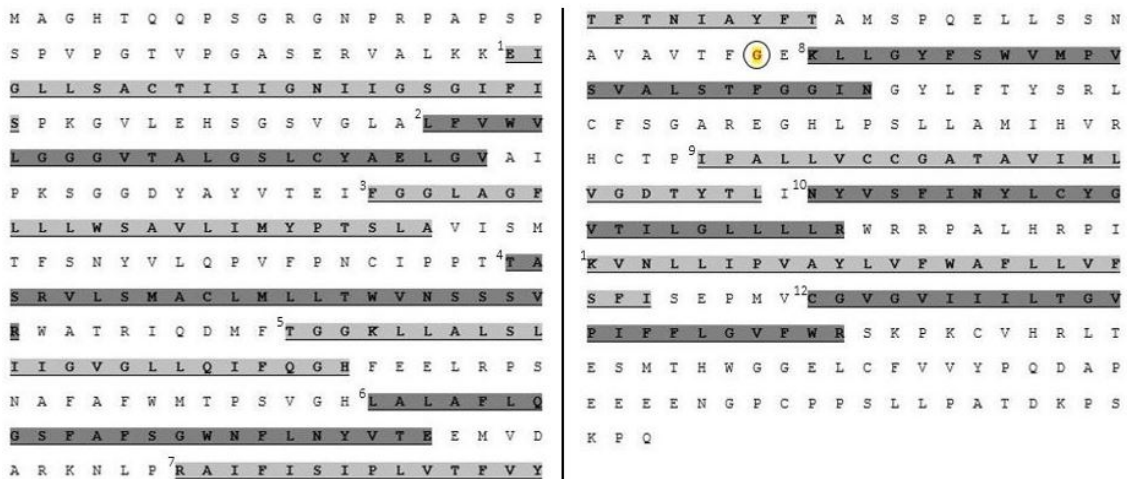
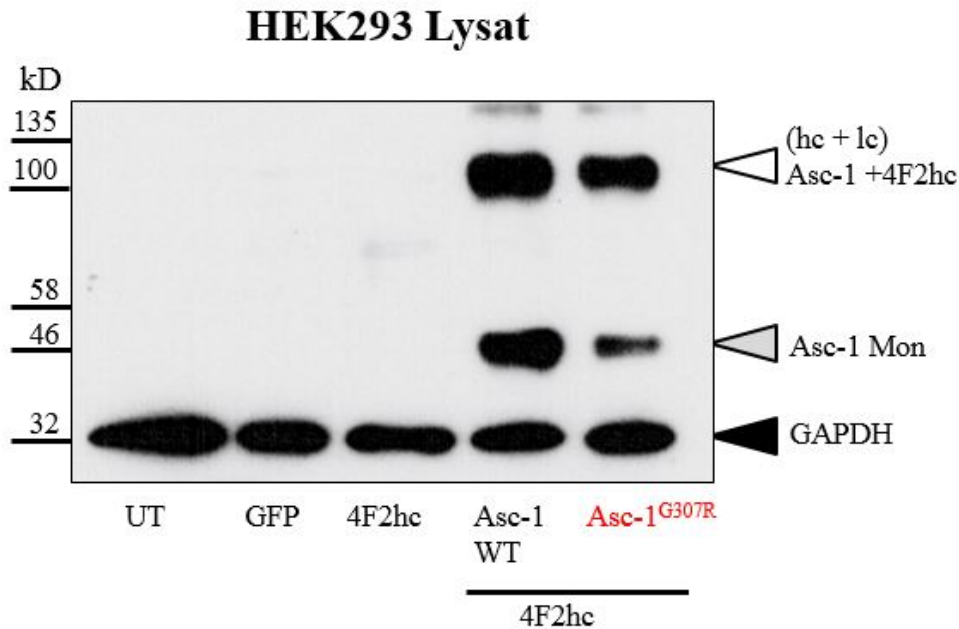


Abbildung 19: Proteinsequenz von ASC-1, hell- und dunkelgraue Markierungen kennzeichnen die jeweiligen Transmembrandomänen (nummeriert 1-12), bei der eingekreisten, gelb hinterlegten Aminosäure handelt es sich um die Lokalisation der Mutation G307R.

Im Rahmen der Expressionsanalyse des Gesamtzellproteins von mutiertem ASC-1 Transporter zeigte sich zunächst eine leichte Reduktion des mutierten ASC-1 Transporters im Vergleich zum Wildtyp (vgl. Abb 20).



*Abbildung 20: Gesamtzellexpression von ASC-1. HEK293 Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit ASC-1 (Mutante oder Wildtyp) und 4F2hc transfiziert. 48 Stunden nach Transfektion und Westernblot des Zell-Lysats auf 11 %igen Polyacrylamid Gelen, ASC-1 Monomere bei <50 kDa und ASC-1+4F2hc bei >100 kDa im Vergleich vom Wildtyp und G307R Mutante. Durchführung Sinem Milanos.*

Durch anschließende immunzytochemische Färbung wurde diese Beobachtung verifiziert. Auch hier konnte bei der Darstellung des Gesamtzellproteins eine reduzierte Expression des mutierten ASC-1 Transporters beobachtet werden. Im Gegensatz dazu zeigten sich bei den an der Oberfläche exprimierten ASC-1 Transportern zwischen Wildtyp und G307R keine Unterschiede. Die Kolokalisationen von ASC-1 (WT oder G307R) mit dem Membranmarker pdsRed-Monomer MEM zeigen ähnliche Intensitäten, bei nicht-permeabilisierten HEK293 Zellen (vgl. Abb. 21).

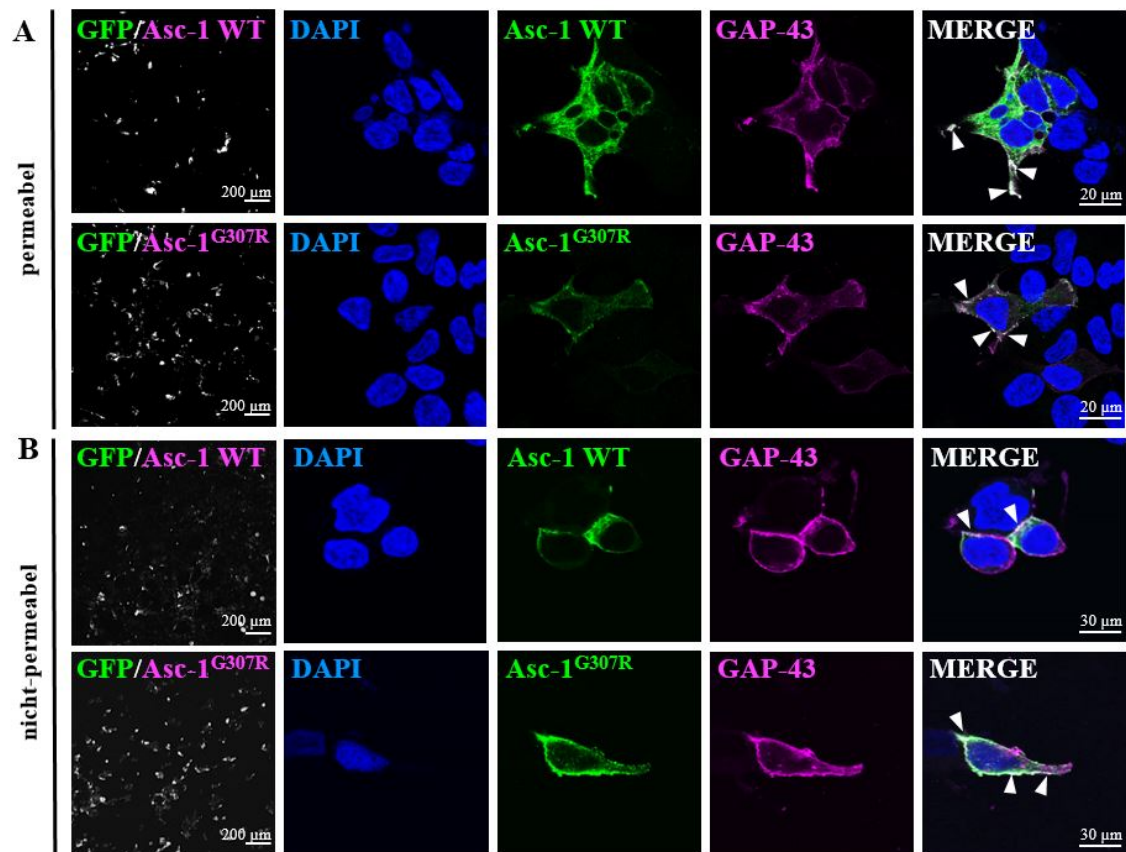


Abbildung 21: Spalte 1 – Übersichtsbilder von ASC-1 (WT und G307R) nach Co-Transfektion mit GFP, Spalte 2-5 – Immuncytochemische Färbung cotransfizierter HEK293 Zellen mit ASC-1 und dem Fusionsprotein aus dsRed und dem Plasmamembran Marker GAP-43 (pink). Vergleich der Oberflächenexpression von ASC-1 Wildtyp und ASC-1 G307R (grün) in nicht-permeabilisierten HEK293 Zellen, sowie die Gesamtzellexpression in permeabilisierten Zellen. DAPI wurde verwendet, um den Zellkern anzufärben (blau). MERGE Bilder: Überlagerung der Signale. Protokoll nach Sinem Milanos.

Die bisher identifizierte Reduktion des mutierten ASC-1 Transporters sollte nun quantitativ überprüft werden. Dazu wurden Biotinylierungsexperimente durchgeführt, die eine Diskriminierung zwischen Gesamtzellprotein und Oberflächenprotein erlauben. Wie bereits bei den immuncytochemischen Färbungen beobachtet, ergab die Quantifizierung des mutierten ASC-1 Transporters keine signifikanten Unterschiede im Oberflächenpool des exprimierten Transporters (vgl. Abb. 22, unten rechts). In der Gesamtzellfraktion zeigte sich eine signifikante Reduktion des monomeren ASC-1 Transporters G307R um 50 % im Vergleich zum Wildtyp. Die Quantifizierung der Proteinbande für den dimeren Komplex aus ASC-1 Transporter und akzessorischen

schweren Kette 4F2hc ergab eine Verminderung auf ca. 75 % gegenüber der Wildtyp-Variante (vgl. Abb. 22). Die beim Patienten identifizierte Mutation G307R scheint demnach keinen Einfluss auf die Expression des Transporters zu besitzen, zumindest nicht im mit Überexpression arbeitenden benutzten Zellkultursystem.

