

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin – Allgemeine Pädiatrie
-Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Omran-

Ziliogenesedefekte verursachen Störungen der mukoziliären Clearance durch eine reduzierte Anzahl multipel motiler Zilien

INAUGURAL - DISSERTATION

zur

Erlangung des doctor medicinae

der Medizinischen Fakultät
der Westfälischen Wilhelms-Universität Münster

vorgelegt von Weichert, Jonas
aus Bielefeld

2021

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Westfälischen
Wilhelms- Universität Münster

Dekan: Univ.-Prof. Dr. med. Frank Ulrich Müller

1. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. H. Omran

2. Gutachter: Univ.-Prof. Dr. med. R. Wiewrodt

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2021

Aus dem Universitätsklinikum Münster
Klinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin – Allgemeine Pädiatrie

- Direktor: Univ.-Prof. Dr. med. H. Omran -

Referent: Univ.-Prof. Dr. med. H. Omran

Koreferent: Univ.-Prof. Dr. med. R. Wiewrodt

ZUSAMMENFASSUNG

Ziliogenesedefekte verursachen Störungen der mukoziliären Clearance durch eine reduzierte Anzahl multipel motiler Zilien

Weichert, Jonas

Das RGMC Syndrom ist eine Sonderform der seltenen Primären Ziliären Dyskinesie. Der verminderte Zilienbesatz in der Lunge führt zu chronischen Atemwegsinfektionen mit irreversiblen Folgeschäden. Diagnostisch stehen unter anderem die Hochfrequenz-Video-Mikroskopie, die Immunfluoreszenzmikroskopie sowie die genetische Diagnostik zur Verfügung. Eine späte Diagnose mit konsekutiver Therapieverzögerung ist häufig. Die Therapie ist symptomatisch und der der zystischen Fibrose ähnlich. Sie umfasst antiinfektive, inhalative und physiotherapeutische Maßnahmen. In dieser Arbeit wurden Patienten mit einer reduzierten Anzahl multipel motiler Zilien auf Mutationen in den Ziliogeneseenen *CCNO* und *MCIDAS* mittels Sequenzierung untersucht. Es ist bekannt, dass diese die Generierung der Basalkörper der Zilien regulieren. In Folge eines Funktionsverlusts können oft nur vereinzelt Zilien gebildet werden. In 19 der 45 untersuchten Patienten konnten homozygote oder compound heterozygote Mutationen nachgewiesen werden. Diese häufen sich in *CCNO* in den Exonen 1 und 3 sowie in *MCIDAS* in Exon 7, was durch das Vorliegen einer Foundermutation oder einen mutationssensiblen Genlokus erklärbar wäre. Die weitere Charakterisierung der Ziliogenese ist wichtig zur effektiven Behandlung betroffener Patienten dieser seltenen Erkrankung.

Tag der mündlichen Prüfung: 20.09.2021

ERKLÄRUNG

Ich gebe hiermit die Erklärung ab, dass ich die Dissertation mit dem Titel:

Ziliogenesedefekte verursachen Störungen der mukoziliären Clearance durch eine reduzierte Anzahl multipel motiler Zilien

in der/im (Klinik, Institut, Krankenanstalt):

Klinik für Kinder- und Jugendmedizin – Allgemeine Pädiatrie

unter der Anleitung von:

Univ.-Prof. Dr. med. Heymut Omran

1. selbständig angefertigt,
2. nur unter Benutzung der im Literaturverzeichnis angegebenen Arbeiten angefertigt und sonst kein anderes gedrucktes oder ungedrucktes Material verwendet,
3. keine unerlaubte fremde Hilfe in Anspruch genommen,
4. sie weder in der gegenwärtigen noch in einer anderen Fassung einer in- oder ausländischen Fakultät als Dissertation, Semesterarbeit, Prüfungsarbeit, oder zur Erlangung eines akademischen Grades, vorgelegt habe.

Ort, Datum:

Münster, 20.09.2021

Name:

Jonas Weichert

Unterschrift:

Für meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	ZILLEN	1
1.1.1	<i>Allgemein</i>	1
1.1.2	<i>Struktur</i>	2
1.1.3	<i>Ziliogenese</i>	3
1.2	PATHOPHYSIOLOGIE	6
1.3	KLINIK	9
1.4	DIAGNOSTIK	10
1.4.1	<i>Nasale NO Messung</i>	11
1.4.2	<i>HVMA</i>	11
1.4.3	<i>TEM</i>	11
1.4.4	<i>Genetik</i>	12
1.5	THERAPIE	12
2	MATERIAL	13
2.1	CHEMIKALIEN UND ANTIKÖRPER	13
2.2	VERBRAUCHSMATERIALIEN	14
2.3	GERÄTE UND PROGRAMME	14
3	METHODEN	16
3.1	POLYMERASEKETTENREAKTION (PCR)	16
3.2	SANGER SEQUENZIERUNG	17
3.3	BRIDGE PCR	20
3.4	PCR PRIMER DESIGN	21
4	ERGEBNISSE	22
4.1	FRAGESTELLUNG	22
4.2	ERGEBNISSE DER <i>CCNO</i> UND <i>MCIDAS</i> SEQUENZIERUNGEN	22
4.2.1	<i>Mutationen</i>	22
4.2.2	<i>Klinischer Phänotyp</i>	26
4.2.3	<i>OP-1975 II1</i>	27
5	DISKUSSION	30
5.1	HÄUFIGKEIT VON ZILIOGENESEDEFEKTEN	30
5.2	KLINIK	32
5.3	KONSERVIERUNG	36
6	AUSBLICK	39

7	DANKSAGUNG	40
8	LITERATURVERZEICHNIS	41
9	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	47
10	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	49
11	TABELLENVERZEICHNIS	50
	ANHANG	I

1 Einleitung

1.1 Zilien

1.1.1 Allgemein

Zilien sind haarähnliche Strukturen auf der Oberfläche nahezu jeder menschlichen Zelle (s. Abbildung 1). Sie sind in der äußeren Zellmembran verankert und ragen in den extrazellulären Raum (1). Als sensorische Zilien reagieren sie auf mechanische oder chemische Reize mit der Abgabe eines Signals an die Zelle (wie z.B. Wachstumsreize), als motile Zilien helfen sie dagegen der Zelle, sich selbst (z.B. Spermien) oder Flüssigkeiten und Fremdkörper zu transportieren (2,3). Letzteres sind Eigenschaften sog. multizilierter Zellen, die vor allem im Atemtrakt eine wichtige Rolle spielen. Mit einer Länge von ca. 6 µm und einer Anzahl von etwa 200 Zilien pro Zelle befreien sie mit einem koordinierten Schlagmuster die Atemwege von abgeschilferten Zellen, eingeatmeten Fremdkörpern und Mikroben (1,3,4).

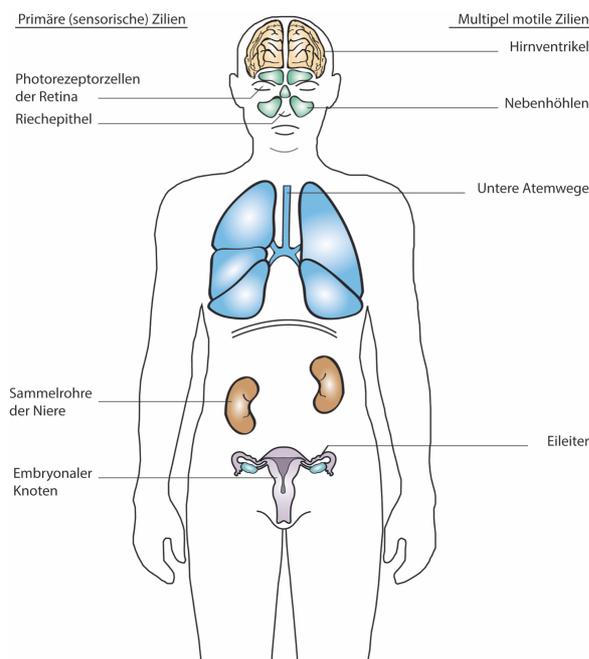


Abbildung 1: Lokalisation der Zilien im menschlichen Körper

Motile Zilien finden sich beispielsweise in den Hirnventrikeln, wo sie für den Fluss des Liquors verantwortlich sind, in den oberen (Nebenhöhlen) und unteren (Trachea, Bronchien) Atemwegen, in denen Schleim abtransportiert wird und in den Eileitern bzw. Nebenhodengängen. Auch Spermien tragen eine einzelne motile Zilie, die sie zur Fortbewegung nutzen. Im embryonalen Knoten sorgen motile Zilien für die Entstehung der Links-Rechts-Asymmetrie. Sensorische Zilien sind unter anderem in den Sammelrohren der Niere lokalisiert. Dort erfassen sie Informationen über Volumen und Flussgeschwindigkeit. Auch in der Retina befinden sich modifizierte Zilien, die *Außensegmente*. In der Riechschleimhaut vermitteln sensorische Zilien den Geruchssinn (2).

1.1.2 Struktur

Die Zilienstruktur, bestehend aus über 650 Proteinen, ist sehr komplex. Zudem sind die zugehörigen Gene der Zilie hochkonserviert und daher in vielen Spezies nahezu identisch (1). Die Zilienstruktur kann zunächst grob unterteilt werden in den Basalkörper, die Übergangszone, das Axonem (das Grundgerüst der Zilie), die Membran und die Zilienspitze (1). Den zylindrischen Kern bilden dabei jeweils eine spezifische Anordnung aus Mikrotubuli – kleine gerüstartige Röhrenstrukturen – die durch Interaktion untereinander die Zilie bewegen können.

Die Basalkörper sind die Organisationszentren der Zilie. Es handelt sich um spezialisierte Zentriolen, die als Ankerpunkt für den Auf- und Abbau der Zilie fungieren. Die etwa 500 nm hohen und 250 nm im Durchmesser messenden Zentriolen grenzen direkt an die Zellmembran und bestehen aus einer zirkulären 9×3 Anordnung aus Mikrotubuli, die mit vom Zentrum ausgehenden Speichen verbunden sind (s. Abbildung 2, C) (5). Von der Basis der Basalkörper aus erstrecken sich streifenartige Strukturen in Richtung des Nukleus, die *Rootlets* genannt werden. Sie stabilisieren den Basalkörper indem sie diesen mit dem Aktin-Zytoskelett verbinden (6,7).

Die Transitionszone überführt die Struktur der Basalkörper in die axonemale Struktur (1). Im proximalen Teil sorgen im Querschnitt sternförmig aussehende Fasern (s. Abbildung 2, B) für eine Verbindung der Mikrotubuli mit der Zellmembran. Distal entspringen die zentralen Mikrotubuli Doubletten des Axonems (8).

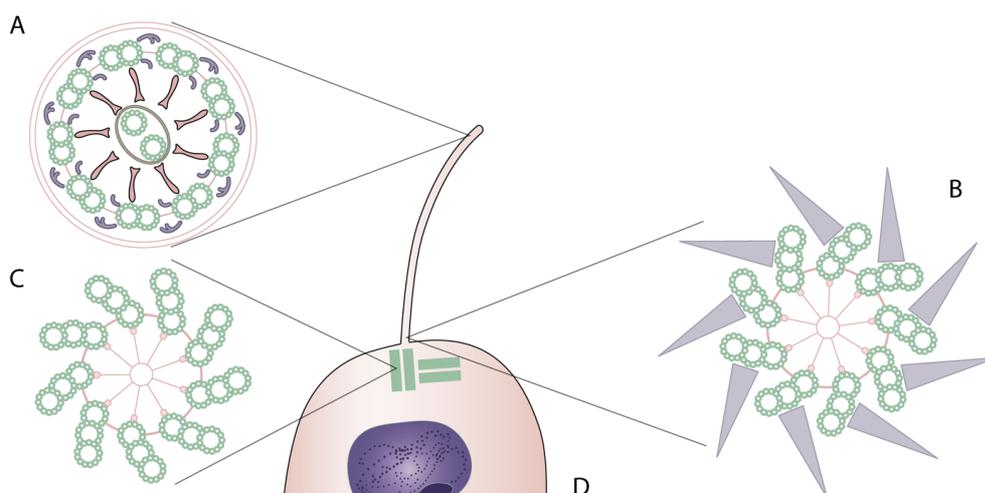


Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zilienquerschnitts

(D) zeigt eine monozylierte Zelle. Der Basalkörper (C) besteht aus 9×3 Mikrotubuli, die über ein radförmiges Zentrum verbunden sind. (B) zeigt den Querschnitt der proximalen Transitionszone mit sternförmigen Verdichtungen zur Membran hin. In (A) ist die ausgereifte $9 \times 2 + 2$ Struktur einer motilen Zilie zu sehen.

Das Axonem (s. Abbildung 3), als Grundgerüst der Zilie, besteht aus einem zylindrisch geformten Proteinkomplex, der von einer Ausstülpung der Zellmembran umgeben ist (2). Bei motilen Zilien wird dieser hauptsächlich aus 9 äußeren Mikrotubuli Paaren sowie einem zentralen Paar gebildet, sodass man von einer $9 \times 2 + 2$ Anordnung spricht. Bei sensorischen Zilien fehlt das zentrale Paar in der Regel. Die Dyneinarme sind der Motor der Zilie. Sie sind am A-Tubulus lokalisiert und interagieren mit dem B-Tubulus des nächstgelegenen Mikrotubuli-Paars, wodurch diese sich relativ zueinander verschieben (4,9,10).

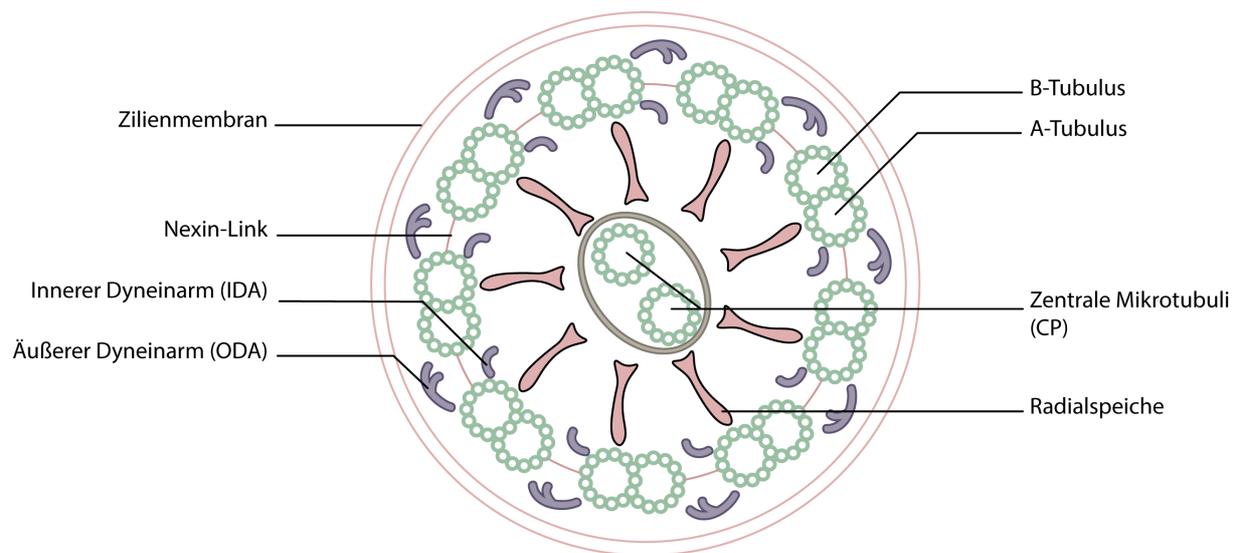


Abbildung 3: Querschnitt des Axonems einer motilen Zilie

Mittig steht das zentrale Mikrotubuli-Paar, welches von 9 Paaren aus je einem A- und B-Tubulus umgeben ist. Sie sind untereinander durch Nexin-Links und Radialspeichen verbunden. Die inneren und äußeren Dyneinarme sorgen durch relative Verschiebung der Mikrotubuli untereinander für Motilität.

1.1.3 Ziliogenese

Die Ziliogenese beschreibt die Ausbildung von Zilien während der Ausdifferenzierung einer Zelle. Jede Zilie benötigt einen Basalkörper, durch den sie in der Zellmembran verankert wird. Die Basalkörper wiederum bestehen aus Zentriolen, welche sich normalerweise während der Mitose gegenüberliegen und an beiden Polen der Zelle durch Mikrotubulispindeln für die Trennung der Chromosomen sorgen (s. Abbildung 4, A) (11).

Bei der Bereitstellung von Zentriolen als Basalkörper werden zwei Wege unterschieden:

Zu Beginn des Zellzyklus befindet sich in der Zelle ein Zentrosom, bestehend aus zwei im 90° Winkel zueinander angeordneten und von einer Proteinmatrix umgebenen Zentriolen.

Verlässt die Zelle den Zellzyklus, kann ein Zentrosom bereits als Basalkörper dienen, auf dessen Basis sich eine einzelne Zilie ausbilden kann (s. Abbildung 4, A-B) (12).

Für die Differenzierung zu multizilierten Zellen (MCCs, *multiciliated cells*) mit etwa 200 Zilien pro Zelle, wie sie in den Atemwegen, den Hirnventrikeln oder den Eileitern vorhanden sind, ist jedoch ein anderer Pfad nötig, da große Mengen an Zentriolen benötigt werden. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen junger MCCs fiel eine von dutzenden Zentriolen umgebene radförmige Struktur auf (12). Diese sog. *Deuteriosomen* sind im Vergleich zum ersten geschilderten Weg in der Lage, an den Zentriolen mehr als nur eine ‚Nachwuchsstelle‘ für weitere Zentriolen zu generieren (s. Abbildung 4, D) (13–15). Bis zu hundert solcher *Deuteriosomen* pro Zelle produzieren so die Massen an benötigten Zentriolen für die Entwicklung einer multizilierten Zelle (16). In der Regulation dieses deuteriosomenabhängigen Wegs spielt der Faktor DEUP1 (deuterosome protein 1, auch CCDC67 genannt) eine Schlüsselrolle (12). Im Zuge der Ausdifferenzierung zur multizilierten Zelle, kann diese durch gesteigerte *DEUP1* Expression die Ausbildung von Deuteriosomen initiieren und somit die benötigten Basalkörper produzieren.

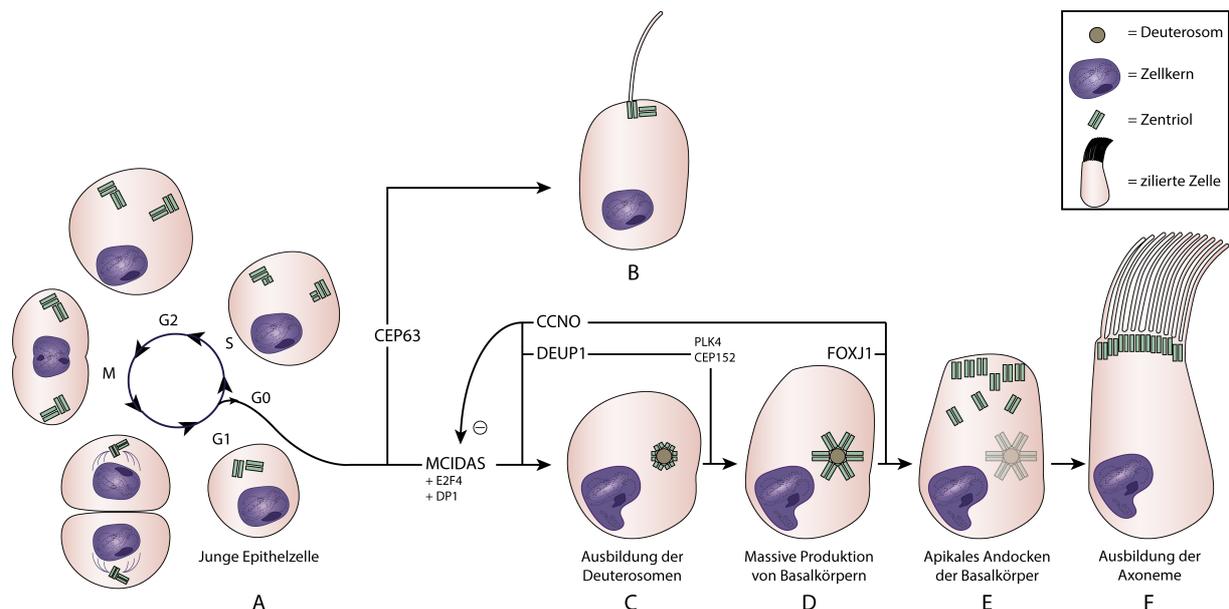


Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ziliogenese

(A) Eine junge Epithelzelle trägt ein Paar Zentriolen. In Anwesenheit von CEP63 kann dieses als Basalkörper für eine einzelne Zilie (B) dienen. MCIDAS wirkt fördernd auf DEUP1, nicht aber CEP63 und löst somit die Ausbildung der Deuteriosomen aus. DEUP1 (C) aktiviert wiederum nachgeschaltete Faktoren wie PLK4 und CEP152, die die Ausbildung der Nachwuchsstellen kontrollieren (D). CCNO ist in Folge von MCIDAS aktiv und u.a. ebenfalls in der Ausbildung der Deuteriosomen beteiligt. Außerdem scheint es, zusammen mit FOXJ1, eine Rolle beim apikalen Andocken der Basalkörper an die Zellmembran (E) zu spielen. Durch einen negativen Rückkopplungsmechanismus inhibiert CCNO MCIDAS.

MCIDAS

MCIDAS kodiert für das im Kern liegende Protein Multicilin, welches aus 385 Aminosäuren besteht. Als Transkriptionskofaktor sorgt es in Hautzellen des *Xenopus* sowie in respiratorischen Epithelzellen der Maus für die Entwicklung multizilierter Zellen (3). *MCIDAS* besteht aus sieben Exonen mit 1736 Basenpaaren (bp) und liegt in einer konservierten Region auf Chromosom 5q11, welche unter anderem für multizilierte Zelldifferenzierung zuständig zu sein scheint. Es wird von zwei weiteren Ziliogenesefaktoren flankiert: auf der einen Seite von *CCNO*, auf der anderen von *CDC20B*, welches für die an der MCC Differenzierung ebenfalls beteiligten *microRNAs* miR449a-c kodiert und mit *DEUP1* assoziiert ist (17–19).

Multicilin ist in jungen Epithelien während der Differenzierung zu MCCs aktiv und im Kern lokalisiert. Wird das kodierende Gen ausgeschaltet, zeigt sich in Haut- und Nierenzellen des *Xenopus* eine ausbleibende Entwicklung multizilierter Zellen, wohingegen eine ektopische Stimulation ebensolche herbeiführt (20). *Multicilin* bildet dafür einen Transkriptionskomplex mit anderen Faktoren, da es selber keine DNA bindende Region aufweist. Einer dieser Faktoren ist *E2F4*, ein Schlüsselfaktor der Zellzyklusregulation sowie der Arretierung in G0 (12,21). Dieser *Multicilin/E2F4/DP1* (DP1: *dimerization binding partner 1* von *E2F4*) Komplex erhöht unter anderem die Expression von *DEUP1* und somit die Zentriolenproduktion an den Deuterosomen. *Multicilin* agiert somit als Kickstarter der Differenzierung epithelialer Vorgängerzellen zu multizilierten Zellen (12). Ist *Multicilin* ausgeschaltet, lässt sich nur eine einzelne Zilie mit einem einzigen dieser Zilie zugeordneten Basalkörper nachweisen (12).

CCNO

CCNO liegt neben *MCIDAS* auf Chromosom 5q11. Drei Exone codieren für das 1053 bp und 350 Aminosäuren große Cyclin O, welches in jungen Zellen an der Zilienbasis lokalisiert (3). In ausdifferenzierten Zellen ist es dagegen kaum noch nachweisbar (22). In der frühen Differenzierung der Epithelzelle zur multizilierten Zelle sorgt Cyclin O für eine korrekte Ausbildung der Deuterosomen und Generation von Prozentriolen (23,24). Außerdem wird eine Beteiligung am apikalen Andocken der Zentriolen an der Zellmembran vermutet (23). Der CEP63 abhängige Weg der Ziliogenese wird von *CCNO* vermutlich nicht beeinflusst, weshalb bei einer *Loss of Function* Mutation (LOF) noch vereinzelt funktionsfähige Zilien ausgebildet werden können (23).

CCNO ist funktionell MCIDAS nachgeschaltet und wird parallel zu FOXJ1 von MCIDAS aktiviert (3,25). Daher ist bei einer LOF im Sinne einer fehlenden negativen Rückkopplung *MCIDAS* weiterhin aktiv (vgl. Abbildung 4) (23). Elektronenmikroskopische und Immunfluoreszenz-Untersuchungen zeigen bei *CCNO* Mutationen nur wenige multizilierte respiratorische Epithelzellen sowie deutlich reduzierte, delokalisierte und fehlgebildete Basalkörper (22,23).

FOXJ1

FOXJ1 (*Forkhead box J1*) agiert *downstream* von MCIDAS und CCNO und ist beteiligt am apikalen Andocken der Basalkörper an der Membran (20,26). Der Promoter von *FOXJ1* besitzt eine Bindungsstelle für den E2F4 Komplexpartner und wird daher direkt von Multicilin aktiviert (12). Eine ektope Expression von *Foxj1* in Hautzellen des *Xenopus* führt nur zur Entwicklung einiger weniger Zilien, in anderen Geweben oder Mauszellkulturen werden dadurch keine motilen Zilien gebildet (26).

1.2 Pathophysiologie

Ob motil oder sensorisch, Zilien sind für viele Körperfunktionen unerlässlich. Daher verursachen (motile) Ziliopathien gravierende Störungen diverser Körperfunktionen.

Die dazugehörige *Primäre ziliäre Dyskinesie* (PCD) stellt mit momentan über 40 identifizierten Genen eine heterogene Gruppe aus Gendefekten dar, die die Biogenese, Struktur und Funktion der Zilien beeinträchtigen (12,27). Die Häufigkeit wird auf 1:10.000 bis 1:20.000 geschätzt. Zu den häufigsten Störungen der PCD gehören Sequenzvarianten in Genen wie *DNAH5*, das für eine schwere Kette im äußeren Dyneinarm (ODA, *outer dynein arm*) kodiert und bei Defekten zu axonemalen Strukturdefekten der Zilien führt (28).

Unter RGMC (*reduced generation of multiple motile cilia*) wird die erheblich verringerte Anzahl motiler Zilien pro ziliierter Zelle verstanden, wobei die wenigen ausgebildeten Zilien funktionstüchtig sind. Zentrales Abgrenzungsmerkmal zur PCD stellt hier, im Gegensatz zu strukturellen Defekten, die in der Ziliogenese mangelhaft stattfindende Generierung der Basalkörper dar (9). In manchen Arbeiten wird statt vom RGMC Syndrom von der ziliären Aplasie gesprochen. Allerdings sind in der hier untersuchten Kohorte vereinzelt Zilien ausgebildet, weshalb in dieser Arbeit der Begriff des RGMC Syndroms benutzt wird.

Mukoziliäre Clearance

Ungefähr 200 etwa sechs μm lange Zilien sind am apikalen Zellpol jeder zilierten respiratorischen Zelle lokalisiert, welche das Lumen des Atemtrakts auskleiden und mit einem koordinierten oral gerichteten Schlagmuster von abgeschilferten Zellen, eingeatmeten Fremdkörpern und Mikroben befreien (1,3,4). Das nennt man *mukoziliäre Clearance* (vgl. Abbildung 5).

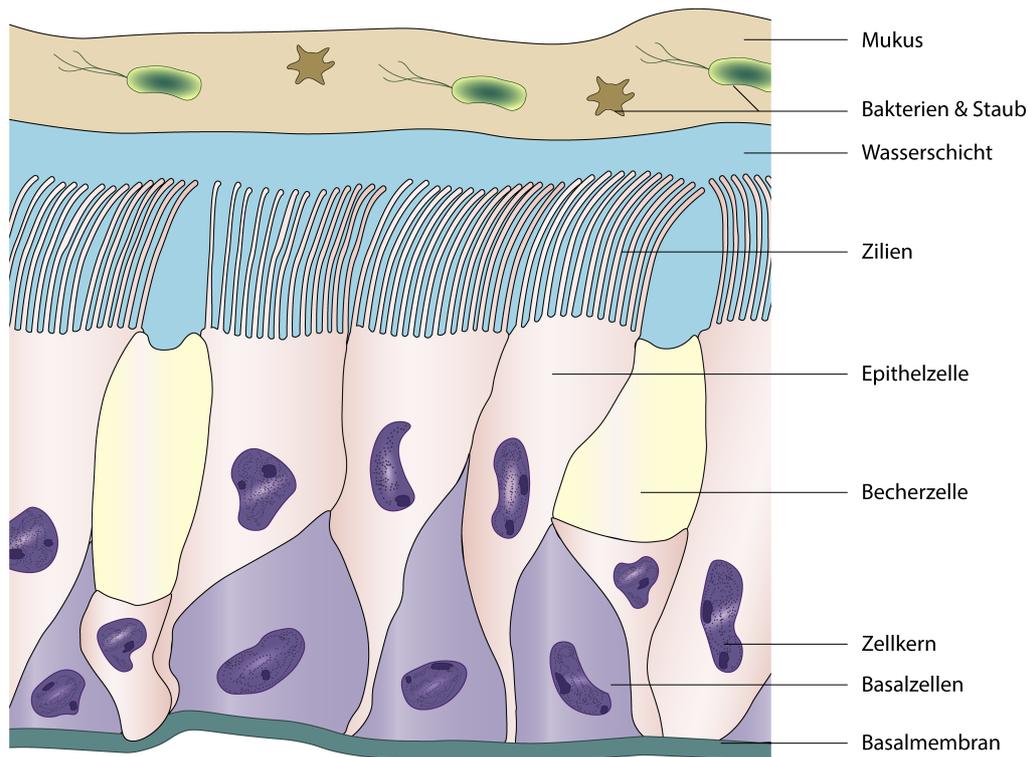


Abbildung 5: Schematische Darstellung des respiratorischen Flimmerepithels

Die Epithelzellen kleiden mit ihrem dichten Ziliensaum den Atemtrakt aus. Dazwischen liegen die Schleim sezernierenden Becherzellen. In einer Schicht aus Wasser und Mucus befinden sich inhalierte Fremdkörper wie Bakterien, Pollen und Staub.

Ohne diesen lebenswichtigen Abwehrmechanismus kann der nicht abgehustete Schleim zu Infektionen und irreversiblen Schäden führen (s. Abbildung 6) (12). Eine gestörte *mukoziliäre Clearance* ist meist auf eine ziliäre Dysfunktion oder gesteigerte Viskosität des Sputums zurückzuführen (12). Letzteres ist bei der *zystischen Fibrose* bzw. *Mukoviszidose* der Fall. Sie ist mit einer Häufigkeit von 1:2000 – 1:3000 die dabei am häufigsten zugrundeliegende Krankheit. Ein Defekt im CFTR-Kanal verhindert durch den mangelnden Chlorideinstrom die Verdünnung des Schleims und führt somit zu einer Atemwegsverlegung (29). Daher ähnelt die Symptomatik der motilen Ziliopathien sehr der der weitaus bekannteren *Mukoviszidose*.