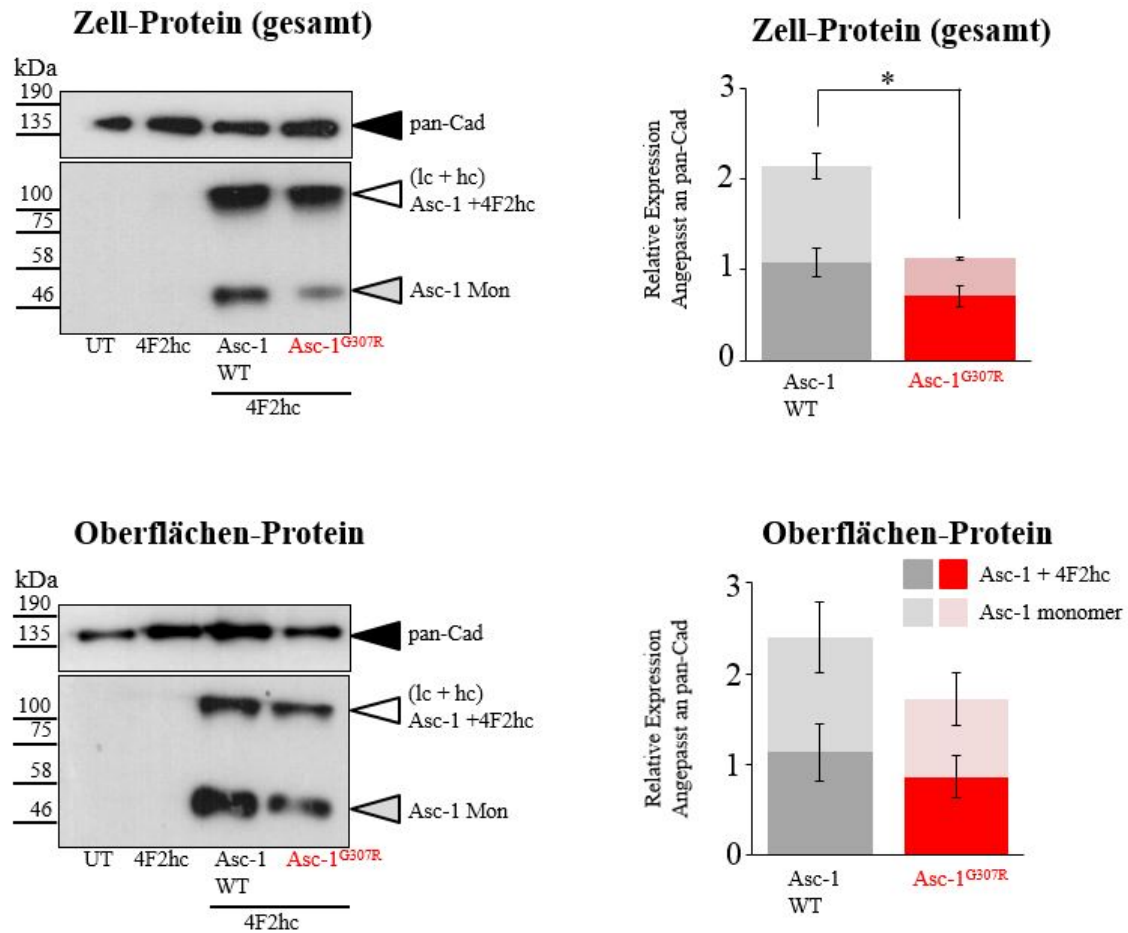


Abbildung 22: Vergleich von Oberflächenexprimierung und Gesamt-Zelllysate der ASC-1 Transporterproteine. Transfizierte HEK293 Zellen mit ASC-1 Wildtyp oder ASC-1 G307R Transporter wurden aus Gesamtprotein Fraktionen und Oberflächenprotein Fraktionen aufgetragen und mit einem spezifischen Antikörper angefärbt. ASC-1 Monomere (ASC-1 Mon) und Dimere mit 4F2hc (ASC-1+4F2hc) wurden quantifiziert, im Vergleich zu Pan-Cadherin, einem Standardprotein welches in Membranen von Zellen exprimiert ist. Die relative Expressionsraten zeigen eine ca. 25 %ige verminderte Expression von ASC-1 G307R+4F2hc im gesamten Zell-Lysat im Vergleich zum Wildtyp, Signifikanzlevel  $*p < 0.05$ , sowie weniger exprimierte ASC-1 G307R Transporter an der Zelloberfläche. Letztere war jedoch innerhalb von 4 miteinander verglichenen Experimenten nicht signifikant. Versuchsreihe von Sinem Milanos.

Als abschliessendes Experiment erfolgte die funktionelle Untersuchung des mutierten ASC-1 Transporters. Hierbei zeigten sich massive Beeinträchtigungen in der Transportrate für Glycin im Vergleich zum Wildtyp-Protein. Die Effektivität des Glycintransportes liegt im Vergleich zum Wildtyp ASC-1 Transporter bei lediglich 5 %, welches einem Totalausfall mit weitreichenden Konsequenzen gleich kommt (vgl. Abb. 23). Kontrolle waren hier Zellen, die nur mit der akzessorischen Untereinheit 4F2hc transfiziert wurden. Diese Untereinheit ist nicht in der Lage Glycin zu transportieren. Der mutierte Transporter G307R verhält sich ähnlich (vgl. Abb. 23, rechts).

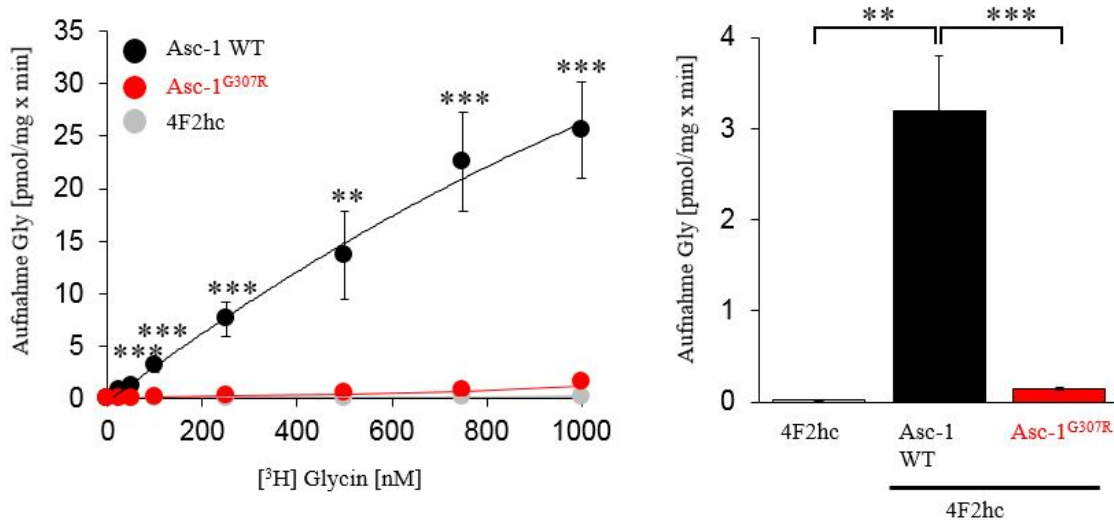


Abbildung 23: Funktionelle Analyse der Glycintransportraten von ASC-1. Verglichen werden exprimierte Transporter des ASC-1 Wildtyps (schwarz), ASC-1 G307R (rot), sowie 4F2hc (grau) als Kontrollgruppe aus transfizierten HEK293 Zellen. Verwendet wurden Glycinkonzentration von Tritium markierten Glycin von 10, 25, 50, 100, 250, 500, 750 und 1000 nM. Der Glycintransport wurde nach 30 Minuten gestoppt, die Zellen lysiert und die intrazelluläre Glycinaufnahme bestimmt. Gezeigt wird ein massiver Einbruch der Transportrate bei ASC-1 G307R mit einer Effektivität unter 5 %, Signifikanzlevel  $***p < 0.001$ .

Der ASC-1 Transporter kann durch Zugabe von 4 mM Isoleucin in seinem Transport für Glycin blockiert werden. Diese Blockierung wurde mit einer 70 %igen Reduktion in der Glycintransportrate quantifiziert. Diese Beobachtungen blieben bei ASC-1 G307R, dessen Transportrate faktisch gegen Null geht, ohne Signifikanz (vgl. Abb. 24).

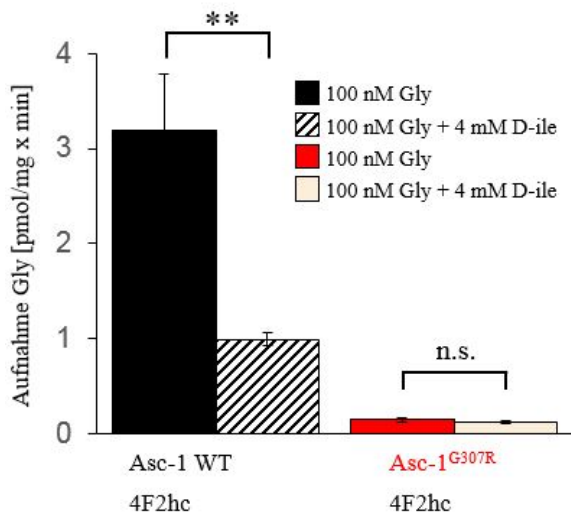


Abbildung 24: Vergleich des Einflusses von inhibitorischem Isoleucin auf ASC-1. Isoleucin wirkt als Coagonist mit hoher Affinität an Aminosäuretransportern. Der Einsatz von 4 mM Isoleucin (schwarz schraffiert) erzeugt eine deutliche Verringerung (ca. 70 %) der Transportrate von Glycin bei Wildtyp ASC-1 (schwarz), Signifikanzlevel  $**p < 0.01$ . Der Einsatz von 4 mM Isoleucin (beige) bei ASC-1 G307R (rot) hingegen ist nicht signifikant im Bezug auf die Glycinaufnahme.

## 6 Diskussion

### 6.1 Zusammenfassung der Hauptergebnisse

Bei an Hyperekplexie erkrankten Patienten, bei denen bekannte genetische Faktoren nicht die Ursache für die Ausprägung der Erkrankung war, untersuchten wir die Präsenz von Alterationen in der Basensequenz von ASC-1. Neben diesem Kriterium sollten weiterhin die typischen Symptome wie: exzessive Schreckreaktionen auf unerwartete akustische und taktile Stimuli, episodische Muskelsteifheit korrelierend mit Apnoe, sowie posturalem Kontrollverlust, bei den betroffenen Probanden gegeben sein. Die Proben der Patienten wurden über Jahre aus verschiedenen medizinischen Einrichtungen zusammengetragen und in einer Kohorte von 51 Patienten geschlossen analysiert. Die Untersuchung bestätigte letztendlich die Präsenz zahlreicher Polymorphismen innerhalb von *SLC7A10* – dem genetischen Abschnitt von ASC-1. Bei einem Patienten der Kohorte konnte unter den verzeichneten Alterationen eine codierende Punktmutation eruiert werden. Diese war durch ihre strategisch wichtige Lage innerhalb des Transporters und die starke strukturelle Differenz der nach



Translation umgesetzten Aminosäure als potentiell funktionsbeeinträchtigend zu werten. Die durchgeführte Biotinylierung, sowie Analysen des Zell-Lysates zeigten zudem eine verminderte Translation, die sich jedoch nicht signifikant in der Oberflächenexpression äußerte. Weiterführende funktionelle Untersuchungen bestätigten jedoch, dass die Mutation G307R für einen nahezu vollständigen funktionellen Ausfall des ASC-1 Transporters verantwortlich ist und somit als potentielle neue Ursache für humane Hyperekplexie angesehen werden kann.

## **6.2 Diskussion der Methoden**

### **6.2.1 Einsatz von Silikat-Membranen**

Bei der Isolation genomischer DNA aus tiefgefrorenen antikoagulierten Vollblutproben einiger unserer Probanden, setzten wir auf bewährte Protokolle, unter Einsatz eines Kits mit Silica-Membran Säulen. Die Lagerung der Proben erfolgte bei -80 °C unter Antikoagulation mit Citrat, um einerseits eine Langlebigkeit des Materials zu gewährleisten, als auch die spätere DNA Extraktion nicht zu behindern. EDTA wäre ebenfalls als Antikoagulant denkbar gewesen, heparinisiertes Vollblut hingegen stellt sich als schwierig in der späteren Verarbeitung dar. Der Verdau der RNA vor anschließender Isolation der gDNA und Aufreinigung ist ein wichtiger Schritt im Gesamtprozedere, da unverdaute RNA Reste an die Membranen der Reinigungssäulen binden und das Eluat letztendlich verunreinigen können. Dies kann gegebenenfalls vor und nach dem Verdau stichprobenartig durch eine Gelelektrophorese überprüft werden. Die Silica-Membran Technik ist derer anderer Kits mit Filtersystemen, Fällungstechniken, Dialyse, oder DNA bindenden Magnetkügelchen sicherlich ebenbürtig. Vorteil des Verfahrens ist die einfache Handhabung, keine Entsorgungsvorschriften, da ohne gesundheitsgefährdende Stoffe gearbeitet wird, sowie das geringe Zeitinvestment. Außerdem werden gegenüber konventionellen Reinigungsmethoden, PCR-Inhibitoren, wie divalente Kationen und Proteine, vollständig in zwei effizienten Waschschrinen entfernt. Reine Nukleinsäure kann dann in einem Puffer eluiert werden. Hier hat sich bewährt, den Elutionspuffer auf 50 °C vorzuwärmen und die Inkubationszeit auf 2 Minuten zu verlängern. Zusätzlich wurde der Schritt unter Einsatz des Eluats 2-mal durchgeführt, um eine höchstmögliche Konzentration der gDNA zu erhalten. Da viele Proben gleichzeitig eluiert werden, fallen die einzelnen Inkubationszeiten relativ unterschiedlich aus und sind deshalb auch

wenig reproduzierbar. Bei kleineren Ansätzen wären die Zeitspannen folglich weniger groß gewesen. Dies hatte im Endeffekt jedoch keine negativen Auswirkungen.

## **6.2.2 Diskussion von Modifikationsmöglichkeiten der Polymerase-Kettenreaktion**

Um die isolierten genomischen DNA Fragmente zu amplifizieren wurde eine über die Jahrzehnte zur Analyse etablierte Technik – die Standard Polymerase-Kettenreaktion (PCR) genutzt [67]. Diese besteht im Einzelnen aus 3 aufeinanderfolgenden Schritten in mehreren Zyklen. Das typische PCR Programm beinhaltet einen Denaturierungs-, einen Annealing- und einen Elongationsschritt. Die Auftrennung der Template-DNA erfolgt hier in einer initialen Denaturierung bei 95 °C in 5 Minuten und geht dann in die zyklische Denaturierung bei 94 °C für 15 Sekunden über.

### **6.2.2.1 Denaturierung**

Sinnvoll ist es die Denaturierung so kurz wie möglich zu halten, da die Komponenten des Ansatzes Schaden nehmen. Primer und Template-DNA werden depuriniert, Polymerase denaturiert und die Nukleotide zerfallen. Außerdem beginnt die eigentliche Denaturierung bereits ab 70 °C, welches bei der Dauer des Prozesses berücksichtigt werden sollte. Hier sind sicherlich PCR-Geräte im Vorteil, die die Temperatur im Tube berechnen oder besser noch direkt bestimmen können. Bei uns hat sich das Prinzip des "cold starts" bewährt. Um zu vermeiden, dass zusätzliche Banden zum PCR Produkt gebildet werden, werden die Komponenten bei der Erstellung des Mastermixes, als auch die Aliquots konsequent auf Eis gestellt. Außerdem heizen wir das PCR Gerät auf 95 °C Arbeitstemperatur vor, sodass die initiale Denaturierung unmittelbar beginnt, was wiederum das Zeitintervall des Prozesses verkürzt. Dies ist eine ebenfalls sehr gut funktionierende Methode und günstige Alternative zum "hot start". Bei diesem werden ebenfalls durch die anfänglich niedrigen Temperaturen unerwünschte Effekte, wie Fehlhybridisierungen der Primer oder Primerbindungen vermieden. Hierfür werden wichtige Komponenten erst bei Arbeitstemperatur hinzugefügt. Neuerungen zeigen sich im Einsatz von Wachstrennschichten die durch Schmelzen und Erstarren auf der Oberfläche des Mastermixes, welcher die empfindlichen Komponenten nicht enthält, aufgebracht werden [70]. Auf diese Trennschicht werden Polymerase und Nukleotide aufpipettiert, welche dann erst nach Erreichen einer gewissen Temperatur im PCR

Gerät, durch auflösen des Wachses mit dem restlichen Ansatz in Berührung kommen. Weitere bekannte Möglichkeiten sind Polymerase-Antikörper, reversibel Polymerase inaktivierende Oligonukleotide [71], die sich ab bestimmten Temperaturen deaktivieren, als auch in Wachs eingeschmolzene Polymerasen. Diese Methoden sind jedoch aufwendiger und teurer und bieten keine signifikant besseren Ergebnisse als die Durchführung des "cold starts".

### 6.2.2.2 Annealing

Der sicherlich anfälligste Schritt während der PCR ist die Feinjustierung der Annealing Temperatur, als auch das Design der sense und antisense Primer. Dazu sollten folgende Parameter weitestgehend umgesetzt werden: mindestens 18, maximal 30 Basenpaare, Schmelztemperaturen zwischen 65 °C und 75 °C mit maximal 5 °C Unterschied – diese kann über Erhöhung des GC Gehalts der Sequenz, durch Verlängerung zum Beispiel reguliert werden, Der GC Gehalt des Primers sollte jedoch zwischen 40 % und 60 % liegen und die Sequenz vorzugsweise auf G oder C enden. Mehr als 3 Basenwiederholungen und Primer übergreifende Homologien sind zu vermeiden. Wie bereits erwähnt spielt ebenfalls die richtige Annealing Temperatur eine wichtige Rolle. Zur Errechnung dienen etablierte Gleichungen, wobei laut Literatur die von Rychlik *et al.* (1990) veröffentlichte Formel die derzeitig präziseste ist [72]. Eine hundertprozentige Genauigkeit oder Sicherheit gibt es jedoch nicht. Vereinfacht wurden diese Ermittlungen durch den Einsatz von Online-Kalkulatoren, die die vorhandenen Sequenzen der Primer matchen und verschiedene Temperaturen errechnen. Die "nearest neighbor" Temperatur ist hier Mittel der Wahl, da Interaktionen benachbarter Basen in Bezug auf die Schmelztemperatur mit einbezogen werden. Da diese Temperaturen angeben, wann ein Primer zu 50 % nicht mehr bindet, werden folglich 5-10 °C niedrigere Temperaturen angesetzt, um eine Hybridisierung zu gewährleisten. Sicherster Weg ist die letztendliche Ermittlung der Annealing Temperatur über eine Gradienten-PCR, bei der in verschiedenen einstellbaren Temperaturabstufungen die PCR gefahren wird und sich am Ende über Gelelektrophorese ermitteln lässt, bei welcher Temperatur die Primer am besten gebunden haben. Nachteilig ist, dass dafür spezielle PCR-Maschinen notwendig sind und ausreichend DNA vorhanden sein muss, um für jedes Exon erneut die Temperatur zu kalibrieren.

### 6.2.2.3 Elongation

Im Elongationsschritt werden die Einzelstrang-Primer-Hybride durch den Einsatz einer geeigneten Polymerase zu vollständigen Doppelsträngen komplettiert. Wir haben uns gezielt für den Einsatz einer modifizierten Polymerase (hyperthermophiler *Pyrococcus* Stamm kloniert in *E. coli*) mit Korrekturaktivität (HotStar HighFidelity Qiagen) entschieden, um bei der sensiblen Suche nach Mutationen, die Anfälligkeit für Fehler möglichst gering zu halten. Die gleiche Prozessrate im Gegensatz zur konventionellen Taq Polymerase wird jedoch nicht erreicht, welches sich in der längeren Synthesedauer widerspiegelt. Dies ist jedoch aufgrund der geringeren Fehlerquote nicht als nachteilig zu werten. Ein weiterer Vorteil der HotStar Polymerase ist die eingestellte Inaktivität der chemisch gekoppelten Polymerase und Exonuklease. Diese werden während der initialen Denaturierung aktiviert und garantieren intakte Primer, Templates und saubere Ergebnisse. Die Verwendung der im Kit abgestimmten Komponenten minimieren zusätzliche Fehlerquellen. Anders als bei Einzelkomponenten, sind hier im Puffer die MgSO<sub>4</sub>-, dNTP- und Faktor SB-Konzentration optimal aufeinander abgestimmt. SB-Faktor trägt zusätzlich zum Schutz der Templates bei und Q-Solution, welche ebenfalls im Kit enthalten ist, erhöht die Suffizienz der Ergebnisse unter schwierigen PCR-Verhältnissen (hoher Grad an Sekundärstrukturen oder GC-Gehalt). Der Einsatz festgelegter Komponentenkonzentrationen kann sicherlich, muss aber nicht immer von Vorteil sein. Die PCR an sich ist ein relativ einfacher Prozess bei dem jedoch durch viele Stellschrauben nie konstante Ergebnisse generiert werden können. Möglich wäre aber hier die MgSO<sub>4</sub> Konzentration, welche auf die Trennung der Stränge bei Denaturierung, Primer Annealing, Produktspezifität, Primerdimerbildung und die Fehlerrate Einfluss nimmt, zu justieren. Die Zyklenzahl lässt sich ebenfalls variieren. Ab einer bestimmten Menge synthetisierten Produkts stellt sich ein Plateaueffekt ein, bei dem die Vermehrungsrate abnimmt. Dies äußert sich in vermehrter Bildung falscher Produkte, welches zu unspezifischen Banden oder Schmierern bei der Gelelektrophorese führt. Das vom Hersteller empfohlene Intervall liegt zwischen 30 und 45 Zyklen. Wir haben uns aufgrund der relativ kurzen Produkte für 40 Zyklen entschieden. Retrospektiv betrachtet wären hier aber bei bestimmten Exonen, welche nur in Kombination sequenzierbar waren, kürzere Zyklen denkbar, vielleicht sogar effizienter gewesen.

#### 6.2.2.4 Alternativen und Ausblick

Aufgrund der weltweit angewandten PCR Technik, gibt es auf diesem Gebiet natürlich zahlreiche Forschungsarbeiten und dementsprechend auch Modifizierungen und Neuentwicklungen. Eine von Vincent *et al.* (2004) veröffentlichte Arbeit zeigt eine ganz neue Art der Amplifikation und umgeht die Anwendung von Thermocyclern und Hitze zur Spaltung von DNA [73]. Die ist natürlich ein Vorteil im Bezug auf die Stabilität von Primern und Template. Bei diesem Verfahren handelt es sich um eine Helikase abhängige Amplifikation, bei der mittels einzelstrangbindenden Proteinen und DNA-Helikasen der Doppelstrang entwunden und aufgetrennt wird. Entsprechende am Markt etablierte Kits (NEB IsoAmp® II Universal tHDA Kit) nutzen hierfür Temperaturen von ca 65 °C. Nachteilig ist das benötigte Primerdesign. Deren Länge mit ca. 25 Basenpaaren zusammen ungefähr die Hälfte der angegebenen Produktlänge ausmacht [73, 74]. Dean *et al.* (2002) und Detter *et al.* (2002) publizierten eine weitere Technik – die isothermale multiple Verschiebungs-Amplifikation (isothermal multiple displacement amplification) [75, 76]. Im Gegensatz zu PCR-Verfahren werden hier die DNA Doppelstränge bei Raumtemperatur denaturiert. Etablierte Kits nutzen hierfür Alkalien (Qiagen REPLI-g Amplification). Außerdem wird lediglich eine konstante Temperatur von ca. 30 °C benötigt, um die PCR durchzuführen. Dies ermöglicht eine besonders schonende Trennung der DNA, wodurch sehr lange Fragmente mit sehr niedriger Fehlerrate amplifizierbar sind. Die Dauer des Verfahrens ist hingegen deutlich erhöht. Zeiten zwischen 18 und 24 Stunden werden angegeben [77]. Eine weitere isothermale Methode wurde von Gibson *et al.* (2009) etabliert. Hier werden vorab durch einen Verdau von Exonukleasen Überhänge der zu hybridisierenden DNA erzeugt. Bei temperaturkonstanten 65 °C erfolgt der Zusammenbau mittels strangtrennender DNA-Polymerasen [78]. Vorteile sind hier wiederum die Möglichkeit der Amplifizierung sehr langer Fragmente und eine sehr geringe Verzerrung. Weitere bekannte Alternativen sind: Mehrfach Verschiebungs-Amplifikation [79], Rekombinase Polymerase Amplifikation [80], Schleifen-modulierte isothermale Amplifikation (LAMP) [81], Nukleinsäuresequenz-basierte Amplifikation (NASBA) [82]. Dies macht deutlich, dass sicherlich jede Technik Vor- und Nachteile gegenüber einer anderen hat. Für uns hat sich die Verwendung der Standard PCR als sehr erfolgreich und zuverlässig dargestellt. Zumal die zu amplifizierenden Fragmente eine Länge von 1 kb nicht überschreiten.