Abbildung 6: Pathophysiologie der mukoziliären Clearance Störung

Die Pathophysiologie der mukoziliären Clearance Störung verläuft im Teufelskreis. Akute/Chronische Infektionen führen über Entzündungsmediatoren und Ausschüttung von Zytokinen zu einem veränderten Milieu, in dem Ionenaustauscher und Transporter der Zilienmembran ihre Funktion nicht mehr korrekt ausführen können. Das resultierende Remodelling der Atemwege begünstigt wiederum erneute Infektionen.

Hydrozephalus

Neben den Atemwegen werden auch die Ventrikel von multizilierten Ependymzellen ausgekleidet. Diese erzeugen einen laminaren Strom des im Ventrikelsystem befindlichen *Liquor cerebrospinalis*, der den *Aquaeductus mesencephali*, die Verbindung des dritten mit dem vierten Ventrikel, offenhält. *Ibañez-Tallon et al. 2004* schlossen nach Untersuchungen von *Mdnah5* mutierten Mäusen mit ausgeprägtem Hydrozephalus darauf, dass die Abnahme des Liquorstroms durch mangelhaften Zilienschlag zum Verschluss des Ventrikelsystems führen kann. Die stetige Liquorproduktion durch die *Plexus choroidei* kann in diesem Falle zu einer Volumenzunahme der Ventrikel mit konsekutiver Druckzunahme führen (30). Des Weiteren führt auch die verminderte ependymale Resorption von Liquor bei verminderter Zilienzahl zur Ausbildung eines Hydrozephalus (24).

Infertilität

Im Vergleich zur PCD sind wenig Daten bezüglich der Infertilität betroffener Patienten/Patientinnen mit Ziliogenesestörungen vorhanden. Da Monozilien i.d.R. korrekt ausgebildet sind, wird davon ausgegangen, dass die Spermienmotilität nicht betroffen ist. Dennoch könnte der Spermientransport der noch unreifen bewegungsunfähigen Spermien vom *rete testis* (Hoden) zum *Epididymis* (Nebenhoden) beeinträchtigt sein, da diese für den Transport auf die Zilien der *Ductuli efferentes* angewiesen sind. Bei der Frau sind Zilien am Transport der Eizelle durch den Eileiter beteiligt, weshalb ebenfalls von einer erhöhten Infertilität berichtet wird (3,22). In Mausmodellen zeigte sich bei *CCNO*^{-/-} männlichen sowie weiblichen Individuen eine hohe Penetranz an Infertilität (24).

1.3 Klinik

Die Symptome sind in Ausprägungsform und -stärke abhängig von dem zugrundeliegenden Defekt, sodass nicht jeder Patient die gleichen Symptome zeigt. Dennoch bestehen starke Überschneidungen innerhalb der Gruppe motiler Ziliopathien. Die European Respiratory Society (ERS) empfiehlt daher, beim Vorliegen folgender Symptome, eine PCD Diagnostik durchzuführen: persistierender feuchter Husten, Situsanomalien, angeborene Herzdefekte, persistierende Erkältung und Entzündung der oberen Atemwege, chronische Mittelohrentzündung mit und ohne Hörverlust, medizinische Vorgeschichte von Symptomen des oberen und unteren Atemtrakts sowie intensivmedizinische Behandlungen im Neugeborenenalter (31). Die Empfehlungen der ERS rücken die respiratorischen Symptome in den Fokus. Obwohl diese im Vordergrund stehen, sind, je nach Defekt, auch weitere Organsysteme betroffen.

Neben einigen Überschneidungen der Symptome in der Gruppe der Störungen mukoziliärer Clearance grenzen sich die Symptome der Ziliogenesedefekte von denen der PCD oder zystischen Fibrose ab.

Sowohl in Kohorten mit *MCIDAS*- als auch mit *CCNO*-Mutationen treten typische Zeichen mukoziliärer Clearance-Störungen auf, darunter Infektionen der oberen und unteren Atemwege, Otitis media, chronische Pneumonien, Bronchiektasen und Obstruktionen. Manche Patienten/Patientinnen werden dauerhaft sauerstoffabhängig. Nahezu alle

Patienten/Patientinnen leiden als Neugeborene am Atemnotsyndrom (IRDS, *infant respiratory distress syndrom*) (3,22,25).

Ein selteneres Symptom stellt die Infertilität dar. Während dies bei PCD-Erkrankten gut untersucht ist, ist die Datenlage für RGMC Kohorten gering. Im Mausmodell zeigt sich, dass *ccno*-deletierte Individuen beider Geschlechter infertil sind. Eine verminderte Zahl an MCCs in den Eileitern konnte ebenfalls nachgewiesen werden (24). In einer von *Boon, Wallmeier et al.* untersuchten Kohorte mit *MCIDAS* Defekten litt eine Frau an Infertilität (3). Männer sind, soweit bekannt, durch immotile Spermien bei strukturellen Ziliopathien unfruchtbar.

Im Gegensatz zu axonemalen Störungen wie der PCD weisen Patienten/Patientinnen mit generell reduzierter Anzahl multizilierter Zellen bei Ziliogenesedefekten keinen *Situs inversus*, d.h. eine spiegelverkehrte Anordnung der inneren Organe, auf. Die Asymmetrie der Körperhälften entsteht im embryonalen Knoten durch einen von motilen Monozilien generierten linksgerichteten Strom, der wiederum von einer sensorischen Zilie detektiert wird (23). Sind diese Zilien defekt, kann es in 50 % der Fälle zu einer spiegelbildlich veränderten Anordnung der inneren Organe kommen. Die Kombination aus *Situs inversus* und *PCD* nennt man *Kartagener Syndrom* (32). Da bei *CCNO* und *MCIDAS* Defekten zwar eine verminderte Anzahl Zilien gebildet werden, diese aber strukturell intakt sind, können motile Monozilien dennoch korrekt ausgebildet werden, wodurch Patienten/Patientinnen eine normale Links-Rechts-Symmetrie, den *Situs solitus*, aufweisen (3,22,25).

1.4 Diagnostik

Da die Diagnostik motiler Ziliopathien unterschiedlicher Methoden bedarf, gibt es derzeit keinen Goldstandard (31,33). Daher hat die European Respiratory Society (ERS) einen Algorithmus zur Diagnose der PCD, unter Einbeziehung der Klinik, Nasaler NO Messung, Analyse des ziliären Schlagmusters und Schlagfrequenz mithilfe der Hochfrequenzvideomikroskopieanalyse (HVMA), Transmissionselektronenmikroskopie (TEM), Genanalyse sowie Immunfluoreszenz, herausgegeben (31). Aufgrund der klinischen Ähnlichkeit der PCD zum RGMC Syndrom lassen sich die Methoden auch hier anwenden.

1.4.1 Nasale NO Messung

Eine verlässliche und mittlerweile gut implementierte Untersuchung ist die nasale Messung von Stickstoffmonoxid (nNO) (22,34). NO ist ein reaktives Signalmolekül mit kurzer Halbwertszeit, das an vielen intra- und extrazellulären Prozessen im Körper beteiligt ist (Abwehr von Mikroorganismen, Blutdruckregulation u.w.) (12). In einer Metaanalyse von *Collins et al. 2014* sind die nNO-Werte von 478 PCD-Patienten/Patientinnen ausgewertet worden. Mit einem Mittelwert von $19,4 \pm 18,6$ nl/min beträgt dieser nur etwa 10 % des NO-Werts gesunder Kontrollprobanden ($265,0 \pm 118,9$ nl/min) (12). Auch bei Erkrankten mit nachgewiesener *CCNO/MCIDAS* Mutation ist der mittlere NO Messwert mit $32,9 \pm 52,33$ nl/min deutlich erniedrigt (22). Der genaue Pathomechanismus reduzierter nNO Werte ist noch nicht geklärt (12). Diskutiert werden u.a. eine mechanische Entkopplung zwischen der *NO-Synthase* und der *Dynein-ATPase*, durch chronische Sinusitis eingeschlossenes NO (NO wird vor allem in den oberen Atemwegen in den Sinus synthetisiert) oder eine reduzierte Produktion von NO aufgrund aplastischer/hypoplastischer Sinus diskutiert (12).

Mit der nNO Messung existiert eine vergleichsweise einfache und verfügbare Methode, den Verdacht auf eine motile Ziliopathie zu erhärten. Bei Werten unter 77 nL/min gilt diese als wahrscheinlich (34,35).

1.4.2 HVMA

Die Hochfrequenzvideomikroskopieanalyse (HVMA) ist Teil der Standarddiagnostik der motilen Ziliopathien. Dabei werden Zilien multizilierter respiratorischer Epithelzellen, die mittels Nasenbürstung gewonnen werden, zunächst hochauflösend in Echtzeit aufgenommen (36). Die anschließende Wiedergabe in Slow-Motion ermöglicht eine detaillierte Analyse des Schlagmusters und der Schlagfrequenz und somit erste Rückschlüsse auf den zugrundeliegenden Defekt (12,34).

1.4.3 TEM

Die Transmissionselektronenmikroskopie (TEM) ermöglicht die Untersuchung von ziliären Querschnittpräparaten auf unterschiedliche Defekte, die mit der PCD in Verbindung stehen. Während diese Methode bei isolierten Defekten der Outer Dynein Arms (ODA) oder kombinierten Inner / Outer Dynein Arms (IDA / ODA) Defekten verlässliche Ergebnisse liefert,

ist sie bei Defekten, die die Nexinlinks, die Radialspeichen und insbesondere Ziliogenesedefekte betreffen zur alleinigen Diagnosestellung ungeeignet (34). Bei letzterem geben lediglich die Anwesenheit, Lokalisation und Anzahl der Zilien sowie Basalkörper Anhaltspunkte für Defekte in Ziliogenesefaktoren (3,25).

1.4.4 Genetik

Die Differenzierung zwischen primärer und sekundärer (bspw. bei akutem Infekt) Reduktion multipler motiler Zilien kann mit Hilfe der Gendiagnostik erfolgen. Da jedoch die Zahl der identifizierten krankheitsverursachenden Mutationen stetig steigt, können Sequenzierungen nicht als Ausschlussmethode verwendet werden. Zudem ist die Sensitivität bei über 40 bekannten PCD Genen und >700 Exonen stark untersucherabhängig, da zufällige Polymorphismen von Mutationen unterschieden werden müssen (34). Durch moderne Analysen wie dem Next-Generation-Sequencing ist es möglich, etwa 60 % der krankheitsverursachenden Mutationen zu identifizieren. Schwächen zeigt die Methode etwa bei großen heterozygoten Deletionen sowie Duplikationen (31,34).

1.5 Therapie

Da aktuell keine Daten aus randomisierten klinischen Studien bezüglich der Therapie der PCD vorliegen, orientieren sich die Behandlungsstrategien an denen der *zystischen Fibrose* (27). Zentrale Bestandteile der Therapie sind die Verbesserung der mukoziliären Clearance durch Inhalation hypertoner Salzlösung sowie eine angepasste antibiotische Therapie. Eine kausale Therapie existiert zurzeit nicht. Häufig nachgewiesene Erreger sind *Haemophilus influenzae*, *Moraxella catarrhalis*, *Staphylococcus aureus* und *Streptococcus pneumoniae*. Auch wenn keine generelle Empfehlung für operative Eingriffe ausgesprochen wird, kann bei fortschreitender Erkrankung im Endstadium eine beidseitige Lungentransplantation nötig werden (34).

2 Material

2.1 Chemikalien und Antikörper

Tabelle 2: Chemikalien

Chemikalie	Bezeichnung	Hersteller
100 bp Ladder	Gene Ruler 100bp plus DNS Ladder 0,5 µg/µl 50 µg	Thermo Fisher Scientific Germany BV & Co KG, Braunschweig
Agarose	Biozym LE-Agarose	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
Big Dye	BigDye Terminator V.3.1 Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer Inc., Waltham, USA
DNA-Polymerase	GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega GmbH, Mannheim
dNTPs	100 mM dNTP Set, PCR Grade (10297-018)	Thermo Fisher Scientific (Invitrogen), Waltham, USA
Ethidiumbromid	Ethidiumbromidlösung 0,025 %	CARL ROTH GMBH + CO. KG, Karlsruhe
EXO/SAP	ExoSAP-IT®	Affymetrix (Thermo Fisher Scientific), Santa Clara, USA
H₂O	H ₂ O	AppliChem GmbH, Darmstadt
Ladepuffer	5X Green GoTaq® Flexi Reaction Buffer	Promega GmbH, Mannheim (Madison-USA)
MgCl₂	Magnesium Chloride Solution	Promega GmbH, Mannheim (Madison-USA)
PCR-Puffer	5X Colorless GoTaq® Flexi Reaction Buffer	Promega GmbH, Mannheim
Primer	s. Anhang Tabelle 13	metabion international AG
Sephadex	illustra™ Sephadex™ G-50 fine DNA Grade	GE Medical Systems Deutschland GmbH & Co. KG, Solingen
Sequenzier-Puffer	BigDye Terminator V.3.1 Cycle Sequencing Kit	Perkin Elmer Inc, Waltham, USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 5: Verbrauchsmaterialien

Material	Bezeichnung	Hersteller
Reaktionsgefäß, 1,5 ml	Reagiergefäß 1,5 ml SafeSeal	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Reaktionsgefäß, 5 ml	Eppendorf Tubes® 5.0 mL Eppendorf Quality™	Eppendorf AG, Hamburg
Falcons, 15 ml	Polystyrene Tubes, Screw cap, conical bottom	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Falcons, 50 ml	Corning® Centrifuges Tubes with CentriStar™ Cap	Corning Incorporated, New York, USA
Handschuhe	Vasco® sensitive, unsteriler puderfreier Untersuchungshandschuh aus Naturlatex	B. Braun Melsungen AG, Melsungen
PCR-8er Streifen	Multiply® µ-Strip	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Pipetten Pipet-Boy	Costar® Stripette® 5 ml, 10 ml, 25 ml	Corning Incorporated, New York, USA
Pipettenspitzen	Quality Pipette Tips 100-1000 µl	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht
Sephadex Platte	MultiScreen®-HV, 96 Well-Plates	Merck KGaA, Darmstadt
Sephadex Ladeplatte	MultiScreen® Filtration System, column loader	Merck KGaA, Darmstadt

2.3 Geräte und Programme

Tabelle 6: Geräte

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Geldokumentationssystem	E-BOX VX2 2.0 MP Geldokumentationssystem	VWR International GmbH, Life Science Competence Center, Erlangen
Gelelektrophoresegerät	peqPOWER E300 Power Supply - 230 VAC	VWR International GmbH, Life Science Competence Center, Erlangen
Gelwanne	PerfectBlueGelsystem Mini L	VWR International GmbH, Life Science Competence Center, Erlangen
Millipore-Anlage	Milli-Q Integral Wasseraufbereitungssystem	Merck KGaA, Darmstadt

Mini-Zentrifuge	Sprout® Mini-Centrifuge, 220-230 VAC, 50/60 Hz	Heathrow Scientific LLC, Illinois, USA
PCR-Maschine I	BIO RAD T100TM Thermal Cycler	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
PCR-Maschine II	MJ-Research PTC-200 Peltier Thermal Cycler	Biozym Scientific GmbH, Hessisch-Oldendorf
Pipetten	Transferpette® S, Variabel	Brand GmbH + CO KG, Wertheim
Tischzentrifuge, 24 Proben	Microcentrifuge 2454	Eppendorf AG, Hamburg
Waage	Mettler PE3600 Delta Range R	Mettler-Toledo GmbH, Gießen

Tabelle 7: Programme

Programm	Firma
Adobe Creative Suite CS4	Adobe Systems, San José, USA
CodonCode Aligner Version 4.2.7	CodonCode Corporation, Centerville, USA
Ensembl	Wellcome Trust Sanger Institute & European Bioinformatics Institute, UK
GeneCards	LifeMap Sciences, Inc., Alameda, USA

3 Methoden

3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist eine Methode zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten. Mittels Primer lassen sich diese sehr präzise bestimmen und somit größere Mengen bestimmter Genabschnitte herstellen. Das Grundprinzip besteht aus einer initialen Denaturierung des DNA Doppelstrangs bei 94 °C, gefolgt von einer Abkühlung auf meist 60 °C, bei der sich die Primer anlagern (sog. *Annealing*). Diese Temperatur kann abweichen und hängt von der Zusammensetzung der Primer ab. Bei 72 °C hat die *Taq-Polymerase* ihr Temperaturoptimum und beginnt, die DNA Einzelstränge von 5' nach 3' komplementär zum template durch den Einbau von *dNTPs* zu verlängern. Die verwendeten Primer sind in Tabelle 13 aufgelistet. Der verwendete PCR-Ansatz setzt sich wie in Tabelle 1 gelistet zusammen.

Tabelle 1: PCR Ansatz

Komponente	Menge (in µl)
Template-DNA	3 µl (10 ng/µl)
Forward Primer	5 µl
Reverse Primer	5 µl
Puffer	10 µl
MgCl ₂	3 µl
dNTPs	3 µl
H ₂ O	20,7 µl
DNA-Polymerase	0,3 µl
Gesamtmenge	50 µl

Folgendes PCR-Programm wurde verwendet:

Tabelle 2: PRC-Programm

Ablauf	Temperatur	Zeit
Initiale Denaturierung	94 °C	3 Min.
Denaturierung	94 °C	30 Sek.
Anlagerung	60 °C	30 Sek.
Elongation	72 °C	1 Min.
Finale Elongation	72 °C	10 Min.
Abkühlen	8 °C	∞

} 32 ×

Im Zuge der Bridge PCR (s.u.) ist ein abgewandelter PCR Ansatz verwendet worden, der zum einen statt der 20,7 µl Wasser nur 10,7 µl sowie 10 µl CES Puffer, als auch statt einer Annealing Temperatur von 60 °C einen Gradienten von 58-62 °C vorsieht. Ebenso wurde die Elongationszeit aufgrund der hohen zu erwartenden Produktgröße von 1 Minute auf 1:30 Minuten erhöht.

Anschließend erfolgt die Darstellung der amplifizierten DNA-Fragmente nach Ladung und Größe mit Hilfe der Gelelektrophorese. Dabei wandern in einem Agarosegel nach Anlegen einer Spannung kleinere Fragmente schneller Richtung Anode als größere. Diese wurden zuvor mit einem unter UV-Licht fluoreszierendem Elektrophoresepuffer versetzt, mit dessen Hilfe durch die Laufweite der Banden im Vergleich zum DNA Standardmarker (sog. *Ladder*) die Größe der DNA-Fragmente geschätzt werden können. Die Standardeinstellungen, die während dieser Arbeit verwendet worden sind, betragen 10 V/cm (120 V) bei 30 Minuten sowie einer Markergröße von 100 bp.

3.2 Sanger Sequenzierung

Die Sanger Sequenzierung ermöglicht eine basengenaue Darstellung mittelkettiger DNA-Fragmente bis etwa 650 bp. Im Vergleich zur PCR werden hier statt der dNTPs in zufälliger Abfolge auch ddNTPs eingebaut, die einen Syntheseabbruch herbeiführen. Hierbei entstehen verschieden lange DNA-Fragmente, die am 3'-Ende (je nach Base) unterschiedliche Fluoreszenzmarkierungen tragen. Ein Detektor erkennt die spezifischen Lichtemissionen, anhand derer die Basensequenz abgelesen werden kann.

Zunächst erfolgt nach der PCR/Gelelektrophorese zur Überprüfung der Qualität des PCR-Produktes die Aufreinigung des restlichen PCR-Produktes mittels EXO/SAP. Dabei handelt es sich um das Enzym Exonuklease I, welches überschüssige Primer und dNTPs beseitigt. Drei µl PCR-Produkt werden dafür mit 1,5 µl EXO/SAP vermengt und bei jeweils 15 Minuten auf erst 37 °C (enzymatische Reinigung) und dann 80 °C (Inaktivierung der Exonuklease) erhitzt.

Tabelle 3: Aufreinigung mit EXO/SAP

Temperatur	Zeit
37 °C	15 Min.
80 °C	15 Min.

Die Sequenzierungsreaktion erfolgt im Anschluss mit diesem Ansatz:

Tabelle 4: Ansatz Sequenzierungsreaktion

Komponente	Menge (in µl)
Aufgereinigtes PCR-Produkt	4,5 µl
H ₂ O	1,5 µl
Primer (F oder R)	1 µl
5x Sequenzier-Puffer	2 µl
Big Dye	0,75 µl

Tabelle 5: Sequenzierungsprogramm

Temperatur	Zeit
96 °C	2 Min.
50 °C	5 Sek.
60 °C	2 Min.
94 °C	10 Sek.
14 °C	∞

} 25 x

Die Fluoreszenzdetektion wurde vom Zentrallabor des Uniklinikum Münster durchgeführt. Die Auswertung der Sequenzen erfolgte mit dem Programm *CodonCode Aligner* (s. Abbildung 7). In Abgleich mit einer Referenzsequenz markiert das Programm alle Abweichungen in der vorliegenden Probe. Die grafische Darstellung der Lichtemissionen erleichtert es dem Nutzer

3.3 Bridge PCR

Eine Bridge PCR wird angewandt, wenn die unklare Lokalisation einer Deletion die Eingrenzung auf eine amplifizierbare PCR Produktgröße nicht erlaubt. Die Methode wird am Beispiel der Bruchpunktsuche des Patienten OP-1975 II1 mit einer homozygoten Deletion im Bereich der Exone 1-4 des Gens *MCIDAS* vorgestellt.

Zur Identifikation der Bruchstellen wird zunächst ein Primerpaar erstellt, das beide Bruchstellen abdeckt. Bei Verwendung des F-Primers Exon 1 und des R-Primers Exon 5 wäre die technisch amplifizierbare Produktgröße von etwa 800 bp überschritten worden. Daher folgte im nächsten Schritt das Erstellen mehrerer Primerpaare, die vor der zu erwartenden Bruchstelle in der Upstreamsequenz von Exon 1 und nach der Bruchstelle im Intron zwischen Exon 4 und 5 liegen. Das den Bruchstellen am nächsten liegende Primerpaar, das ein Produkt in der PCR erzeugte, wurde in der nachfolgenden Sequenzierung benutzt (s. Abbildung 8).

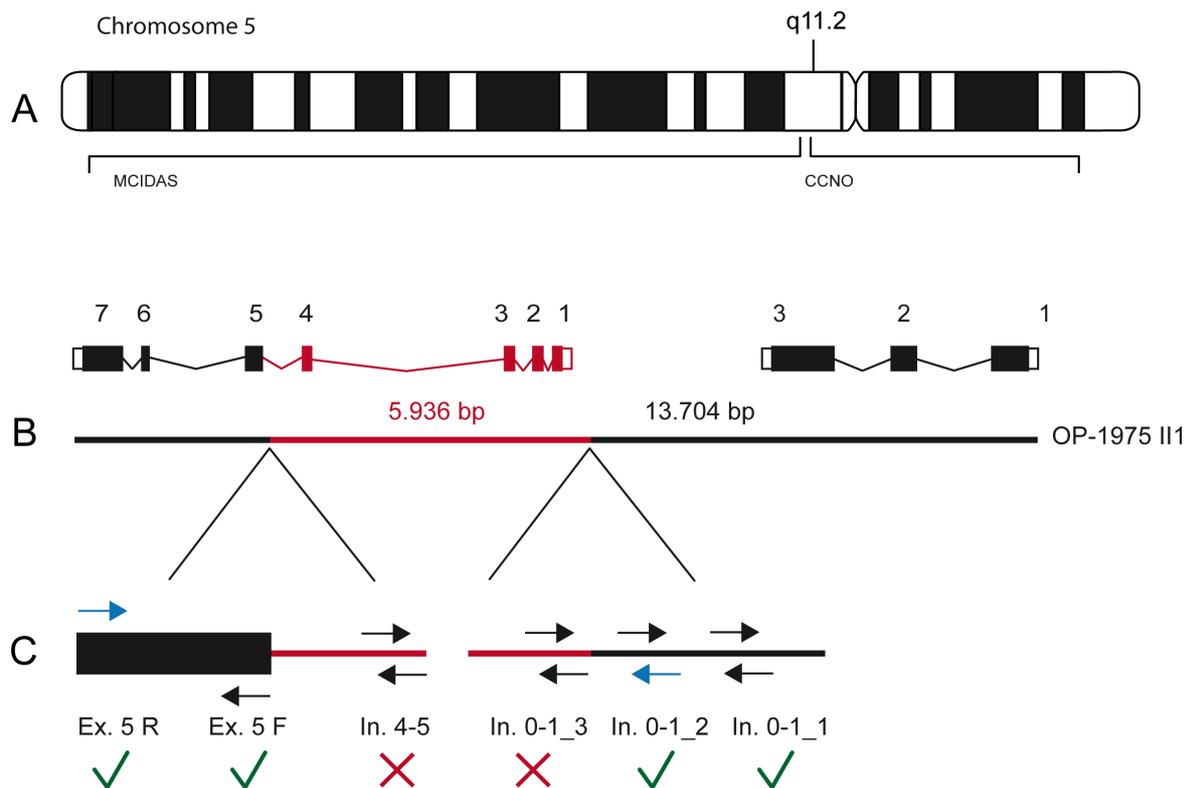


Abbildung 8: Schematische Darstellung der vermuteten Position der Bruchstellen

(A) Dargestellt sind die Gene *CCNO* und *MCIDAS*. **(B)** Rot hinterlegt ist die Deletion *MCIDAS* Exon 1-4 des Patienten OP-1975 II1. **(C)** Schematische Darstellung der Lage der Primerpaare (Pfeile). Ein Paar liegt im Intron zwischen Exon 4 und 5, drei in der Upstreamsequenz zu Exon 1. Zwei der Primer (In. 4-5 und In. 0-1_3) ergeben kein Produkt in der Patienten-DNA, jedoch in gesunder Kontroll-DNA (s. Abbildung 9). Die blau markierten Pfeile markieren das verwendete Primerpaar zur Amplifikation desjenigen Abschnitts, in dem die Bruchstellen enthalten sind.

Nach der Durchführung einer PCR mit jedem Primerpaar, wird eine Gelelektrophorese durchgeführt (s. Abbildung 9). Hier zeigte sich, dass die Primerpaare *In4-5* sowie *In0-1_3* bei Benutzung von Patienten-DNA kein Produkt ergaben und damit mindestens ein Primer pro Paar bereits im Bereich der Deletion liegen musste.

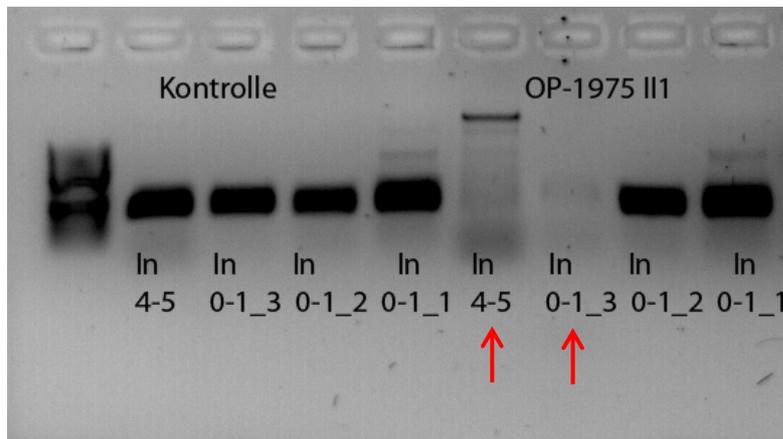


Abbildung 9: Gelelektrophorese des Primertests

Links im Bild erscheint bei Verwendung von Kontroll-DNA für jedes Primerpaar eine Bande. Rechts im Bild funktioniert die PCR mit Patienten-DNA nur mit den in der Upstreamsequenz von der Bruchstelle entfernter liegenden Primern. Die Primerpaare ohne Produkt (s. rote Pfeile) liegen bereits im Bereich der Bruchstelle.

Es erfolgte die abschließende Sequenzierung unter Verwendung des Primerpaars *In0-1_2 F* und *Exon 5 R*.

3.4 PCR Primer Design

Die Primer wurden mit Hilfe des Webprogramms *Primer-3* mit folgenden Parametern erstellt: Produktgröße: 200-500 bp (Max. tolerierter Bereich 150-800 bp), Annealing Temperatur: 60 °C (± 3 °C), Primer Größe: 20 bp (Max. tolerierter Bereich 18-27 bp).

Eine vollständige Liste der in dieser Arbeit verwendeten Primer findet sich im Anhang (s. Tabelle 13).

4 Ergebnisse

4.1 Fragestellung

In dieser Arbeit ist die genetische Untersuchung einer Patientenkohorte durchgeführt worden, bei der der Verdacht auf Mutationen in Ziliogenesefaktoren bestand. Eingeschlossen wurden Patienten/Patientinnen mit Verdacht auf eine Ziliopathie, bei denen im Rahmen der Labordiagnostik mittels Hochfrequenzvideomikroskopieanalyse (HVMA) sowie Immunfluoreszenzmikroskopie (IF) eine Reduktion multipel motiler Zilien (RGMC) auffiel. 45 Patienten/Patientinnen aus 40 Familien sind auf Defekte in den drei Exonen von *CCNO* sowie sieben Exonen von *MCIDAS* sequenziert worden. Innerhalb dieser Kohorte sind mit 58 % (n = 11) der Großteil der Eltern der Patienten/Patientinnen miteinander verwandt, bei 26 % (n = 5) handelt es sich um nicht verwandte Eltern. Alle Patienten/Patientinnen mit konsanguinen Eltern tragen homozygote Mutationen. In 21 % der Fälle (n = 4) konnte der Stammbaum nicht ausreichend zurückverfolgt werden. Diese Arbeit soll untersuchen,

- ob Mutationen gehäuft in *Hotspots* nachgewiesen werden können,
- ob identische Mutationen auf eine Foundermutationen zurückzuführen sind,
- wie häufig *MCIDAS* und *CCNO* Mutationen in RGMC-Patienten/Patientinnen nachweisbar sind,
- welche klinischen Auffälligkeiten vorliegen.

4.2 Ergebnisse der *CCNO* und *MCIDAS* Sequenzierungen

4.2.1 Mutationen

In 19 von 45 untersuchten Patienten/Patientinnen aus 17 Familien sind Mutationen nachweisbar, wovon 17 homozygot und zwei compound heterozygot vorliegen. Am häufigsten (18 Allele) sind Frameshift-Mutationen mit Insertionen, am zweithäufigsten mit 14 Allelen sind Missense-Mutationen nachgewiesen. Die Missense-Mutation ist eine Punktmutation, bei der eine einzelne Base ausgetauscht ist, sodass ein Aminosäureaustausch resultiert. Das Leseraster bleibt unverändert. Eine Insertion hingegen führt, wenn die Anzahl der eingefügten Basen nicht durch drei teilbar ist, zu einer Verschiebung des Leserasters (Frameshift-Mutation). Die Folge sind veränderte Aminosäuren sowie frühe Stoppcodons. Vier Patienten-Allele sind im Bereich des Intron-/Exon-Übergangsbereichs (engl. *Splicesite*) verändert. Die *Splicesite* ist definiert als die je zwei konservierten intronischen Basen vor und

nach dem Exon. Mutationen in diesem Bereich führen, im Gegensatz zu anderen intronischen Mutationen, häufiger zu phänotypisch relevanten Veränderungen, da fehlerhaftes Spleißen beispielsweise zum Überspringen eines Exons führen kann. Weitere zwei Allele tragen Deletionen. Dabei können einzelne Basen oder, wie bei diesem Patienten, ganze Exone fehlen. Einen Überblick über die Häufigkeitsverteilung gibt Abbildung 10.