## **6.2.3 Feinjustierung der Gelelektrophorese**

### **6.2.3.1 Agarosen**

Die Durchführung einer Gelelektrophorese, sollte den Erfolg der PCR anschließend verifizieren. Hierfür wurden Standardagarosen verwendet, die bei möglichen Konzentrationen von 0,5 - 2 % einen Fragment Größenbereich von 0,2 – 20 kb abdecken. Standardagarosen haben den Vorteil, dass sie preisgünstig sind und sich im Laboralltag unkompliziert und universell anwenden lassen. Für die Auflösung kleinerer Fragmente könnte man alternativ speziell entwickelte Sieb-Agarosen verwenden. Diese lösen im Bereich von 10 bis 1000 bp auf, sind aber in ihrer Handhabung komplizierter, da hier höhere Konzentrationen um die 4 % benötigt werden. Dies macht die Gele mechanisch wesentlich instabiler. Auch die Kosten sind höher gegenüber Standardagarosen. Eine weitere aber ebenfalls kostenintensivere Alternative bieten niedrig-schmelzende Agarosen (LMP-Agarose). Diese bieten im Hinblick auf eine geplante DNA Extraktion gewisse Vorteile. Zum einen ist die Schmelztemperatur mit 65 °C niedriger, als die von Standardagarosen und liegt damit unterhalb der Denaturierungstemperatur der DNA. Dies vermeidet Schäden am zu extrahierenden Produkt. Zum anderen liegt die Geliertemperatur niedriger, als die von Restriktionsenzymen benötigte Inkubationstemperatur, welches einen Verdau der DNA ohne vorherige Aufreinigung möglich macht.

### **6.2.3.2 Puffer**

Die von uns präferierten Puffer zur Herstellung der Gele sind TAE und TBE. Für die Überprüfung der PCR-Resultate werden zumeist TBE Puffer verwendet. Diese sind belastbarer und ermöglichen schnelle Gelelektrophoresen. Für möglicherweise folgende DNA Präparationen, bei vorhandenen Doppelbanden, sind sie andererseits weniger gut geeignet, da diese Puffer mit den Aufreinigungsmitteln interferieren und die Ausbeute negativ beeinflussen. Hierfür werden Gele mit TAE Puffer verwendet. Diese lassen sich jedoch lediglich bei niedrigeren Spannungen nutzen, da sie geringere Pufferkapazitäten besitzen. TTE (Tris-Taurin-EDTA) Puffer verbinden beide Vorteile, da sie zum einen eine DNA-Präparation erlauben und TBE ähnliche Pufferkapazitäten besitzen. Meistens finden diese jedoch Einsatz bei der Verwendung von Polyacrylamidgelen. Die Nutzung der TBE und TAE Puffer lieferte aufgrund der Verfahrenskette dennoch sehr zuverlässige Ergebnisse.

### *Färbemittel*

Um die DNA Fragmente anzufärben, verwenden wir MidoriGreen. Hierfür wird der Farbstoff in aufgekochte, auf ca. 60 °C abgekühlte Agaroselösung pipettiert und geschwenkt. Im Gegensatz zur Standardfärbung des Gels mit Ethidiumbromid wird dadurch eine Kontamination des Arbeitsplatzes vermieden. Eine aufwendige Entsorgung entfällt. Nach der Durchführung von Knochenmarks Tests an Mäusen (mouse bone marrow micronucleus tests) und dem Ames-Test ist MidoriGreen von der Firma NIPPON Genetics Europe GmbH als nicht kanzerogen eingestuft worden und weist eine deutlich geringere Mutagenität auf als Ethidiumbromid [83]. Dies ist ein entscheidender Vorteil, der bei gleicher Sensitivität erzielt wird. Die Kosten für MidoriGreen sind jedoch um den Faktor 500 höher als die von Ethidiumbromid. Der Kosten-Nutzen Faktor ist hier sicherlich für jedes Labor abzuwägen. Weitere alternative Färbemittel bewegen sich in ähnlichen Preissegmenten.

#### **6.2.3.3 Effektive Nutzspannung**

Wie bereits beschrieben wurden Doppelbanden beziehungsweise PCR-Ergebnisse mit Nebenprodukten nochmals in TAE-Gelen mit größeren Ladetaschen einer Elektrophorese unterzogen. Als Referenz dienten eine Probe, bei der die Bande gewünschter Größe eindeutig verifizierbar war, sowie ein Größenmarker (pRK7Hinf) in einer separaten Tasche. Im Nachhinein war die angelegte Spannung von 145 Volt geringfügig zu hoch eingestellt. TAE Ladepuffer sind aufgrund ihrer Pufferkapazität bis max. 5 V/cm belastbar. Bei einem Elektrodenabstand von ca. 25 cm ergibt sich eine maximale Nutzspannung von 125 V. Hingegen der Empfehlung konnten die Gele jedoch ihre Stabilität erhalten, wodurch die Abwandlung nicht negativ auffiel.

#### **6.2.4 Kompensation von UV-Licht produzierten Schäden**

Unter einem Belichtungsgerät folgte die anschließende Separation der gewünschten Bande. Der Kontakt von DNA und UV-Licht führt unweigerlich zu Strangbrüchen, Depurinierungen, Bildung von Basendimeren und Mutationen, welches bei anschließender Sequenzierung eine besondere Tragweite hätte. Durch den Einsatz der Referenzprobe, konnte deren Bande separat unter UV-Licht ausgeschnitten werden. Dies ermöglichte ein blindes Ausschneiden der zu verifizierenden Banden für die

spätere Analyse, nach Reponierung des Gels. Hierdurch wird die schädliche Wirkung der Strahlung umgangen. Nachteilig ist, dass sich eine visuelle Begutachtung erübrigt, ob die Elektrophorese erfolgreich war und die Bande exakt separiert wurde. Alternativ könnte man spezielle TAE Puffer verwenden, welche einen speziellen UV Schutz beinhalten. Dafür braucht man jedoch extrem starke Banden, da dieser Zusatz ebenfalls UV-absorbiert und die Fragmente verblasst. DNA könnte ebenfalls mit Kristallviolett gefärbt werden. Dies ermöglicht die Extraktion unter normalen Lichtverhältnissen. Die sinnvollste Lösung wäre der Einsatz eines speziellen LED Transilluminators (NIPPON Genetics Europe), der es möglich macht, MidoriGreen aber auch andere Färbemittelalternativen, als auch Ethidiumbromid mit speziellen blauen beziehungsweise blau/grünen Ioden sichtbar zu machen.

#### **6.2.5 DNA Extraktion**

Für die Extraktion der DNA aus dem Gel verwenden wir das PCR clean-up Gel extraction Kit von Macherey-Nagel. Dieses nutzt ebenfalls eine Silikat-Membran Technik zur Isolation. Spezielle Puffer lösen das Gel bei 50 °C unter ständiger Kontrolle und Vibration schonend auf. Die vorher beschriebene Problematik, dass Standardagarosen erst bei Temperaturen von ca. 90 °C schmelzen ergibt sich somit nicht. Dennoch sollte darauf geachtet werden, dass die Lösungen so kurz wie nötig erhitzt werden, um Schäden an den DNA Produkten zu minimieren. Das Binden der DNA an die Membranen, sowie die Reinigung erfolgte nach Herstellerprotokoll. Der Elutionspuffer wurde, wie schon bei der Isolation der DNA aus Vollblut vorab auf 70 °C erwärmt, um alle Fragmente bei extendierter Inkubationszeit von 2 Minuten effizient von der Membran zu lösen. Dieser Schritt wurde einmal wiederholt. Für Isolationen gibt es eine ganze Reihe bewährter Kits auf dem Markt, welche mit verschiedenen Membranen, Techniken, Puffern und Zusätzen immer Vor- und Nachteile gegenüber anderen Verfahren mit sich bringen. Für die Fragmentgrößen der für ASC-1 zu sequenzierenden Abschnitte hat dieses Kit stabile und saubere Ergebnisse geliefert, wodurch eine Alternative nicht diskutiert werden musste.



### **6.2.6 Reinigung der Produkte**

Um die PCR-Produkte direkt für die Sequenzierung nutzen zu können, wurde eine von Werle *et al.* (1994) etablierte Aufreinigungsmethode angewendet. Hierzu werden die beiden Enzyme Exo I und rSAP zu gleichen Teilen mit dem Produkt bei 37 °C inkubiert und anschließend bei 80 °C inaktiviert [84]. Diese Methode steigert die Effizienz der Sequenzierung maßgeblich durch Verdau überschüssiger Primer. Vorteile sind die einfache Handhabung, die Verbesserung der Ergebnisse ohne hohen Mehraufwand und Materialverlust. Darüber hinaus ist dieses Verfahren, dem der Aufreinigung mittels Säulen, für kleine Fragmente vorzuziehen, da die Verlustraten sonst wesentlich höher wären.

### **6.2.7 Klonierung - Rolle des Vektors**

Nach erfolgreicher Evaluation einer codierenden Mutante, konnten nun über die Herstellung modifizierter Primer (G307R), die mutierten Ausgangsfragmente aus dem Wildtyp ASC-1 Plasmid synthetisiert werden. Der Einsatz von Plasmidvektoren ist relativ unkompliziert. Diese werden unabhängig von Chromosomen des Wirtsbakteriums vermehrt und beeinträchtigen somit dessen Funktionalität und Teilung nicht, sodass letztendlich große Mengen aus den Zellen isoliert werden können. Der Nachteil, dass sich Plasmide für die Klonierung großer DNA-Fragmente effektivitätsmindernd auswirkt, erübrigt sich anhand der geringen Fragmentgröße unter 5 kb. Für die Aufnahme sehr großer DNA-Abschnitte würden sich in diesem Falle Cosmide anbieten. Hierbei handelt es sich um modifizierte Plasmide, in die cos-sites aus  $\lambda$ -Phagen integriert wurden. Die Verarbeitung ähnelt der von Bakteriophagen. Aufgrund nicht vorhandener Phagene kann man Cosmide unkompliziert in Bakterien vermehren. Die Herstellung des Klons ist jedoch hochkomplex und bedarf einer gewissen Erfahrung. Ähnlich effektiv aber ebenso schwierig im Handling ist der Einsatz von P1 Artificial Chromosome (PAC) und Bacterial Artificial Chromosome (BAC). BACs basieren auf F-Faktoren von *E. coli* und sind in der Lage Fragmente bis 300 kb aufzunehmen. PACs hingegen stammen von dem temperenten Phagen P1. Diese beiden Verfahren sind letztendlich praktikablere Weiterentwicklungen der ältesten Art von Mega Klonierungsvektoren, dem Yeast Artificial Chromosome (YAC), welches von Burke *et al.* (1987) publiziert wurde [85]. Aufgrund existenter, durchführbarer

Protokolle, sowie der limitierten Fragmentlänge war die Nutzung eines Plasmidvektors im Endeffekt die richtige Entscheidung.

### **6.2.8 Klonierung - Restriktionstechnik**

Die synthetisierten Ausgangsfragmente wurden anschließend im ersten Schritt der Overlap Extension PCR an ihren Überhängen kovalent gebunden und im weiteren Verlauf, durch Zugabe von Pfu Polymerase komplettiert. Für Herstellung des finalen Plasmids, welches die mutierten Ausgangsfragmente enthält, folgte ein Restriktionsverdau und abschließende Ligation. Die Restriktion lief unter Anwendung genau aufeinander abgestimmter Komponenten (2 Restriktionsenzyme Sall und NotI (NEB), sowie NEBPuffer 3.1), sodass hier von einer hohen Effizienz ausgegangen werden konnte. Der Einsatz von 2 Restriktionsenzymen erzeugt kleine Polylinkerfragmente, die aufgrund der höheren Affinität zum Vektor die Ligation negativ beeinflussen. Deshalb musste ein Aufreinigungsschritt integriert werden, um vorbereitete Vektoren und Inserts von dem Polylinker zu trennen. Die Verwendung lediglich eines Restriktionsenzym, welches ebenfalls als Methode etabliert ist, hat sich für unser Prozedere nicht angeboten. Die Tatsache, dass dadurch 2 kompatible Enden innerhalb des Vektors, als auch am Insert entstehen erfordert ein separates CIPen (Behandlung mit calf intestine alkaline phosphatase – alkalische Phosphatase vom Kälberdarm) oder die Verwendung von SAP [86]. Zusätzlich bedarf es einer Reinigung um das Enzym zu inaktivieren, da sonst auch hier die Klonierung beeinträchtigt wäre. Dieser Mehraufwand steht letztendlich in keinem Vergleich zum Nutzen.