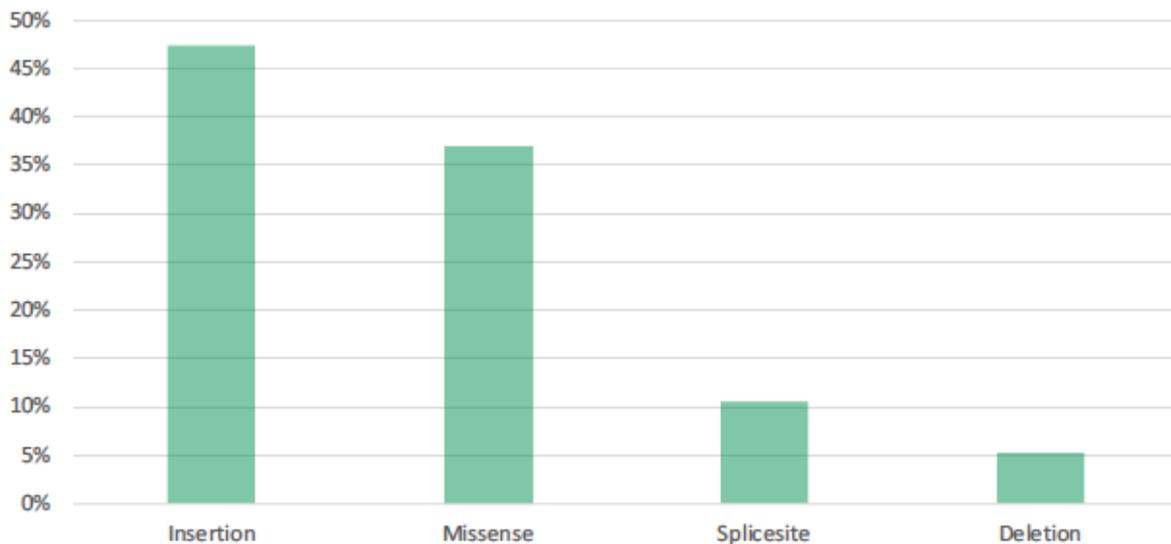


Abbildung 10: Übersicht über nachgewiesene Mutationen

Das Säulendiagramm zeigt die Anteile nachgewiesener Mutationen. Insertionen sind am häufigsten, gefolgt von Missense-Mutationen.

Der Großteil der *CCNO* Mutationen (14/16) liegt homozygot vor. Nur zwei der *CCNO* Mutationen sind compound heterozygot. Exon 1 ist mit 9/14 Patienten/Patientinnen am häufigsten betroffen, in Exon 3 können 5/14 Patienten/Patientinnen positiv getestet werden. Auffällig ist, dass, deckungsgleich mit aktuellen Publikationen (2,23), in Exon 2 nur compound heterozygote Mutationen gefunden wurden (2/14 Patienten/Patientinnen).

Von den fünf positiv getesteten *MCIDAS* Patienten/Patientinnen tragen drei den gleichen homozygot vorliegenden Defekt in Exon 7 (c.1150C>T, p.Pro384Ser), wobei zwei Patienten/Patientinnen Geschwister sind. Eine weitere Mutation liegt auf Exon 3 ebenfalls homozygot vor. Die größte Mutation (1-1381_382+379del; hom) der getesteten Kohorte erstreckt sich von Exon 1 bis 4 beim Patienten OP-1975 II1. Eine Übersicht über alle identifizierten Mutationen ist in der folgenden Tabelle 6 sowie in Abbildung 11 dargestellt.

Tabelle 6: Übersicht über nachgewiesene Mutationen

Patienten ID	Gen & Exon	cDNA	Protein	Mutationstyp
OP-1532 II1	<i>CCNO</i> Ex.3	c.716A>G hom.	p.His239Arg hom.	Missense
OP-1574 II1	<i>CCNO</i> Ex.1	c.252_253insTGCCC hom.	p.Gly85Cys*10 hom.	Frameshift
OP-1574 II2	<i>CCNO</i> Ex.1	c.252_253insTGCCC hom.	p.Gly85Cys*10 hom.	Frameshift
OP-1574 II3	<i>CCNO</i> Ex.1	c.252_253insTGCCC hom.	p.Gly85Cys*10 hom.	Frameshift
OP-1849	<i>CCNO</i> Ex.3	c.638T>C hom.	p.Leu213Pro hom.	Missense
OP-1977 II1	<i>CCNO</i> Ex.1	c.262_263insGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Frameshift
OP-1982	<i>CCNO</i> Ex.3	c.568-1G>C hom.		Splicesite
OP-219	<i>CCNO</i> Ex.1	c.262_263insGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Frameshift
OP-2235 II1	<i>CCNO</i> Ex.3	c.568 -1 G>C hom		Splicesite
OP-2362 II1	<i>CCNO</i> Ex.1+2	c.267_268insAGCCC + c.398G>T	p.Val90Serfs*5 + p.Arg133Leu	Frameshift + Missense
OP-2364 II1	<i>CCNO</i> Ex.1	c.252_253insTGCCC hom.	p.Gly85Cys*10 hom.	Frameshift
OP-2426 II1	<i>CCNO</i> Ex.3	c.584C>G hom.	p.Pro195Arg hom.	Missense
OP-2562 II1	<i>CCNO</i> Ex.1	c.262_263insGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Frameshift
OP-2693 II1	<i>CCNO</i> Ex.1+2	c.253_262dup10 + c.467T>C	p.Gln88Argfs*51 + p.Leu156Pro	Frameshift + Missense
OP-1869 II1	<i>MCIDAS</i> Ex.3	c.264_265insTA hom.	p.Leu88Tyrfs*34 hom.	Frameshift
OP-1975 II1	<i>MCIDAS</i> Ex.1-4	c.1-1381_382+379del hom.		Deletion
OP-1950 II1	<i>MCIDAS</i> Ex.7	c.1150C>T hom.	p.Pro384Ser hom.	Missense
OP-1950 II3	<i>MCIDAS</i> Ex.7	c.1150C>T hom.	p.Pro384Ser hom.	Missense
OP-1468 II2	<i>MCIDAS</i> Ex.7	c.1150C>T hom.	p.Pro384Ser hom.	Missense

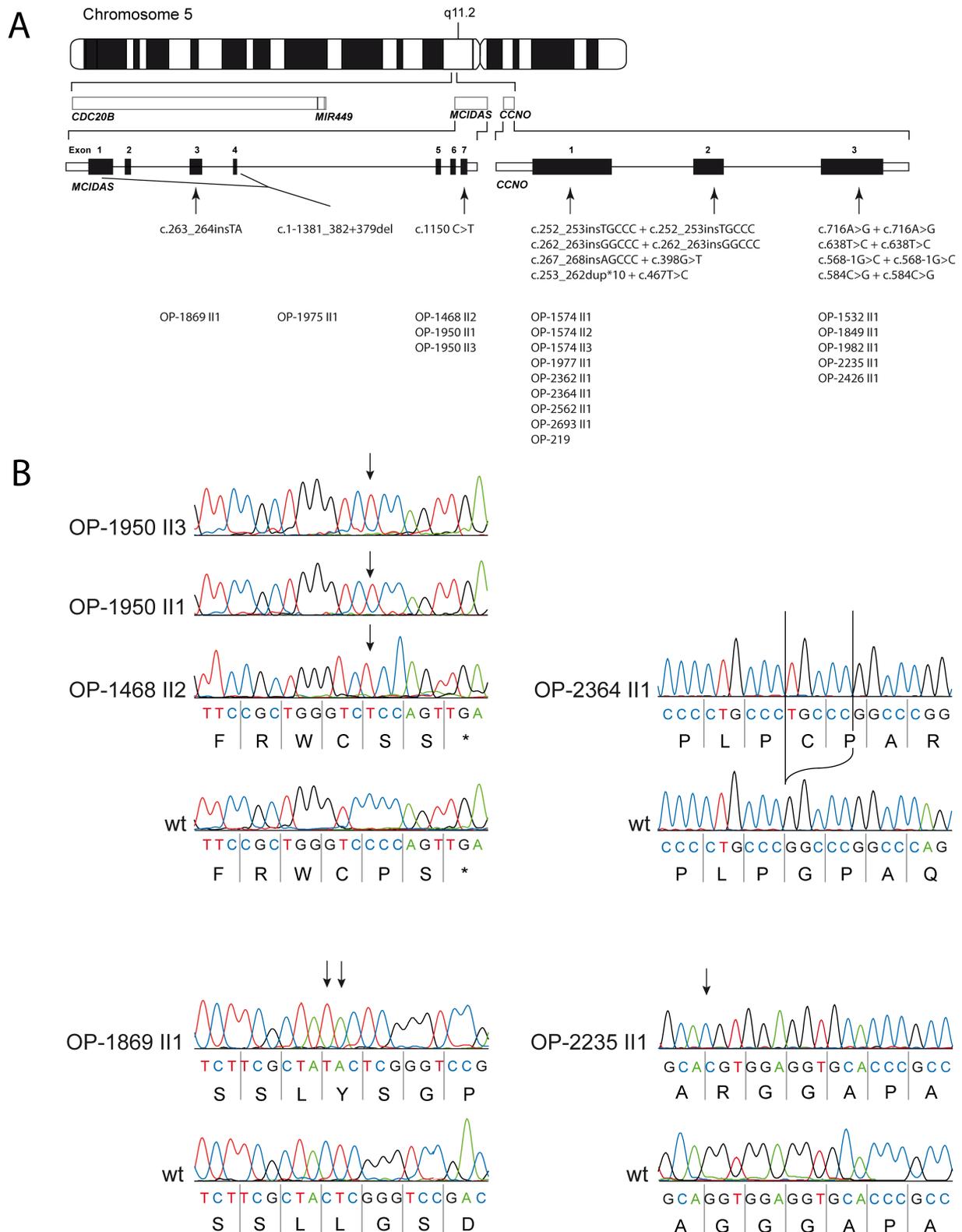


Abbildung 11: Übersicht über *CCNO* und *MCIDAS* Mutationen

(A) Abgebildet sind die sieben bzw. drei Exone der Gene *MCIDAS* und *CCNO* auf Chromosom 5. Die Mutationen sind nach den Patientencodes geordnet, wobei manche Mutationen bei mehreren Individuen auftreten. (B) Die Abbildung zeigt eine Auswahl der veränderten Sequenzen der Patienten/Patientinnen im Vergleich zur Wildtypsequenz (wt) nach Sanger Sequenzierung. Die Pfeile markieren die mutierten Basen.

Von den 13 in dieser Arbeit nachgewiesenen Mutationen sind bislang sechs bekannt, sieben sind noch nicht beschrieben worden (s. Tabelle 7). Die Missensevarianten sind mittels den Programmen *PolyPhen2*, SIFT und *mutationTaster* als wahrscheinlich krankheitsverursachend eingestuft worden (eine detaillierte Auswertung findet sich im Anhang, s. Tabelle 16).

Tabelle 7: In dieser Arbeit neu identifizierte, unpublizierte Mutationen

Gen & Exon	Mutation
CCNO Ex. 2	c.398G>T, p.Arg133Leu het.*
CCNO Ex. 2	c.467T>C, p.Leu156Pro het.*
CCNO Ex. 3	c.568-1 G>C hom.
CCNO Ex. 3	c.584C>G, p.Pro195Arg hom.
MCIDAS Ex.3	c.264_265insTA, p.Leu88Tyrfs*34 hom.
MCIDAS Ex.1-4	c.1-1381_382+379del hom.
MCIDAS Ex.7	c.1150C>T, p.Pro384Ser hom.

*liegt compound heterozygot vor.

4.2.2 Klinischer Phänotyp

Die untersuchten Patienten/Patientinnen zeigen die erwarteten (in Abschnitt 1.3 ausführlich beschriebenen) respiratorischen Symptome mit variierender Ausprägung (vgl. Tabelle 11). 10/19 Patienten/Patientinnen (53 %) sind bereits als Neugeborene mit einem Atemnotsyndrom aufgefallen, 10/19 (53 %) leiden an einer rezidivierenden Otitis media und ebenfalls 10/19 (53 %) an chronischer Sinusitis. Rezidivierende Pneumonien 11/19 (58 %) und Bronchiektasen finden sich in der überwiegenden Zahl der Patienten/Patientinnen. Keiner der Patienten/Patientinnen hat einen Situs inversus. Ein Hydrozephalus ist bei den Patienten/Patientinnen OP-1982 sowie OP-1468 II1 vorhanden.

4.2.3 OP-1975 II1

Klinisch fiel der Patient OP-1975 II1 durch besonders schwere und rezidivierende Pneumonien, chronisch obstruktive Störungen sowie Rhinitiden auf, weshalb nach Durchführung einer IF der Verdacht auf eine Ziliopathie bestand (vgl. Abbildung 12). Es ist ein *Whole exome sequencing (WES)* durchgeführt worden, in der eine große homozygote Deletion in *MCIDAS* Exon 1-4 identifiziert wurde (s. Abbildung 13).

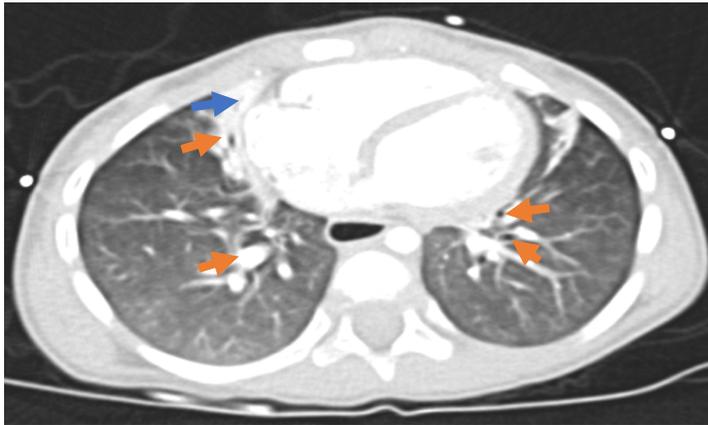


Abbildung 12: CT-Thorax OP-1975 II1

In diesem Ausschnitt einer CT-Thorax Aufnahme des Patienten OP-1975 II1 sind Bronchiektasen (orange) als Folge chronischer Obstruktion und Infektionen zu sehen. Die rechte Lunge zeigt sich an der Vorderwand konsolidiert im Sinne einer Atelektase (blau). Die gesamte Lunge weist Milchglasverschattungen als CT-grafisches Korrelat der Pneumonie auf.