### **6.2.9 Klonierung - Ligation**

Sall und NotI erzeugen durch versetztes schneiden der DNA sogenannte "sticky ends" (klebrige Enden). Diese sind in vielen Fällen für die Ligation von DNA-Fragmenten besonders günstig, da die überhängenden 5'- beziehungsweise 3'-Basen zueinander komplementär sind. Die Ligation von sticky ends ist um den Faktor 1000 effektiver als die Ligation von "blunt ends" (glatten Enden) [86, 87]. Ein aus dem Bakteriophagen T4 gewonnenes Enzym ist die Grundlage für die Verbindung aufgereinigter Vektoren und Inserts. Die T4-Ligase welche zudem das absolute Standardenzym für diese Methode darstellt ist bezüglich der Pufferbedingungen unempfindlich. Außerdem

arbeitet sie effizient und schnell, sodass auch wir uns für dessen Einsatz entschieden haben. Ein weiterer Vorteil von T4-Ligase gegenüber der alternativen DNA-Ligase aus *E. coli* ist, dass sowohl klebrige, als auch glatte Enden mit ATP als Cofaktor ligiert werden können. *E. coli* Ligase besitzt hingegen eine etwas höhere Spezifität [88]. Die vom Hersteller abgestimmten Komponenten aus T4-Ligase und Puffer, garantieren aber auch hier wieder optimale Ergebnisse. Weitere limitierende Faktoren für eine erfolgreiche Ligation sind die absolute DNA Konzentration, Ligationszeit, sowie das optimale Vektoren-Insert Verhältnis [89]. Diese Parameter wurden in einer experimentellen Studie von Topcu (2000) in verschiedenen Kombinationen getestet. Die höchste Rekombinationseffizienz wurde bei einem Insert-zu-Vektor-Verhältnis von 3:1 ermittelt. Zusätzlich brachte die durchgeführte Ligation bei 4 °C für 12 Stunden den größten Erfolg [90]. Diese Werte weichen von den von uns genutzten Parametern ab. Der Vektor erschien bei der Kontrolle der Gelelektrophorese im Vergleich zum Insert wesentlich präsenter zu sein, sodass das Verhältnis zu Gunsten des Inserts auf 15:1 verschoben wurde. Die Faktoren Zeit und Temperatur wurden aus dem Protokoll des Herstellers übernommen (NEB). Alternativ zur Ligation über Nacht bei 16 °C wäre auch eine 10-minütige Ligation bei Raumtemperatur denkbar gewesen. Aus Zeitgründen wäre dies, bei gleicher Ausbeute natürlich effektiver. In Zukunft werden sicherlich weitere modifizierte Methoden auf den Markt kommen. Neuere Techniken versprechen bereits ohne den Einsatz von Restriktionsenzymen, an praktisch jeder Stelle des Vektors, Fragmente bis zur Gesamtgröße von 20 kb zu integrieren (NEBuilder HiFi DNA Assembly New England Biolabs).

### **6.3 Diskussion der Ergebnisse**

Das Screening unserer Kohorte, bezüglich sequenzieller Alterationen des ASC-1 Transporters, brachte neue Erkenntnisse über enthaltene Basenvariationen in intronischen und exonischen Bereichen des *SLC7A10* Gens. Darunter konnte eine Mutation (G307R) im Bereich eines codierenden Exons ausgemacht werden, welche die Proteinstruktur signifikant funktionell beeinträchtigt. Ein von einem niederländischen Forschungsteam durchgeführte Screening Studie mit 30 Probanden, konnte jedoch keine weiteren Ergebnisse liefern (Daten nicht gezeigt). Dies zeigt, dass die entdeckte Mutation mit einer Wahrscheinlichkeit von derzeit 1:81 als eine eher selten vorkommende Ursache in der Ausprägung hyperekplexischer Krankheitsbilder im

Vergleich zu Mutationen von GlyR Untereinheiten und GlyT2 einzuordnen ist. Limitierend auf die Aussagekraft der Wahrscheinlichkeit könnten natürlich die vorab gestellten Diagnosen, sowie die Anzahl der gescreenten Patienten sein. Bei der Hyperekplexie handelt es sich per se um ein sehr seltenes Krankheitsbild, sodass die Tatsache an sich, als auch nicht als Hyperekplexie diagnostizierte klinische Fälle, den Pool für durchführbare Screenings limitieren. Ebenfalls sind Fehldiagnosen nicht auszuschließen, welches sich negativ auf eine Wahrscheinlichkeitsaussage auswirken würde. Ebenfalls ist ein Einfluss der von uns verifizierten Mutationen innerhalb intronischer Sequenzen nicht auszuschließen. Intronische Bereiche tragen viele regulatorische Sequenzen wie z.B. im Spleißbereich zu den jeweiligen Exonen. Durch Fehlregulationen beim Spleißen könnten falsche Exonen des Transporters aneinander gespleißt werden. In Versuchen konnte gezeigt werden, dass die, durch die Mutation G307R veränderte Struktur des ASC-1 Transporters faktisch einen fast vollständigen Ausfall der Transporterleistung zur Folge hat. Safory *et al.* (2015) und Ehmsen *et al.* (2016) konnten in 2 unterschiedlichen Forschungsprojekten zeigen, dass der ASC-1 Transporter eine Schlüsselrolle in der Aufrechterhaltung des intrazellulären Glycinlevels darstellt. Bei Knock-out-Mäusen führt die Fehlfunktion von ASC-1 zu hyperekplexischen Phänotypen aufgrund verminderter inhibitorischer Transmission an Glycinrezeptoren [48, 91]. Safory *et al.* (2015) beschreiben den ASC-1 Transporter als regulatorisches Element präsynaptischer Boutons, welche im Symport L-Serin + Glycin nach intrazellulär transportieren [48]. Die Gruppe um Ehmsen *et al.* (2016) fanden hauptsächlich Lokalisationen von ASC-1 in Astroglia-Gewebe im Hirnstamm und kaudalen Hirnarealen. Sie beschreiben ASC-1 als direkten Transporter von Glycin in den synaptischen Spalt bzw. als Transporter von biosynthetischen Vorstufen von Glycin, wie L-Serin [91]. Diese beiden Erkenntnisse müssen sich, auch wenn in den Veröffentlichungen koexistente ASC-1 Transportmechanismen nicht als Möglichkeit mit einbezogen werden, nicht unbedingt ausschließen. Ferner lassen sich gut funktionierende Kreisläufe für die Modulation des Glycinhaushaltes erkennen. Rosenberg *et al.* (2013) veröffentlichten eine Forschungsarbeit welche beweist, dass ASC-1 Glycin, als auch D-Serin im Antiport mit kleinen Aminosäuren aus den neuronalen Boutons in den synaptischen Spalt freisetzt [66]. Es lassen sich also 3 Kreisläufe unterschiedlicher Gewichtung erkennen. Ein Funktionsverlust von ASC-1, wie von Safory *et al.* (2015) beschrieben, hätte verminderte intrazelluläre Glycin-Level zur Folge, wodurch Glycin als Neurotransmitter bei eingehenden Aktionspotentialen

folglich in geringerer Konzentration präsent im synaptischen Spalt wäre. Ein Knock-out von ASC-1 im Gliagewebe wie von Ehmsen *et al.* (2016) publiziert, hat sicherlich ähnliche Konsequenzen. Durch den Verlust des Auswärtstransportes von Glycin und der damit verminderten Diffusionsrate in den synaptischen Spalt wird auch hier die Präsenz dezimiert und die neuronale Inhibition gestört. Bekannt ist, dass GlyT2 für die Elimination von Glycin aus dem synaptischen Spalt essenziell ist [34]. Die Gruppe um Rosenberg *et al.* (2013) beschreibt einen direkten Transport von Glycin und D-Serin im Antiport mit Aminosäuren in den synaptischen Spalt, wodurch auch hier im Falle eines Funktionsverlustes, ein vermindertes Glycinangebot zu erwarten wäre [66]. In wie weit dieser Transport parallel zur vesikulären Transmitterfreisetzung oder gar stetig abläuft ist bis dato nicht geklärt. Grundlegend ist also, dass durch einen Funktionsverlust des ASC-1 Transporters verminderte Glycinlevel im Gehirn evoziert werden, welches als Folge auch eine verminderte Freisetzung modulierender Aminosäuren zur Folge hat. In Summe lässt sich bereits vermuten, dass die Funktionalität von ASC-1 nicht nur Auswirkungen auf Glycin Rezeptoren hat, sondern auch die Aktivität von NMDA Rezeptoren durch Ausschüttung von Coagonisten beeinflusst. Bekannte Forschungsergebnisse zeigen, dass aktivitätsabhängige Veränderungen der exzitatorischen synaptischen Wirksamkeit, wie Langzeitpotenzierung (LTP) und Langzeitdepression (LTD) wahrscheinlich zelluläre Korrelate zum Lernen und Gedächtnis sind [92-95]. Im zentralen Nervensystem wird die vorherrschende Form der exzitatorischen Übertragung durch den Neurotransmitter Glutamat und die ionotropen Glutamatrezeptoren vermittelt [96]. Während AMPA Rezeptoren eine schnelle exzitatorische Übertragung an den meisten Synapsen unterstützen, dienen N-Methyl-D-Aspartat-Rezeptoren klassisch der Induktion der Langzeitplastizität [97]. Gemäß dieser Ansicht können Veränderungen in der NMDAR-Funktion oder Expression die Induktionsschwelle für AMPAR-vermittelte Plastizität direkt beeinflussen, welches als metaplastisches Phänomen bekannt ist [98]. Im Umkehrschluss bedeutet dies, dass sich ein Funktionsverlust von ASC-1, welcher die Konzentration von NMDAR-Coagonisten limitiert, im Endeffekt in negativen Auswirkungen bei der Gehirnentwicklung, der Ausprägung eines Langzeitgedächtnisses, sowie in der Geschwindigkeit des Lernens widerspiegeln könnte. Korrelierend zu dieser These, erweist sich der Patient, welcher Träger der Mutation G307R ist, als geistig retardiert im Vergleich zu Gleichaltrigen. Darüber hinaus zeigt er Defizite bei der Aufnahme von Lerninhalten. Milde geistige Retardierung ist auch bei Patienten 2er Familien, die Träger einer Mutation im Glycin

Rezeptor sind, beschrieben worden [99]. Bei dem größten Anteil der an Hyperekplexie leidenden Patienten, mit Glycin-Rezeptor Mutationen ist dies jedoch nicht der Fall. Dies könnte als Ausnahme von der Regel gewertet werden beziehungsweise ist nicht geklärt ob die geistige Retardierung durch Ausfälle weiterer Transportmechanismen entstand, zumal eine Funktionseinschränkung des Glycin-Rezeptors auf neuronaler Ebene wenig Verbindung zur Ausprägung geistiger Retardierung zulässt. Ferner beeinflusst der ASC-1 Transporter als regulatorisches Element im neuronalen Glycinhaushalt sowohl kognitive Mechanismen über NMDA Rezeptoren, als auch inhibitorische Prozesse durch Aktivierung von Glycin-Rezeptoren (vgl. Abb. 25). Hier bewirken verminderte Glycinlevel im Gehirn, induziert durch Funktionsverlust von ASC-1, eine limitierte Inhibition auf neuronaler Ebene. Durch das Ausbleiben inhibitorischer postsynaptischer Potentiale kommt es zur erhöhten Erregbarkeit der Zelle, welches in diesem Fall die Ausbildung einer Hyperekplexie zur Folge hat. Typische Symptome wie exzessive Schreckreaktionen auf unerwartete akustische und taktile Stimuli, episodische Muskelsteifheit, einhergehend mit Apnoe, sowie dem Verlust der posturalen Kontrolle, konnten bei dem Patienten mit der Mutation G307R ebenfalls beobachtet werden.