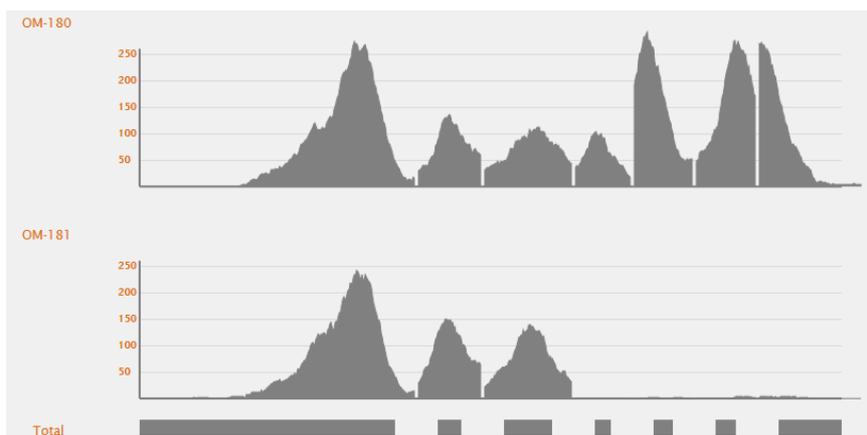


Abbildung 13: Grafische Auswertung des WES von MCIDAS

Jeder Peak repräsentiert Sequenzen, die den *MCIDAS* Exonen eins bis sieben zugeordnet werden konnten, Exon eins rechts im Bild und Exon sieben links. Im oberen Bereich ist eine Gesundheitskontrolle (OM-180) zu sehen. Im unteren Bereich wird die Probe von OP-1975 II1 dargestellt (hier mit OM-181 benannt). Für die Exone 1-4 konnten keine Sequenzen zugeordnet werden.

Die anschließend durchgeführte PCR mit Gelelektrophorese (s. Abbildung 14, A) untermauerte den Verdacht auf besagten Defekt.

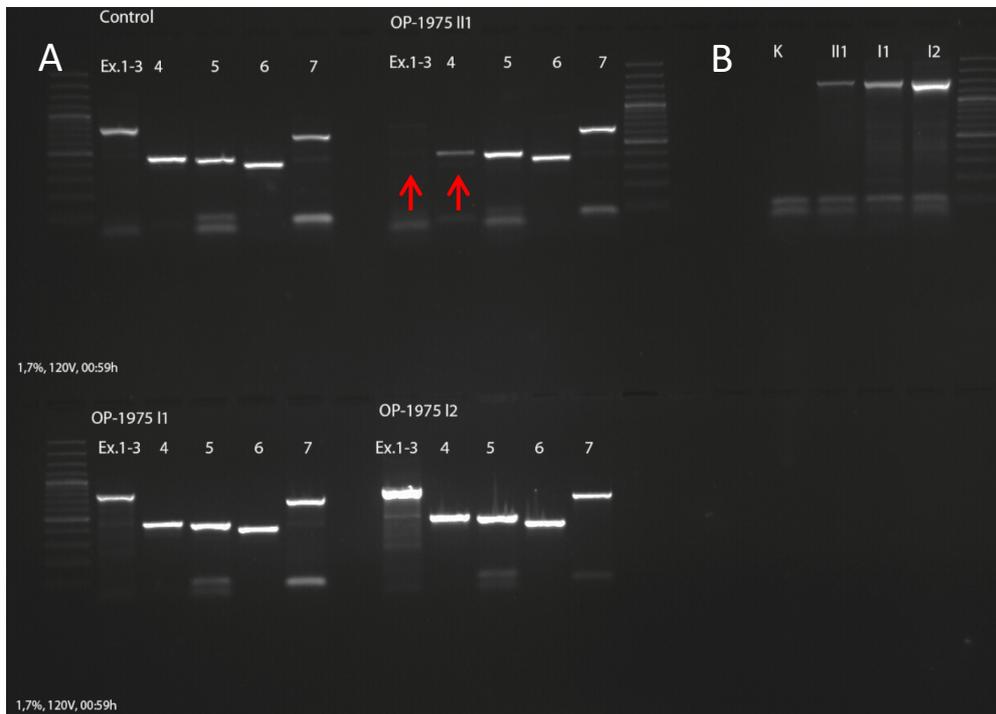


Abbildung 14: Gelelektrophorese OP-1975

(A) Das PCR Gel zeigt eine PCR der Exone 1-7 MCIDAS je mit Kontroll-DNA (wt) sowie DNA des Patienten (II1) und dessen Eltern (I1, I2). Sowohl die Kontrolle als auch beide Elternteile bilden für jedes Primerpaar eine klare Bande in der Elektrophorese. Beim Patienten ist für Exon 1-3 keine und für Exon 4 nur eine sehr schwache Bande (vermutlich Kontamination der DNA mit wt) zu sehen. Das Ergebnis lässt eine homozygote Mutation mit heterozygotem Status der Eltern vermuten. **(B)** Die PCR mit den Primern In. 0-1_2 F und Ex. 5 R erzeugt sowohl mit Patienten- als auch mit Eltern-DNA ein Produkt. Die Kontrolle ist erwartungsgemäß negativ. K = Kontroll-DNA, II1 = Patienten-DNA, I1 und I2 = Eltern-DNA.

Zur Identifizierung der Bruchstellen und anschließender Sequenzierung ist eine Bridge PCR durchgeführt worden. Die Gelelektrophorese dieser PCR (s. Abbildung 14, B) bestätigte den Verdacht auf eine homozygote Mutation des Patienten sowie den heterozygoten Status der Eltern (I1, I2). Dass die Kontrolle in diesem Fall negativ ausfiel lag an der bei Gesunden etwa 6.000 bp großen PCR-Produktgröße, die bei den gewählten Einstellungen des *Thermocyclers* nicht vervielfältigt werden kann und somit erwartungsgemäß ausfällt.

Nach Auswertung der Sequenzierung lässt sich beim Patienten OP-1975 II1 die Deletion *c.1-1381_382+379del* diagnostizieren, die die Exone 1-4 vollständig einschließt (s. Abbildung 15). Diese ist 5.936 bp groß und erstreckt sich von über 1300 bp vor Exon 1 bis in das vor Exon 5 liegende Intron.

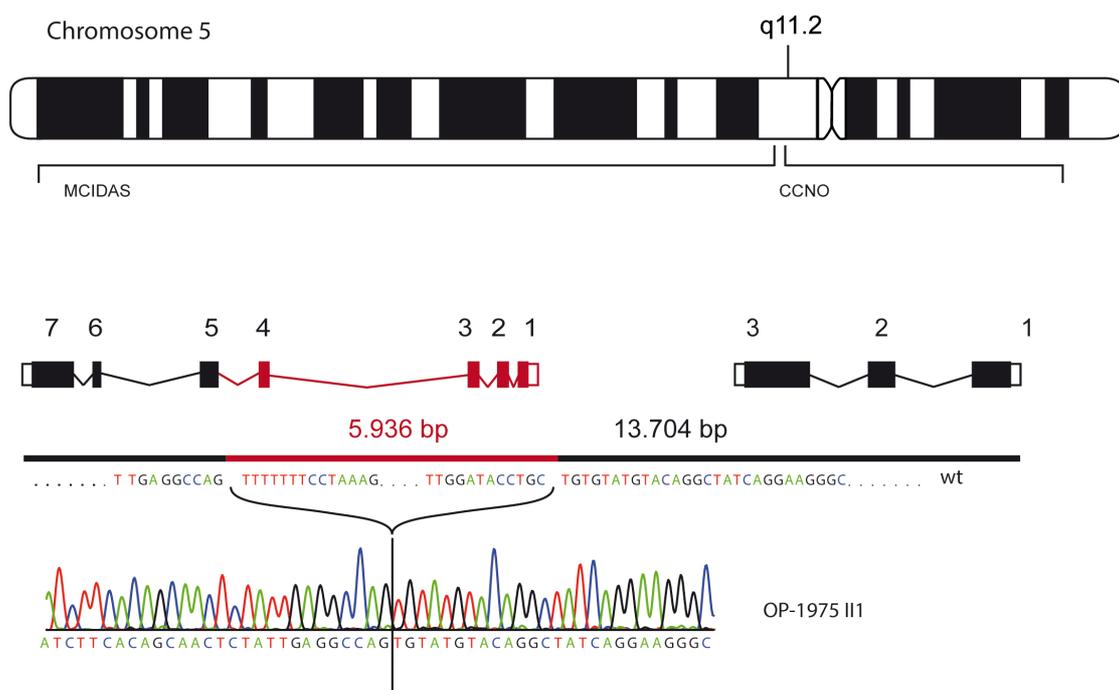


Abbildung 15: Schematische Darstellung der Bruchpunkte innerhalb der Sequenz

Dargestellt sind die Gene *CCNO* und *MCIDAS* auf Chromosom 5 am Genlocus q11.2. Rot markiert ist die Deletion des Patienten OP-1975 II1. *Wt* bezeichnet die Basenabfolge der Wildtyp DNA. Darunter ist ein Ausschnitt der Sequenzierung mit der Basenabfolge des Patienten abgebildet. Der Trennstrich markiert die Lage der Bruchstelle.

5 Diskussion

Diese Arbeit soll die Häufigkeit, Verteilung und klinische Ausprägung von Mutationen in Ziliogenesegenen in einer definierten Patientenkohorte, bestehend aus 45 Patienten/Patientinnen, untersuchen. Dabei wurden in 19 Patienten/Patientinnen 13 verschiedene Mutationen identifiziert, von denen sieben bislang nicht bekannt waren.

5.1 Häufigkeit von Ziliogenesedefekten

Hotspot Exone lassen sensible Genregionen vermuten

In manchen Genregionen finden sich gehäuft Mutationen. Alle neun identifizierten *CCNO* Exon 1 Mutationen liegen innerhalb eines kleinen Bereichs von 15 Basenpaaren. Im selben Bereich beschreiben *Amirav et al. 2016* in zehn Individuen unterschiedlicher Herkunft die homozygot vorliegende Mutation *c.258_262dupGGCCC, p.Gln88Argfs*8* (22). In weiteren 17 Patienten/Patientinnen in einer Studie von *Wallmeier et al. 2014* konnten Mutationen in besagter Region nachgewiesen werden (3). Dass Exon 1 am häufigsten betroffen ist könnte daran liegen, dass dieses Exon viele repetitive, GC-reiche Sequenzfolgen aufweist (s. Tabelle 8), die bei der Replikation zu Deletionen bzw. Duplikationen führen können (38).

Tabelle 8: GC Anteil in CCNO

Exon	CCNO Ex. 1	CCNO Ex. 2	CCNO Ex. 3
GC Anteil	71,65 %	62,37 %	64,66 %

Übersicht über den Anteil an GC Basen in den Exonen 1-3 *CCNO*. Exon 1 enthält gegenüber Exon 2 15 % mehr GC Basen, im Vergleich zu Exon 3 sind es 11 %. Berechnet mit *Endmemo*.

Es fällt auf, dass *MCIDAS* Mutationen seltener nachgewiesen werden als *CCNO* Mutationen (s. Abbildung 16). *MCIDAS* kontrolliert die Ziliogenese durch Aktivierung wichtiger Kofaktoren sowie Kontrolle des Zellzyklus in einem sehr frühen Stadium (s. Abbildung 4). Möglicherweise führt im Vergleich zu *CCNO* eine *MCIDAS* Mutation zu einer erhöhten intrauterinen Letalität, da *MCIDAS* zu Beginn die Ziliogenese kontrolliert und nachgeschaltete Faktoren von dessen Funktion abhängig sind.

Möglich wäre auch das Vorliegen einer Foundermutation, eine Mutation, die sich im Vergleich zur Gesamtbevölkerung in einer bestimmten Population – vor allem in kleineren und relativ isolierten konsanguinen Gemeinschaften – übermäßig häufig nachweisen lässt. Überwiegend

im Mittelmeer- und arabischen Raum haben sich – zum Teil durch Migration, zum Teil durch Konsanguinität – solche sonst seltenen Mutationen verbreitet, was Untersuchungen dieser Kohorten besonders aufschlussreich macht (12). Die überwiegend europäische Abstammung der in dieser Arbeit untersuchten Patienten/Patientinnen stützt jedoch eher die von *Amirav et al. 2016* vertretene These, dass im genannten Genabschnitt eine erhöhte Mutationsrate (Hotspotregion) wahrscheinlicher ist, als eine gemeinsame Abstammung der untersuchten Patienten (22).

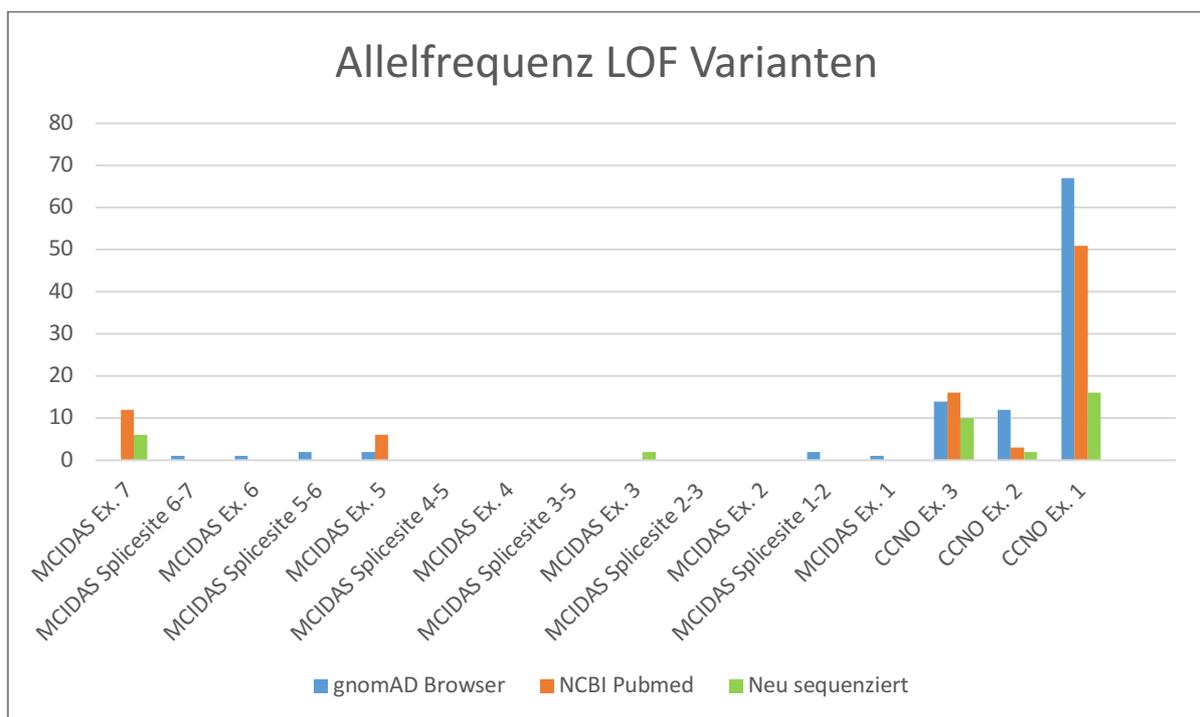


Abbildung 16: Übersicht über die Allelfrequenz mit LOF Mutationen der RGMC Gene MCIDAS und CCNO

Aufgelistet sind die Exone und Splicesites der Gene *MCIDAS* und *CCNO* (auf die Auflistung der *CCNO* Splicesites wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit bei fehlenden Einträgen verzichtet). Dagegen aufgetragen sind in blau alle im *UCSC Gnomad Gene Browser* gelisteten LOF Varianten, multipliziert mit der gelisteten Allelfrequenz. Grün sind die in dieser Arbeit identifizierten Mutationen. Orangene Säulen repräsentieren bisher bei NCBI Pubmed veröffentlichte Varianten*. Mit großem Abstand sind die häufigsten LOF Varianten in *CCNO* Exon 1 nachgewiesen. Zudem ist der Anteil an LOF Mutationen aller Varianten (inkl. Synonymen) bei *CCNO* höher als bei *MCIDAS* ($27/497 = 5,42\%$ zu $8/430 = 1,86\%$). Alle veröffentlichten Mutationen (orange) liegen entweder homozygot oder compound heterozygot vor. Die im gnomAD Browser gelisteten Allele (blau) werden als heterozygot vorliegend angegeben. (Die Quellen sind als komplementär, jedoch mit Überschneidungen zu interpretieren. Nicht alle veröffentlichten Mutationen sind im gnomAD Browser vorhanden; es lassen sich nicht alle LOF Varianten in Veröffentlichungen wiederfinden.)