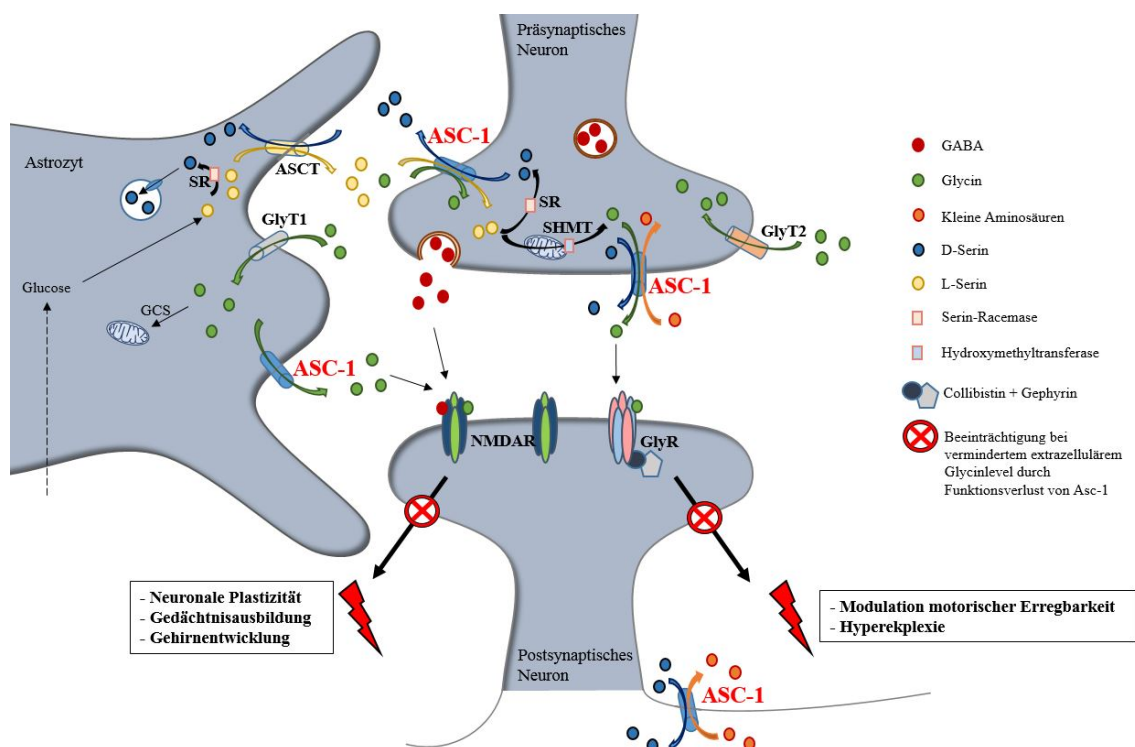


Abbildung 25: Schematische Darstellung des durch ASC-1 modulierten Glycinhaushaltes mit Auswirkungen auf NMDA und Glycin-Rezeptoren. Einbezogen werden Untersuchungen von Safory et al. (2015), Ehmsen et al. (2016) und Rosenberg et al. (2013), welche sich mit der Wirkungsweise und Funktionalität des ASC-1

*Transporters beschäftigt haben [48, 66, 91]. Die intrazelluläre neuronale Glycinkonzentration wird durch den Aminosäureshuttle zwischen Astroglia und postsynaptischen Bouton über ASC-1 bestimmt. ASC-1 schleust Glycin direkt aus astroglialen Zellen, welches nicht per Glycin-Cleavage-System (GCS) der Mitochondrien verstoffwechselt wird, ein. Des Weiteren transportiert ASC-1 Glycin und L-Serin im Antiport mit D-Serin, in die präsynaptischen Boutons, wo letztendlich auch L-Serin über Serin-Hydroxymethyltransferase (SHMT) in den Mitochondrien zu Glycin synthetisiert wird. D-Serin und Glycin werden letztendlich durch ASC-1 in den synaptischen Spalt freigesetzt und bedienen NMDA- Rezeptoren als Co-Agonisten, sowie Glycinrezeptoren direkt. Eine Störung der Funktionalität von ASC-1 hat eine verminderte Glycinkonzentration an postsynaptischen Rezeptoren zur Folge, welches einerseits für die Ausprägung von Hyperekplexie, durch ausbleibende inhibitorische postsynaptische Potentiale (IPSP), andererseits für eine verminderte Funktionalität der exzitatorischen NMDA Rezeptoren verantwortlich sein kann.*

#### **6.4 Ausblick**

Diese Forschungsarbeit soll der Grundstein für weitere Untersuchungen sein, in denen evaluiert wird, in wie weit ASC-1 für eine eingeschränkte oder verlangsamte geistige Entwicklung als Ursache in Frage kommt und welche Art der Vererbung vorliegt. Dies für die hier ermittelte Mutation zu untersuchen war aufgrund fehlender Kooperativität der betroffenen Familie nicht möglich. Langzeitstudien über Entwicklung und Kompensation der Symptome liegen ebenfalls bis dato noch nicht vor. Des Weiteren müssten die Auswirkungen von Mutationen in intronisch-funktionellen Bereichen, wie Spleißstellen geklärt werden. Außerdem bleiben weiterhin Ursachen für die Ausbildung von Hyperekplexie bei Patienten ohne bekannte Mutationen in bereits erwähnten Rezeptoren, Transportern und Hilfsproteinen ungeklärt, da sich mit der Neuentdeckung von Mutationen im ASC-1 Transporter diese Lücke nicht schließen lässt. Darüber hinaus müssten neue Therapiekonzepte und Behandlungen entwickelt werden, die auf neuronaler Ebene nicht nur die Kompensation hyperekplexischer Symptome durch Aktivierung von GABA-Rezeptoren über Benzodiazepine anspricht, sondern auch spezifisch die Sensitivität von NMDA-Rezeptoren erhöhen.

## 7 Literaturverzeichnis

1. Owen AG, Sherrington CS. Observations on strychnine reversal. *The Journal of physiology*. 1911;43(3-4):232-41.
2. Kirstein L, Silfverskiold BP. A family with emotionally precipitated drop seizures. *Acta psychiatrica et neurologica Scandinavica*. 1958;33(4):471-6.
3. Suhren O, Bruyn GW, Tuynman A. Hyperexplexia, a hereditary startle syndrome. *J Neurol Sci*. 1966;3:577-605.
4. Andermann F, Keene DL, Andermann E, Quesney LF. Startle disease or hyperekplexia: further delineation of the syndrome. *Brain : a journal of neurology*. 1980;103(4):985-97.
5. Lingam S, Wilson J, Hart EW. Hereditary stiff-baby syndrome. *Am J Dis Child*. 1981;135(10):909-11.
6. Morley DJ, Weaver DD, Garg BP, Markand O. Hyperexplexia: an inherited disorder of the startle response. *Clinical genetics*. 1982;21(6):388-96.
7. Kurczynski TW. Hyperekplexia. *Arch Neurol*. 1983;40:246-8.
8. Saenz-Lope E, Herranz-Tanarro FJ, Masdeu JC, Chacon Pena JR. Hyperekplexia: a syndrome of pathological startle responses. *Ann Neurol*. 1984;15(1):36-41.
9. Markand ON, Garg BP, Weaver DD. Familial startle disease (hyperexplexia). Electrophysiologic studies. *Arch Neurol*. 1984;41(1):71-4.
10. Hayashi T, Tachibana H, Kajii T. Hyperekplexia: pedigree studies in two families. *Am J Med Genet*. 1991;40(2):138-43.
11. Ryan SG, Dixon MJ, Nigro MA, Kelts KA, Markand ON, Terry JC, et al. Genetic and radiation hybrid mapping of the hyperekplexia region on chromosome 5q. *Am J Hum Genet*. 1992;51(6):1334-43.
12. Shiang R, Ryan SG, Zhu YZ, Hahn AF, O'Connell P, Wasmuth JJ. Mutations in the alpha 1 subunit of the inhibitory glycine receptor cause the dominant neurologic disorder, hyperekplexia. *Nature genetics*. 1993;5(4):351-8.
13. Tebecis AK, Di Maria A. Strychnine-sensitive inhibition in the medullary reticular formation: evidence for glycine as an inhibitory transmitter. *Brain research*. 1972;40(2):373-83.



14. Heller AH, Hallett M. Electrophysiological studies with the spastic mutant mouse. *Brain research*. 1982;234(2):299-308.
15. Pfeiffer F, Graham D, Betz H. Purification by affinity chromatography of the glycine receptor of rat spinal cord. *The Journal of biological chemistry*. 1982;257(16):9389-93.
16. Rajendra S, Lynch JW, Schofield PR. The glycine receptor. *Pharmacology & therapeutics*. 1997;73(2):121-46.
17. Laube B, Maksay G, Schemm R, Betz H. Modulation of glycine receptor function: a novel approach for therapeutic intervention at inhibitory synapses? *Trends in pharmacological sciences*. 2002;23(11):519-27.
18. Meyer G, Kirsch J, Betz H, Langosch D. Identification of a gephyrin binding motif on the glycine receptor beta subunit. *Neuron*. 1995;15(3):563-72.
19. Langosch D, Thomas L, Betz H. Conserved quaternary structure of ligand-gated ion channels: the postsynaptic glycine receptor is a pentamer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1988;85(19):7394-8.
20. Betz H. Glycine receptors: heterogeneous and widespread in the mammalian brain. *Trends in neurosciences*. 1991;14(10):458-61.
21. Kuhse J, Laube B, Magalei D, Betz H. Assembly of the inhibitory glycine receptor: identification of amino acid sequence motifs governing subunit stoichiometry. *Neuron*. 1993;11(6):1049-56.
22. Noda M, Takahashi H, Tanabe T, Toyosato M, Kikuyotani S, Furutani Y, et al. Structural homology of *Torpedo californica* acetylcholine receptor subunits. *Nature*. 1983;302:528 - 32.
23. Grenningloh G, Rienitz A, Schmitt B, Methfessel C, Zensen M, Beyreuther K, et al. The strychnine-binding subunit of the glycine receptor shows homology with nicotinic acetylcholine receptors. *Nature*. 1987;328(6127):215-20.
24. Schofield PR, Darlison MG, Fujita N, Burt DR, Stephenson FA, Rodriguez H, et al. Sequence and functional expression of the GABA A receptor shows a ligand-gated receptor super-family. *Nature*. 1987;328(6127):221-7.
25. Maricq AV, Peterson AS, Brake AJ, Myers RM, Julius D. Primary structure and functional expression of the 5HT3 receptor, a serotonin-gated ion channel. *Science (New York, NY)*. 1991;254(5030):432-7.
26. Malosio ML, Marqueze-Pouey B, Kuhse J, Betz H. Widespread expression of glycine receptor subunit mRNAs in the adult and developing rat brain. *The EMBO journal*. 1991;10(9):2401-9.

27. Moss SJ, Smart TG. Constructing inhibitory synapses. *Nature reviews Neuroscience*. 2001;2(4):240-50.
28. Lynch JW. Molecular structure and function of the glycine receptor chloride channel. *Physiological reviews*. 2004;84(4):1051-95.
29. Hibbs RE, Gouaux E. Principles of activation and permeation in an anion-selective Cys-loop receptor. *Nature*. 2011;474(7349):54-60.
30. Schaefer N, Langhofer G, Kluck CJ, Villmann C. Glycine receptor mouse mutants: model systems for human hyperekplexia. *Br J Pharmacol*. 2013;170(5):933-52.
31. Kirsch J, Wolters I, Triller A, Betz H. Gephyrin antisense oligonucleotides prevent glycine receptor clustering in spinal neurons. *Nature*. 1993;366(6457):745-8.
32. Rees MI, Harvey K, Ward H, White JH, Evans L, Duguid IC, et al. Isoform heterogeneity of the human gephyrin gene (GPHN), binding domains to the glycine receptor, and mutation analysis in hyperekplexia. *The Journal of biological chemistry*. 2003;278(27):24688-96.
33. Harvey K, Duguid IC, Alldred MJ, Beatty SE, Ward H, Keep NH, et al. The GDP-GTP exchange factor collybistin: an essential determinant of neuronal gephyrin clustering. *J Neurosci*. 2004;24(25):5816-26.
34. Gomeza J, Ohno K, Hulsmann S, Armsen W, Eulenburg V, Richter DW, et al. Deletion of the mouse glycine transporter 2 results in a hyperekplexia phenotype and postnatal lethality. *Neuron*. 2003;40(4):797-806.
35. Roux MJ, Supplisson S. Neuronal and glial glycine transporters have different stoichiometries. *Neuron*. 2000;25(2):373-83.
36. Eulenburg V, Armsen W, Betz H, Gomeza J. Glycine transporters: essential regulators of neurotransmission. *Trends in biochemical sciences*. 2005;30(6):325-33.
37. Gomeza J, Hulsmann S, Ohno K, Eulenburg V, Szoke K, Richter D, et al. Inactivation of the glycine transporter 1 gene discloses vital role of glial glycine uptake in glycinergic inhibition. *Neuron*. 2003;40(4):785-96.
38. Tsai G, Ralph-Williams RJ, Martina M, Bergeron R, Berger-Sweeney J, Dunham KS, et al. Gene knockout of glycine transporter 1: characterization of the behavioral phenotype. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(22):8485-90.
39. Jursky F, Nelson N. Localization of glycine neurotransmitter transporter (GLYT2) reveals correlation with the distribution of glycine receptor. *Journal of neurochemistry*. 1995;64(3):1026-33.