Heterozygote Mutationen sind selten oder unterdiagnostiziert

Compound heterozygote Mutationen sind seltener publiziert als homozygote. In dieser Arbeit sind zwei Patienten/Patientinnen (OP-2693 II1 und OP-2362 II1) mit compound heterozygoten Mutationen identifiziert worden. In bislang publizierten *CCNO* Studien finden sich nur sechs Patienten/Patientinnen (*MCIDAS* keine) mit solchen Mutationen. Das könnte an ihrem selteneren Auftreten, der geringeren Penetranz oder der geringeren gendiagnostischen Sensitivität gegenüber heterozygoten Mutationen liegen.

Ersteres wird in einem späteren Abschnitt genauer betrachtet. Die Penetranz, also die Verlässlichkeit, dass ein bestimmter Genotyp für einen bestimmten Phänotyp verantwortlich ist, könnte bei compound heterozygoten Mutationen niedriger sein. Mutationsträger würden dann klinisch unauffällig sein und dem Gesundheitssystem gar nicht erst bekannt werden. Diese These ließe sich daher nur durch großflächige Querschnittsstudien überprüfen und ist kaum praktikabel.

Zuletzt erkennt die genetische Paneldiagnostik compound heterozygote Mutationen nicht direkt. Werden bei einem Patienten zwei heterozygote Mutationen identifiziert, müssen beide Allele betroffen sein, um krankheitsverursachend zu sein. Durch Sequenzierung ist es allerdings nicht möglich, die Mutationen einem bestimmten Allel zuzuordnen. Daher sollten, wenn möglich, die Eltern untersucht werden, um so eine compound heterozygote Mutation nachzuweisen. Eine weitere Limitierung der Methode stellen große, compound heterozygote Deletionen dar. Überschreitet die Anzahl deletierter Basen die Leseweite der Sequenzierungsmethode (Sanger ~ 600-700 bp, Next-Generation ~ 50-150 bp), können diese übersprungen werden.

5.2 Klinik

Aufgrund der Seltenheit der Erkrankung und der damit einhergehenden geografischen Streuung der Patienten/Patientinnen können nicht alle Betroffenen standardisiert an einem Zentrum untersucht werden. Das führt dazu, dass manche Untersuchungsergebnisse z.T. lückenhaft vorliegen und daher nur eine eingeschränkte Beurteilung zulassen. Dies ist in der folgenden Auswertung zu berücksichtigen.

Hydrozephalus

Ein dokumentierter Hydrozephalus liegt bei den Patienten/Patientinnen OP-1982 II1, OP-1468 II2 sowie einem nicht in dieser Arbeit aufgeführten und mit 13 Jahren verstorbenen Bruder des Patienten OP-1869 II1 vor. Die vorliegende Hydrozephalusprävalenz ist gegenüber der der allgemeinen Bevölkerung von etwa 1,1/1000 (ermittelt von *Munch et al. 2012*, idiopathischer kongenitaler Hydrozephalus) zwar erhöht, anhand der Untersuchungen von *Ccno* mutierten Mäusen in dieser RGMC-Patientenkohorte aber noch höher erwartet worden (22,39). In einem Mausmodell von *Núñez-Ollé et al. 2017* mit homozygot *Ccno* deletierten Mäusen konnte bei 70 % der Mäuse ein Hydrozephalus mit hoher Letalität festgestellt werden (24). In einer weiteren Untersuchung an Mäusen von *Funk et al. 2015* (hier mit homozygoter *Ccno* Ex.2+3 Deletion) liegt die Hydrozephalusprävalenz nach dem ersten Lebensmonat bei 57 %. Doch in bisher veröffentlichten Arbeiten mit humanen homozygoten *CCNO* und *MCIDAS* Mutationen liegt nur bei etwa 10 % der Patienten/Patientinnen ein Hydrozephalus vor (3,18,22,25). Dass sich Erkenntnisse im Mausmodell nicht unmittelbar auf den Menschen übertragen lassen untersucht *L. Lee, 2013* in einem Review über den Zusammenhang von PCD-assoziierten Mutationen mit der Wahrscheinlichkeit des Auftretens eines Hydrozephalus (40). Darin wird beobachtet, dass bei PCD Patienten/Patientinnen im Vergleich zu den übrigen Symptomen ein Hydrozephalus weitaus seltener beobachtet wird, als bei Mäusen mit entsprechenden Mutationen in PCD-Genen. Des Weiteren scheinen einige Mauslinien, wie die häufig genutzte „Black-6“, eine erhöhte Anfälligkeit für die Ausbildung eines Hydrozephalus zu haben als andere. Unterschiede in der Anatomie, Physiologie des *ependymal flow* und embryonalen Entwicklung zwischen dem Menschen und der Maus tragen zudem dazu bei, dass ein Hydrozephalus beim Menschen (v.a. pränatal) letaler verlaufen könnte als bei der Maus und daher seltener beobachtet wird. Weitere Untersuchungen sind nötig, um die pathophysiologische Rolle der Abnahme des *ependymal flow* bei der Entwicklung eines Ziliopathie-assoziierten Hydrozephalus beim Menschen zu klären (40).

Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Gemeinsames Leitsymptom der Patienten ist eine Störung der mukoziliären Clearance. Manche Patienten zeigten respiratorisch das Vollbild des RGMC Syndroms (nRDS, chron. Obstruktion, rez. Pneumonien, Bronchiektasen, rez. Sinusitis), andere dagegen nur teilweise. Besonders deutlich wird das bei Betrachtung der Patienten mit Mutationen in *CCNO* Exon 1

(s. Tabelle 9). Es wäre bei nahezu identischen Mutationen und Untersuchungsergebnissen eine höhere Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu erwarten gewesen. *Amirav et al. 2016* dagegen konnten in einer Studie an einer israelischen Kohorte aus 170 Familien zeigen, dass Patienten/Patientinnen mit homozygoten Mutationen in dieser Region nahezu einheitliche Symptome zeigten (22). Dabei muss berücksichtigt werden, dass besagte Studie die Patienten prospektiv nach einheitlichen Standards untersucht hat und die Einschlusskriterien das Vorhandensein von mindestens zwei der o.g. Symptome umfassten. Diese Arbeit hingegen betrachtet retrospektiv ein Kollektiv aus Patienten/Patientinnen mit auffälligen klinischen, molekulargenetischen sowie apparativen Untersuchungsergebnissen, sodass die hier beschriebenen (leichten) Differenzen der klinischen Ausprägung am ehesten mit dem Studiendesign zu begründen sind.

Tabelle 9: Klinischer Phänotyp von Patienten/Patientinnen mit homozygoten Mutationen in CCNO Exon 1

Patient	Mutation	Herkunft	konsanguin	rez. Otitis	nRDS	chron. obst. St.	rez. Pneum.	Bronchiektasen	rez. Sinusitis
Op-1574 II1	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	München	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
Op-1574 II2	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	München	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Op-1574 II3	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	München	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
OP-1977 II1	c.262_263insGGCCC, p.Gln88Argfs*8 hom.	Münster	N/A	Ja	N/A	Nein	Nein	Ja	Ja
OP-219	c.262_263insGGCCC, p.Gln88Argfs*8 hom.	Braunschweig	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein
OP-2364 II1	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	München	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
OP-2562 II1	c.262_263insGGCCC, p.Gln88Argfs*8 hom.	Münster	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja

* rez. Otitis: rezidivierende Otitis media, nRDS: neonatal respiratory distress syndrome, chron. obst. St.: chronische obstruktive Störungen, Video: Zilien Videomikroskopie, EM: Elektronenmikroskopie, IF (DNAH5): Immunfluoreszenzmikroskopie nach Färbung für DNAH5; N/A: Information nicht verfügbar oder Untersuchung nicht durchführbar; Nasales NO: bei Trennstrich Mehrfachmessung

Auffällig sind die Ergebnisse des Patienten OP-1468 II1. Trotz der als krankheitsverursachend eingestuften Mutation (s.o.) und dem klinischen Vollbild des RGMCSyndroms (Hydrozephalus, nRDS, chron. Obstruktion, rez. Pneumonien, Bronchiektasen, rez. Sinusitis) sowie deutlich erniedrigten nNO-Werten konnte in der apparativen Diagnostik mittels EM (s. Abbildung 17) und IF kein pathologischer Befund erhoben werden. Lediglich in der HVMA fiel ein steifes niedrigamplitudiges Schlagmuster bei sonst (hoch-)normaler Frequenz auf. Die Untersuchungen wurden wiederholt und oben genanntes Ergebnis bestätigt; die Mutation liegt beim Patienten homozygot und bei den Eltern heterozygot vor. Ein Geschwisterpärchen aus Italien, das die gleiche Mutation trägt, weist dagegen - wie erwartet - keine Zilien auf. Möglicherweise sind bereits bei der DNA Aufbereitung Proben vertauscht worden, sodass eine

Wiederholung der Untersuchungen nicht zur Aufklärung führt. Zudem ist der Patient mittlerweile verstorben, sodass eine erneute Probenentnahme nicht möglich ist.

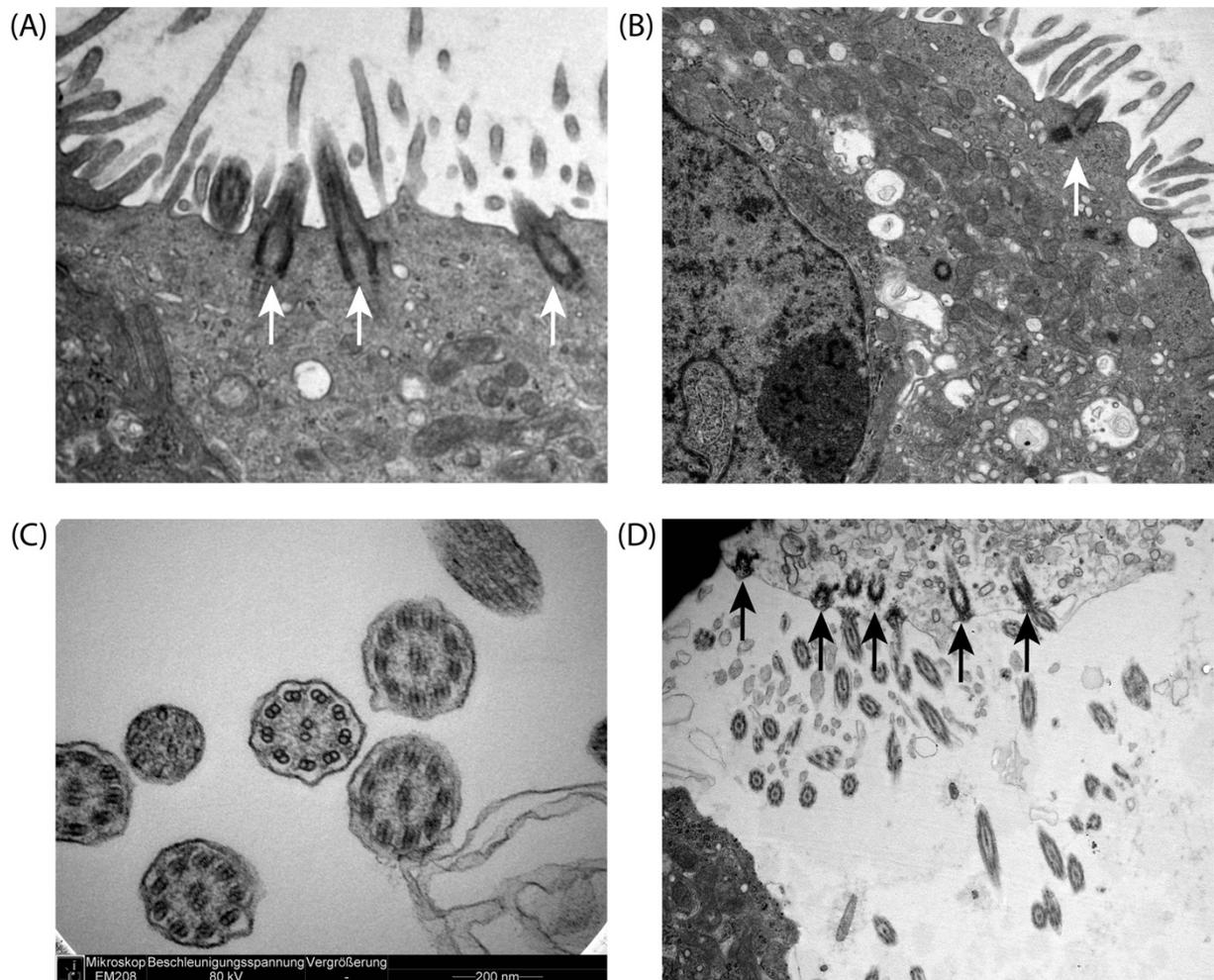


Abbildung 17: EM Bilder des Patienten OP-1468 II1

(A) Apikaler Zellpol einer respiratorischen Epithelzelle, aufgenommen in 11.000x Vergrößerung. Drei Zilien sind schräg angeschnitten und umgeben von zahlreichen Mikrovilli. Drei Basalkörper sind zu erkennen (weiße Pfeile). **(B)** Übersicht über eine respiratorische Epithelzelle. Links im Bild ist der Nukleus mit an die Kernmembran anliegendem Nukleolus zu erkennen. Ein Basalkörper (weißer Pfeil) ist angeschnitten. **(C)** Querschnitt durch mehrere Zilien. Die typische $9 \times 2 + 2$ Struktur ist gut zu erkennen. **(D)** Übersicht über mehrere ins Lumen ragende quer angeschnittene Zilien. Auch hier sind die Mikrotubuli-Doubletten als schwarze feine Strukturen zu erkennen. Mehrere Basalkörper sind an der apikalen Membran zu sehen (schwarze Pfeile).

5.3 Konservierung

Mutationen finden sich gehäuft in konservierten Regionen

Konservierung beschreibt in der Evolutionsbiologie, dass eine Basensequenz der DNA innerhalb eines Genoms (paraloge Sequenz) oder zwischen unterschiedlichen Spezies (orthologe Sequenz) identisch vorhanden ist und ist somit ein Hinweis auf Präservierung im Rahmen der natürlichen Selektion. Solche sich über die Zeit kaum verändernden Bereiche werden auch *cold spots* oder *cold-region genes* genannt und codieren häufig - im Gegensatz zu Genen in *hot regions* mit hohen Mutationsraten, die für Proteine, die der ständigen Anpassung des Organismus an Umweltbedingungen dienen (z.B. das Immunsystem), codieren - für elementare „Haushälter-“Proteine, die Kernprozesse, die Transkription oder die Translation regulieren. Eine niedrige Mutationsrate hat sich hier evolutionär durchgesetzt (41). Stark konservierte Regionen haben eine unterdurchschnittliche Eigenmutationsrate und schützen somit den Code überlebenswichtiger Gene. Es ist wahrscheinlich, dass Mutationen in solchen Regionen umso verheerendere Auswirkungen haben können. Im Vergleich zur Maus liegen 80 % der Aminosäuren CCNOs konserviert vor, bei MCIDAS sind es 81 %. Im Vergleich zum näher verwandten Schimpansen sind es sogar 98 %, respektive 99 % (vgl. Abbildung 18, für MCIDAS s. Abbildung 20 im Anhang).

von *Funk et al. 2015* konnte an einer *CCNO* Exon 2 und 3 deletierten Mauslinie gezeigt werden, dass für diese Deletion homozygote Mausembryos nur 14 % ausmachten (im Alter von 21 Tagen; *weaning age*) und somit unterhalb der erwarteten mendelschen Frequenz von 25 % geboren wurden. Mehr als die Hälfte der überlebenden Jungtiere litt unter massiv erweiterten Hirnventrikeln und erhöhter Letalität. Interessanterweise zeigten aber auch etwa 29 % der homozygot deletierten Mäuse keine klinischen Auffälligkeiten (23). Ob die Lokalisation von LOF Mutationen in Exon 2 fulminanter verläuft als eine Mutation in Exon 1 oder 3 lässt sich hiermit nicht beantworten. Auch lassen sich Erkenntnisse am Mausmodell nicht unmittelbar auf den Menschen übertragen. In Zusammenschau mit den bislang wenigen nachgewiesenen Mutationen in Exon 2 könnte es jedoch ein Indiz dafür sein, dass die Lokalisation der Mutation Einfluss auf die Häufigkeit sowie die klinische Ausprägung hat.