40. Supplisson S, Roux MJ. Why glycine transporters have different stoichiometries. *FEBS letters*. 2002;529(1):93-101.
41. Curtis DR, Hosli L, Johnston GA. Inhibition of spinal neurons by glycine. *Nature*. 1967;215(5109):1502-3.
42. Aprison MH, Werman R. The distribution of glycine in cat spinal cord and roots. *Life sciences*. 1965;4(21):2075-83.
43. Rees MI, Harvey K, Pearce BR, Chung SK, Duguid IC, Thomas P, et al. Mutations in the gene encoding GlyT2 (SLC6A5) define a presynaptic component of human startle disease. *Nature genetics*. 2006;38(7):801-6.
44. Yamashita A, Singh SK, Kawate T, Jin Y, Gouaux E. Crystal structure of a bacterial homologue of Na<sup>+</sup>/Cl<sup>-</sup>-dependent neurotransmitter transporters. *Nature*. 2005;437(7056):215-23.
45. Carta E, Chung SK, James VM, Robinson A, Gill JL, Remy N, et al. Mutations in the GlyT2 gene (SLC6A5) are a second major cause of startle disease. *The Journal of biological chemistry*. 2012;287(34):28975-85.
46. Harvey RJ, Topf M, Harvey K, Rees MI. The genetics of hyperekplexia: more than startle! *Trends in genetics : TIG*. 2008;24(9):439-47.
47. James VM, Bode A, Chung SK, Gill JL, Nielsen M, Cowan FM, et al. Novel missense mutations in the glycine receptor beta subunit gene (GLRB) in startle disease. *Neurobiology of disease*. 2013;52:137-49.
48. Safory H, Neame S, Shulman Y, Zubedat S, Radzishewsky I, Rosenberg D, et al. The alanine-serine-cysteine-1 (Asc-1) transporter controls glycine levels in the brain and is required for glycinergic inhibitory transmission. *EMBO reports*. 2015;16(5):590-8.
49. Fukasawa Y, Segawa H, Kim JY, Chairoungdua A, Kim DK, Matsuo H, et al. Identification and characterization of a Na<sup>(+)</sup>-independent neutral amino acid transporter that associates with the 4F2 heavy chain and exhibits substrate selectivity for small neutral D- and L-amino acids. *The Journal of biological chemistry*. 2000;275(13):9690-8.
50. Helboe L, Egebjerg J, Moller M, Thomsen C. Distribution and pharmacology of alanine-serine-cysteine transporter 1 (asc-1) in rodent brain. *The European journal of neuroscience*. 2003;18(8):2227-38.
51. Christensen HN. Role of amino acid transport and countertransport in nutrition and metabolism. *Physiological reviews*. 1990;70(1):43-77.

52. Hashimoto A, Oka T. Free D-aspartate and D-serine in the mammalian brain and periphery. *Progress in neurobiology*. 1997;52(4):325-53.
53. Hashimoto A, Oka T, Nishikawa T. Extracellular concentration of endogenous free D-serine in the rat brain as revealed by in vivo microdialysis. *Neuroscience*. 1995;66(3):635-43.
54. Verrey F, Closs EI, Wagner CA, Palacin M, Endou H, Kanai Y. CATs and HATs: the SLC7 family of amino acid transporters. *Pflügers Archiv : European journal of physiology*. 2004;447(5):532-42.
55. Wagner CA, Lang F, Broer S. Function and structure of heterodimeric amino acid transporters. *American journal of physiology Cell physiology*. 2001;281(4):C1077-93.
56. Bertran J, Magagnin S, Werner A, Markovich D, Biber J, Testar X, et al. Stimulation of system  $\gamma(+)$ -like amino acid transport by the heavy chain of human 4F2 surface antigen in *Xenopus laevis* oocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(12):5606-10.
57. Bertran J, Werner A, Moore ML, Stange G, Markovich D, Biber J, et al. Expression cloning of a cDNA from rabbit kidney cortex that induces a single transport system for cystine and dibasic and neutral amino acids. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 1992;89(12):5601-5.
58. Mastroberardino L, Spindler B, Pfeiffer R, Skelly PJ, Loffing J, Shoemaker CB, et al. Amino-acid transport by heterodimers of 4F2hc/CD98 and members of a permease family. *Nature*. 1998;395(6699):288-91.
59. Nakamura E, Sato M, Yang H, Miyagawa F, Harasaki M, Tomita K, et al. 4F2 (CD98) heavy chain is associated covalently with an amino acid transporter and controls intracellular trafficking and membrane topology of 4F2 heterodimer. *The Journal of biological chemistry*. 1999;274(5):3009-16.
60. Pfeiffer R, Spindler B, Loffing J, Skelly PJ, Shoemaker CB, Verrey F. Functional heterodimeric amino acid transporters lacking cysteine residues involved in disulfide bond. *FEBS letters*. 1998;439(1-2):157-62.
61. Nakauchi J, Matsuo H, Kim DK, Goto A, Chairoungdua A, Cha SH, et al. Cloning and characterization of a human brain Na<sup>(+)</sup>-independent transporter for small neutral amino acids that transports D-serine with high affinity. *Neurosci Lett*. 2000;287(3):231-5.
62. Mothet JP, Parent AT, Wolosker H, Brady RO, Jr., Linden DJ, Ferris CD, et al. D-serine is an endogenous ligand for the glycine site of the N-methyl-D-aspartate receptor. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(9):4926-31.

63. Yang Y, Ge W, Chen Y, Zhang Z, Shen W, Wu C, et al. Contribution of astrocytes to hippocampal long-term potentiation through release of D-serine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003;100(25):15194-9.
64. Papouin T, Ladepeche L, Ruel J, Sacchi S, Labasque M, Hanini M, et al. Synaptic and extrasynaptic NMDA receptors are gated by different endogenous coagonists. *Cell*. 2012;150(3):633-46.
65. Li Y, Sacchi S, Pollegioni L, Basu AC, Coyle JT, Bolshakov VY. Identity of endogenous NMDAR glycine site agonist in amygdala is determined by synaptic activity level. *Nature communications*. 2013;4:1760.
66. Rosenberg D, Artoul S, Segal AC, Kolodney G, Radzishhevsky I, Dikopoltsev E, et al. Neuronal D-serine and glycine release via the Asc-1 transporter regulates NMDA receptor-dependent synaptic activity. *J Neurosci*. 2013;33(8):3533-44.
67. Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, et al. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science (New York, NY)*. 1985;230(4732):1350-4.
68. Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, et al. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science (New York, NY)*. 1988;239(4839):487-91.
69. Mullis KB, Faloona FA. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology*. 1987;155:335-50.
70. Kaijalainen S, Karhunen PJ, Lalu K, Lindstrom K. An alternative hot start technique for PCR in small volumes using beads of wax-embedded reaction components dried in trehalose. *Nucleic acids research*. 1993;21(12):2959-60.
71. Dang C, Jayasena SD. Oligonucleotide inhibitors of Taq DNA polymerase facilitate detection of low copy number targets by PCR. *Journal of molecular biology*. 1996;264(2):268-78.
72. Rychlik W, Spencer WJ, Rhoads RE. Optimization of the annealing temperature for DNA amplification in vitro. *Nucleic Acids Res*. 1990;18(21):6409-12.
73. Vincent M, Xu Y, Kong H. Helicase-dependent isothermal DNA amplification. *EMBO Rep*. 2004:795-800.
74. Cao Y, Kim HJ, Li Y, Kong H, Lemieux B. Helicase-dependent amplification of nucleic acids. *Current protocols in molecular biology*. 2013;104:Unit 15.1.

75. Dean FB, Hosono S, Fang L, Wu X, Faruqi AF, Bray-Ward P, et al. Comprehensive human genome amplification using multiple displacement amplification. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2002;99(8):5261-6.
76. Dettler JC, Jett JM, Lucas SM, Dalin E, Arellano AR, Wang M, et al. Isothermal strand-displacement amplification applications for high-throughput genomics. *Genomics*. 2002;80(6):691-8.
77. Luthra R, Medeiros LJ. Isothermal multiple displacement amplification: a highly reliable approach for generating unlimited high molecular weight genomic DNA from clinical specimens. *The Journal of molecular diagnostics : JMD*. 2004;6(3):236-42.
78. Gibson DG, Young L, Chuang RY, Venter JC, Hutchison CA, Smith HO. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat Methods*. 2009;6:343-5.
79. Blanco L, Bernad A, Lazaro JM, Martin G, Garmendia C, Salas M. Highly efficient DNA synthesis by the phage phi 29 DNA polymerase. Symmetrical mode of DNA replication. *The Journal of biological chemistry*. 1989;264(15):8935-40.
80. Piepenburg O, Williams CH, Stemple DL, Armes NA. DNA detection using recombination proteins. *PLoS biology*. 2006;4(7):e204.
81. Notomi T, Okayama H, Masubuchi H, Yonekawa T, Watanabe K, Amino N, et al. Loop-mediated isothermal amplification of DNA. *Nucleic acids research*. 2000;28(12):E63.
82. Compton J. Nucleic acid sequence-based amplification. *Nature*. 1991;350(6313):91-2.
83. GmbH NGE. Midori Green Advance DNA Stain – Safety Report Internet: NIPPON GENETICS EUROPE GmbH; 22.08.2017 19.31 Uhr [Available from: <file:///C:/Users/Paul/Downloads/Safety-Report-MGA.pdf>].
84. Werle E, Schneider C, Renner M, Volker M, Fiehn W. Convenient single-step, one tube purification of PCR products for direct sequencing. *Nucleic Acids Res*. 1994;22(20):4354-5.
85. Burke DT, Carle GF, Olson MV. Cloning of large segments of exogenous DNA into yeast by means of artificial chromosome vectors. *Science*. 1987;236(4803):806-12.
86. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning : a laboratory manual*. Ausubel FM, Brent R, Kingston RE, Moore DD, Seidman JG, Smith JA, et al., editors. New York: Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons. ; 1989.

87. Wilson RH, Morton SK, Deiderick H, Gerth ML, Paul HA, Gerber I, et al. Engineered DNA ligases with improved activities in vitro. *Protein engineering, design & selection : PEDS*. 2013;26(7):471-8.
88. Ahle W. *Enzymes in Industry: Production and Applications*: Wiley-VCH; 2007. 516 p.
89. Pfeiffer BH, Zimmerman SB. Polymer-stimulated ligation: enhanced blunt- or cohesive-end ligation of DNA or deoxyribooligonucleotides by T4 DNA ligase in polymer solutions. *Nucleic Acids Res*. 1983;11:7853-71.
90. Topcu Z. An optimized recipe for cloning of the polymerase chain reaction-amplified DNA inserts into plasmid vectors. *Acta Biochim Pol*. 2000;47(3):841-6.
91. Ehmsen JT, Liu Y, Wang Y, Paladugu N, Johnson AE, Rothstein JD, et al. The astrocytic transporter SLC7A10 (Asc-1) mediates glycinergic inhibition of spinal cord motor neurons. *Sci Rep*. 2016;6:35592.
92. Bliss TV, Collingridge GL. A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 1993;361(6407):31-9.
93. Kandel ER. The molecular biology of memory storage: a dialogue between genes and synapses. *Science (New York, NY)*. 2001;294(5544):1030-8.
94. Morris RG, Moser EI, Riedel G, Martin SJ, Sandin J, Day M, et al. Elements of a neurobiological theory of the hippocampus: the role of activity-dependent synaptic plasticity in memory. *Philosophical transactions of the Royal Society of London Series B, Biological sciences*. 2003;358(1432):773-86.
95. Malenka RC, Bear MF. LTP and LTD: an embarrassment of riches. *Neuron*. 2004;44(1):5-21.
96. Traynelis SF, Wollmuth LP, McBain CJ, Menniti FS, Vance KM, Ogden KK, et al. Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacological reviews*. 2010;62(3):405-96.
97. Malenka RC, Nicoll RA. NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends in neurosciences*. 1993;16(12):521-7.
98. Abraham WC. Metaplasticity: tuning synapses and networks for plasticity. *Nature reviews Neuroscience*. 2008;9(5):387.
99. Al-Futaisi AM, Al-Kindi MN, Al-Mawali AM, Koul RL, Al-Adawi S, Al-Yahyaee SA. Novel mutation of GLRA1 in Omani families with hyperekplexia and mild mental retardation. *Pediatric neurology*. 2012;46(2):89-93.

## 8 Anhang

*Tabelle 1: Primer sense für die PCR*

Primer sense (S)	Primer S Sequenz	Annealing Temp. °C	GC Gehalt	bp	Primer #	Exon
intronic	actgggaagtcctcctagatc	54,8	50,0	22	245	1
intronic	acgaggtgccatttcctatgtg	54,8	50,0	22	247	2
intronic	acagtctatcaatgcagccgc	54,4	52,0	21	249	3
intronic	ttccagctgctataggggatg	54,5	52,0	21	251	4+5
intronic	acagacatcagaccctgtct	54,4	52,0	21	253	6+7
intronic	gacatcaggtccaaagctgaga	54,8	50,0	22	255	8
intronic	gaaaattccccagacccccag	53,8	55	21	257	for. 10
intronic	caagatgtacccaagtccaga	54,0	42,0	24	259	11
intronic	gtcagcaccatctccccag	55,4	63	19	262	for. 5
exonic/intronic	cttctccagatctccaaggtag	55,3	48	23	264	for. 5
intronic	acatggcctctctactgtgc	53,8	55	20	266	for. 7
intronic	ctacccggcaatgcaggac	55,4	63	19	268	9+10
intronic/exonic	ccaggtgaacctctcatcc	53,8	55	20	305	10
intronic	gaggcaggctaggggcca	57,2	72	18	307	9



Tabelle 2: Primer antisense für die PCR

Primer antisense (AS)	Primer AS Sequenz	Annealing Temp. °C	GC Gehalt	bp	Primer #	Exon
intronic	gcagtcattggccatttcacaga	54,8	50,0	22	246	1
intronic	cagtaagaatccccctcctta	54,8	50,0	22	248	2
intronic	catcccctatagcagctggaa	54,4	52,0	21	250	3
intronic	ggatctatttacagcaggatgatga	54,4	40,0	25	252	4+5
intronic	ggctcagctttggacctgat	54,4	52,0	21	254	6+7
intronic	ctatgaggaatggctgcctca	54,4	52,0	21	256	rev. 9
intronic	tctggggtgagcctctaaga	53,8	55	20	258	9+10
intronic	cccctcctcgacatcccttt	53,8	55	20	260	11
intronic	ctggggagatggctgctgac	55,4	63	19	261	rev. 4
intronic/exonic	tcagctcctcgaagtgtcct	53,8	55	20	263	rev. 4
intronic	gcacagtagagaggccatgt	53,8	55	20	265	rev. 6
intronic	gtcctgcattgccgggtag	55,4	63	19	267	8
intronic	ctgtgctgggtgacctgca	55,4	63	19	303	10
exonic	ctgtgagtctgtcacacaacttt	55,7	48	23	304	10
intronic	cggcacaggccagctgt	57,2	72	18	306	9

Tabelle 3: Primer sense und antisense für SLC7A10-Klon, mit integrierter Mutation G307R

SLC7A10 G307R			
Name	Sequenz	bp	Primer Nr. #
Primer Sense	ggctgtgaccttcaggagaagct	24	362
Primer Antisense	cagcagcttctcctgaagtcaca	25	363

ATGGCCGGCCACACGCAGCAGCCGAGCGGGCGGGGAACCCAGGCCTGCGCCCTCGCCCTCCCCAGTCC  
 M A G H T Q Q P S G R G N P R P A P S P S P V P  
 CAGGGACCGTCCCGCGCCTCGGAGCGGGTGGCGCTCAAGAAGGAGATCGGGCTGCTGAGCGCCTGCAC EXON1  
 G T V P G A S E R V A L K K E I G L L S A C T  
 CATCATCATCGGGAACATCATCGGCTCGGGCATCTTCATCTCGCCCAAGGGGGTCTGGAGCACTCAGGC  
 I I I G N I I G S G I F I S S P K G V L E H S G  
 TCCGTGGGTCTGGCCCTGTTTCGTCTGGGTCTGGGTGGGGCGTGACGGCTCGGGCTCCCTCTGCTATG EXON2  
 S V G L A L F V W V L G G G V T A L G S L C Y A  
 CAGAGCTGGGAGTCCGCATCCCAAGTCTGGCGGGGACTACGCCTACGTACAGAGATCTTCGGGGGCCT  
 E L G V A I P K S G G D Y A Y V T E I F G G L  
 GGCTGGCTTTCTGCTGCTCTGGAGCGCCGTCTCATCATGTACCCACCAGCCTTGTGTCTATCTCCATG EXON3  
 A G F L L L W S A V L I M Y P T S L A V I S M  
 ACCTTCCAACATGCTGCTGAGCCCGTGTTCCTCAACTGCATCCCGCCACCACAGCCTCCCGGGTGC  
 T F S N Y V L Q P V F P N C I P P T T A S R V L  
 TGTCCATGGCCTGCCTGATGCTCTGACATGGGTGAACAGCTCCAGTGTGCGCTGGGCCACGCGCATCCA EXON4  
 S M A C L M L L T W V N S S S V R W A T R I Q  
 GGACATGTTACAGCGGGGAAGCTGCTGGCCTTGTCCCTCATCATCGGCGTGGGCCTTCTCCAGATCTTC  
 D M F T G G K L L A L S L I I G V G L L Q I F  
 CAAGGACACTTCGAGGAGCTGAGGCCAGCAATGCCTTTGCTTCTGGATGAGGCCCTCCGTGGGACACC EXON5  
 Q Q H F E E L R P S N A F A F W M T P S V G H L  
 TGGCCCTGGCCTTCCCTCAGGGCTCCTTCGCCTTTCAGTGGCTGGAACCTTCCCTCAACTATGCACCGAGGA  
 A L A F L Q G S F A F S G W N F L N Y V T E E  
 GATGGTTGACGCCGAAA GAACCTACCTCGCGCCATCTTCATCTCCATCCCACTGGTGACCTTCGTGTAC  
 M V D A A R K N L P R A I F I S I P L V T F V Y  
 ACCTTACCAACATTGCTTACCTTACCGGCCAIGTCCCGGAGGAGTGTCTCTCCCAATGGGGTGGCTG EXON6  
 T F T N I A Y F T A M S P Q E L L S S N A V A V  
 TGACCTTCGGGGAGAAGCTGCTGGGCTACTTTTCTGGGTATGCTGCTGCTCCGTGGCTCTGTCAACCTT EXON7  
 T F G E K L L G Y F S W V M P V S V A L S T F  
 CGGAGGGATCAATGGTTACCTGTTACCTACTCCAGCTGTGTCTTCTCTGGAGCCCGGAGGGGCACCTG EXON8  
 G G I N G Y L F T Y S R L C F S G A R E G H L  
 CCCAGCCTGCTGGCCATGATCCACGTCAGACACTGCACCCCATCCCGCCCTCCTCGTCTGTTCGCGGGG  
 P S L L A M I H V R H C T P I P A L L V C C G A  
 CCACAGCCGTATCATGCTCGTGGGCGACACGTACAGCCTCATCAACTATGTGCTTTCATCAACTACCT EXON9  
 T A V I M L V G D T Y T L I N Y V S F I N Y L  
 CTGCTACGGCGTACCAATCCTGGGCTGCTGCTGCTGCGCTGGAGGCGGCCTGCACTCCACAGGCCCATC  
 C Y G V T I L G L L L L R W R R P A L H R P I  
 AAGGTGAACCTTCTCATCCCGTGGCGTACTTGGTCTTCTGGGCCTTCTGCTGGTCTTTCAGCTTCATCT EXON10  
 K V N L L I P V A Y L V F W A F L L V F S F I S  
 CAGAGCCTATGGTCTGTGGGGTGGCGTATCATCATCTTACGGGGGTGCCCATTTTCTTCTGGGAGT  
 E P M V C G V G V I I I L T G V P I F F L G V  
 GTTCTGGAGAAGCAAACCAAGTGTGTGCACAGACTCACAGAGTCCATGACACACTGGGGCCAGGAGCTG EXON11  
 F W R S K P K C V H R L T E S M T H W G G E L  
 TGTTTCGTGGTCTACCCCGAGGACGCCCGAAGAGGAGAGAATGGCCCTGCCACCCTCCTGCTGC  
 C F V V Y P Q D A P E E E E N G P C P P S L L P  
 CTGCCACAGACAAGCCCTCGAAGCCAAA TGA  
 A T D K P S K P Q

Abbildung 26: Farbige Darstellungen der Exone für ASC-1, die Codons sind gleichzeitig in die jeweilige Aminosäure übersetzt.

## 9 Danksagung

Hiermit bedanke ich mich ganz herzlich bei Univ.-Prof. Dr. Michael Sendtner, Leiter des Instituts für Klinische Neurobiologie der Universität Würzburg, für die Möglichkeit diese Doktorarbeit unter seiner Direktion durchführen zu dürfen.

Ganz besonderen Dank gilt Frau Prof. Dr. Carmen Villmann für die herausragende, aufopferungsvolle Betreuung, Unterstützung, sowie die vielen lieben Worte während der Erarbeitung meiner Dissertation.

Besonderen Dank gilt ebenfalls Sinem Milanos, welche mir bei einigen Versuchen tatkräftig zur Seite gestanden hat.

Des Weiteren möchte ich meiner Laborgruppe für die vielen Hilfestellungen und Gedankenanstöße danken, als auch für die wirklich tolle Arbeitsatmosphäre, welche die Dissertation maßgeblich mit vorangebracht haben.

Bei meinen Eltern möchte ich mich ebenfalls ganz besonders herzlich bedanken, für die uneingeschränkte, liebevolle und vielseitige Unterstützung während meines Studiums.

Außerdem möchte ich mich bei meiner liebevollen Freundin bedanken, sowie bei meinen zahlreichen Kommilitonen, welche die Studienzeit zu einer unvergesslichen und wundervollen Erfahrung haben werden lassen.

## 10 Lebenslauf

### Auszeichnungen

Gewinner Global Final - Clinical Case Contest 2016-2017

Gewinner Clinical Case Contest 2016-2017 - in DE / AT / CH

### Akademische Laufbahn

Studium der Zahnmedizin:

Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Bestandenes Examen: Durchschnittsnote - Sehr gut

Absolviertes Physikikum: Durchschnittsnote - Sehr gut

Tutor:

Betreuung vorklinischer propädeutischer Kurse / KFO Kurse

Zahntechnischer Nebenerwerb

Zahntechnischer Angestellter: Zahnklinik - Kieferorthopädie

Doktorarbeit

### Wissenschaftliche Vorträge & Poster

Posterausstellung:

Asc-1 – a novel candidate for the neuromotor disorder

hyperekplexia?

Journal Club:

03.12.2015

The alanine-serine-cysteine-1 (Asc-1) transporter – a novel

candidate for human hyperekplexia

13.09.2016

Mutations in SLC12A5 in epilepsy of infancy with migrating

focal seizures

#### Beruflicher Werdegang

Zahntechnische Leitung KFO Heppner

Ausbildung zum Zahntechniker: Flemming Dental

Überbetriebliche Lehrunterweisungen

#### Schulische Laufbahn

Abschluss mit bestandener Abiturprüfung

Praktika:

Klinik für Mund-Kiefer-Gesichtschirurgie Uni Leipzig

Zahnarztpraxis Simmig in Bad Neustadt

Weiterbildungsseminar:

Orale Prophylaxe und Parodontalerkrankungen