6 Ausblick

Die Genanalyse stellt in der Diagnostik der Ziliopathien eine gute Möglichkeit dar, bei unauffälligen Ergebnissen in der HVMA und Immunfluoreszenzmikroskopie die Diagnose zu stellen. Bislang sind Mutationen in über 40 Genen identifiziert worden, die für schätzungsweise 60-70 % der PCD Fälle verantwortlich gemacht werden. Aktuelle Therapieansätze nehmen, analog zu erfolgreichen Versuchen in der Therapie der Zystischen Fibrose, die Gentherapie in den Fokus, weshalb sowohl für die Diagnostik als auch die Therapie die Identifizierung der ursächlichen Gene wichtig ist (42). Bislang sind die Mechanismen und beteiligten Gene der Ziliogenese noch nicht ausreichend untersucht. Beim Großteil der in dieser Arbeit untersuchten Patienten/Patientinnen konnte keine Mutation in den Ziliogenesegenen *CCNO* und *MCIDAS* nachgewiesen werden. Viele nachgeschaltete Faktoren sind jedoch bislang nicht bekannt oder unzureichend untersucht. Diese gilt es zu identifizieren, um in Zukunft die Diagnose dieser multifaktoriellen Krankheit sicher zu stellen. Eine denkbare Herangehensweise zur Identifizierung von Kandidatengenomen wäre die Untersuchung dieser Patientenkohorte mittels WES (whole exome sequencing). Im nächsten Schritt könnten immunfluoreszenzmikroskopisch erkrankte respiratorische Epithelzellen phänotypisch untersucht werden. Im Anschluss erfolgte dann die Sequenzierung analog zu dieser Arbeit.

7 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich meinen besonderen Dank nachstehenden Personen entgegenbringen, ohne deren Mithilfe die Anfertigung dieser Promotionsschrift niemals zustande gekommen wäre:

Mein Dank gilt zunächst Herrn Prof. Dr. Heymut Omran, meinem Doktorvater, für die Betreuung dieser Arbeit, der freundlichen Hilfe und für seine wissenschaftliche und methodische Unterstützung.

Daneben danke ich Frau Dr. Heike Olbrich für die kritische Auseinandersetzung mit meinem Themenkomplex und für die Durchsicht meiner Arbeit.

Mein außerordentlicher Dank gilt Frau Dr. Julia Wallmeier, ohne deren mühevoller Geduld und Unterstützung diese Arbeit niemals hätte gelingen können. Die mehrfache Durchsicht dieser Dissertation, ihre kritischen Betrachtungen, ihre differenzierten Anmerkungen, die angeregten Diskussionen und nicht zuletzt die persönlichen Anregungen auch außerhalb des Instituts und der Arbeitszeiten haben mich enorm unterstützt. Die zahlreichen Gespräche auf fachlicher und persönlicher Ebene habe ich stets als Motivation und Ermutigung empfunden.

Außerdem danke ich den vielen Mitarbeiterinnen und Mitarbeitern meiner Arbeitsgruppe, die mich in freundschaftlicher Atmosphäre in das experimentelle Arbeiten eingeführt haben und mir stets ein offenes Ohr und Lösungen für die kleineren oder größeren Hürden anboten.

Weiterhin danke ich dem Medizinerkolleg Münster, das mir mit finanzieller und intellektueller Unterstützung diese produktive und arbeitsreiche Zeit ermöglicht hat.

Für ihren emotionalen Beistand danke ich herzlich meiner Familie und meinen engsten Freunden.

Mein besonderer Dank aber gilt meinen Eltern Birgit und Peter, die mir meinen bisherigen Lebensweg ermöglichten und denen ich diese Arbeit widme.

8 Literaturverzeichnis

1. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol.* 2009;187:921–33. doi: 10.1083/jcb.200908067
2. Brown JM, Witman GB. Cilia and diseases. *Bioscience.* 2014;64:1126–37. doi: 10.1093/biosci/biu174
3. Wallmeier J, Al-Mutairi DA, Chen CT, Loges NT, Pennekamp P, Menchen T, Ma L, Shamseldin HE, Olbrich H, Dougherty GW, Werner C, Alsabab BH, Köhler G, Jaspers M, Boon M, Griese M, Schmitt-Grohé S, Zimmermann T, Koerner-Rettberg C, Horak E, Kintner C, Alkuraya FS, Omran H. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Genet.* 2014;46:646–51. doi: 10.1038/ng.2961
4. Zariwala MA, Knowles MR, Omran H. Genetic defects in ciliary structure and function. *Annu Rev Physiol.* 2007;69:423–50. doi: 10.1146/annurev.physiol.69.040705.141301
5. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol.* 2009;187:921–33. doi: 10.1083/jcb.200908067
6. Styczynska-Soczka K, Jarman AP. The *Drosophila* homologue of Rootletin is required for mechanosensory function and ciliary rootlet formation in chordotonal sensory neurons. *Cilia.* 2015;4:9. doi: 10.1186/s13630-015-0018-9
7. Antoniadou I, Stylianou P, Christodoulou N, Skourides PA. Addressing the functional determinants of FAK during ciliogenesis in multiciliated cells. *J Biol Chem.* 2017;292:488–504. doi: 10.1074/jbc.M116.767111
8. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol.* 2009;187:921–33. doi: 10.1083/jcb.200908067
9. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol.* 2009;187:921–33. doi: 10.1083/jcb.200908067
10. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol.* 2009;187:921–

33. doi: 10.1083/jcb.200908067
11. Pearson CG, Winey M. Basal body assembly in ciliates: the power of numbers. *Traffic*. 2009;10:461–71. doi: 10.1111/j.1600-0854.2009.00885.x
 12. Monies D, Abouelhoda M, Assoum M, Moghrabi N, Rafiullah R, Almontashiri N, Alowain M, Alzaidan H, Alsayed M, Subhani S, Cupler E, Faden M, Alhashem A, Qari A, Chedrawi A, Aldhalaan H, Kurdi W, Khan S, Rahbeeni Z, Alotaibi M, Goljan E, Elbardisy H, ElKalioby M, Shah Z, Alruwaili H, Jaafar A, Albar R, Akilan A, Tayeb H, Tahir A, Fawzy M, Nasr M, Makki S, Alfaifi A, Akleh H, Yamani S, Bubshait D, Mahnashi M, Basha T, Alsagheir A, Abu Khaled M, Alsaleem K, Almugbel M, Badawi M, Bashiri F, Bohlega S, Sulaiman R, Tous E, Ahmed S, Algoufi T, Al-Mousa H, Alaki E, Alhumaidi S, Alghamdi H, Alghamdi M, Sahly A, Nahrir S, Al-Ahmari A, Alkuraya H, Almehaidib A, Abanemai M, Alsohaibaini F, Alsaud B, Arnaout R, Abdel-Salam GMH, Aldhekri H, AlKhater S, Alqadi K, Alsabban E, Alshareef T, Awartani K, Banjar H, Alsahan N, Abosoudah I, Alashwal A, Aldekhail W, Alhajjar S, Al-Mayouf S, Alsemari A, Alshuaibi W, Altala S, Altalhi A, Baz S, Hamad M, Abalkhail T, Alenazi B, Alkaff A, Almohareb F, Al Mutairi F, Alsaleh M, Alsonbul A, Alzelaye S, Bahzad S, Manee AB, Jarrad O, Meriki N, Albeirouti B, Alqasmi A, AlBalwi M, Makhseed N, Hassan S, Salih I, Salih MA, Shaheen M, Sermin S, Shahrukh S, Hashmi S, Shawli A, Tajuddin A, Tamim A, Alnahari A, Ghemlas I, Hussein M, Wali S, Murad H, Meyer BF, Alkuraya FS. Lessons learned from large-scale, first-tier clinical exome sequencing in a highly consanguineous population. *Am J Hum Genet*. 2019;104:1182–201. doi: 10.1016/j.ajhg.2019.04.011
 13. Hatch EM, Kulukian A, Holland AJ, Cleveland DW, Stearns T. Cep152 interacts with Plk4 and is required for centriole duplication. *J Cell Biol*. 2010;191:721–9. doi: 10.1083/jcb.201006049
 14. Sonnen KF, Schermelleh L, Leonhardt H, Nigg EA. 3D-structured illumination microscopy provides novel insight into architecture of human centrosomes. *Biol Open*. 2012;1:965–76. doi: 10.1242/bio.20122337
 15. Bettencourt-Dias M, Glover DM. Centrosome biogenesis and function: centrosomics brings new understanding. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2007;8:451–63. doi: 10.1038/nrm2180
 16. Zhao H, Zhu L, Zhu Y, Cao J, Li S, Huang Q, Xu T, Huang X, Yan X, Zhu X. The cep63 paralogue *deup1* enables massive de novo centriole biogenesis for vertebrate

- multiciliogenesis. *Nat Cell Biol.* 2013;15:1434–44. doi: 10.1038/ncb2880
17. Marcet B, Chevalier B, Luxardi G, Coraux C, Zaragosi LE, Cibois M, Robbe-Sermesant K, Jolly T, Cardinaud B, Moreilhon C, Giovannini-Chami L, Nawrocki-Raby B, Birembaut P, Waldmann R, Kodjabachian L, Barbry P. Control of vertebrate multiciliogenesis by miR-449 through direct repression of the Delta/Notch pathway. *Nat Cell Biol.* 2011;13:693–701. doi: 10.1038/ncb2241
 18. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol.* 2009;187:921–33. doi: 10.1083/jcb.200908067
 19. Revinski DR, Zaragosi LE, Boutin C, Ruiz-Garcia S, Deprez M, Thomé V, Rosnet O, Gay AS, Mercey O, Paquet A, Pons N, Ponzio G, Marcet B, Kodjabachian L, Barbry P. CDC20B is required for deuterosome-mediated centriole production in multiciliated cells. *Nat Commun.* 2018;9:4668. doi: 10.1038/s41467-018-06768-z
 20. Stubbs JL, Vladar EK, Axelrod JD, Kintner C. Multicilin promotes centriole assembly and ciliogenesis during multiciliate cell differentiation. *Nat Cell Biol.* 2012;14:140–7. doi: 10.1038/ncb2406
 21. Sadasivam S, DeCaprio JA. The DREAM complex: master coordinator of cell cycle-dependent gene expression. *Nat Rev Cancer.* 2013;13:585–95. doi: 10.1038/nrc3556
 22. Amirav I, Wallmeier J, Loges NT, Menchen T, Pennekamp P, Mussaffi H, Abitbul R, Avital A, Bentur L, Dougherty GW, Nael E, Lavie M, Olbrich H, Werner C, Kintner C, Omran H, Alkrinawi S, Aviram M, Rotschild M, Blau H, Kerem E, Cohen-Cymberknoh M, Shoseyov D, Springer C, Hevroni A, Dabbah H, Elizur A, Picard E, Goldberg S, Efrati O, Yahav Y, Luder A, Rivlin J, Livnat G, Roth Y, Mandelberg A, Sivan Y, Soferman R. Systematic analysis of CCNO variants in a defined population: implications for clinical phenotype and differential diagnosis. *Hum Mutat.* 2016;37:396–405. doi: 10.1002/humu.22957
 23. Funk MC, Bera AN, Menchen T, Kuaes G, Thriene K, Lienkamp SS, Dengjel J, Omran H, Frank M, Arnold SJ. Cyclin O (Ccn0) functions during deuterosome-mediated centriole amplification of multiciliated cells. *EMBO J.* 2015;34:1078–89. doi: 10.15252/embj
 24. Núñez-Ollé M, Jung C, Terré B, Balsiger NA, Plata C, Roset R, Pardo-Pastor C, Garrido M, Rojas S, Alameda F, Lloreta J, Martín-Caballero J, Flores JM, Stracker TH, Valverde MA, Muñoz FJ, Gil-Gómez G. Constitutive Cyclin O deficiency results in penetrant hydrocephalus, impaired growth and infertility. *Oncotarget.* 2017;8:99261–73. doi:

10.18632/oncotarget.21818

25. Mieke Boon^{1,*}, Julia Wallmeier^{2,*}, Lina Ma³, Niki Tomas Loges², Martine Jaspers⁴, Heike Olbrich², Gerard W. Dougherty², Johanna Raidt², Claudius Werner², Israel Amirav⁵, Avigdor Hevroni⁶, Revital Abitbul⁵, Avraham Avital⁶, Ruth Soferman⁷, Marja Wessels⁸, HC& HO. MCIDAS mutations result in a mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. *Nat Genet.* 2014;46:646–51. doi: 10.1038/ng.2961
26. Heuser T, Raytchev M, Krell J, Porter ME, Nicastro D. The dynein regulatory complex is the nexin link and a major regulatory node in cilia and flagella. *J Cell Biol.* 2009;187:921–33. doi: 10.1083/jcb.200908067
27. Mirra V, Werner C, Santamaria F. Primary ciliary dyskinesia: An update on clinical aspects, genetics, diagnosis, and future treatment strategies. *Front Pediatr.* 2017;5:135. doi: 10.3389/fped.2017.00135
28. Hornef N, Olbrich H, Horvath J, Zariwala MA, Fliegauf M, Loges NT, Wildhaber J, Noone PG, Kennedy M, Antonarakis SE, Blouin J-L, Bartoloni L, Nüsslein T, Ahrens P, Griese M, Kuhl H, Sudbrak R, Knowles MR, Reinhardt R, Omran H. DNAH5 mutations are a common cause of primary ciliary dyskinesia with outer dynein arm defects. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;174:120–6. doi: 10.1164/rccm.200601-084OC
29. Kumar S, Tana A, Shankar A. Cystic fibrosis — What are the prospects for a cure? *Eur J Intern Med.* 2014;25:803–7. doi: 10.1016/J.EJIM.2014.09.018
30. Ibañez-Tallon I, Pagenstecher A, Fliegauf M, Olbrich H, Kispert A, Ketelsen UP, North A, Heintz N, Omran H. Dysfunction of axonemal dynein heavy chain Mdnah5 inhibits ependymanl flow and reveals a novel mechanism for hydrocephalus formation. *Hum Mol Genet.* 2004;13:2133–41. doi: 10.1093/hmg/ddh219
31. Lucas JS, Barbato A, Collins SA, Goutaki M, Behan L, Caudri D, Dell S, Eber E, Escudier E, Hirst RA, Hogg C, Jorissen M, Latzin P, Legendre M, Leigh MW, Midulla F, Nielsen KG, Omran H, Papon JF, Pohunek P, Redfern B, Rigau D, Rindlisbacher B, Santamaria F, Shoemark A, Snijders D, Tonia T, Titieni A, Walker WT, Werner C, Bush A, Kuehni CE. European Respiratory Society guidelines for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J.* 2017;49:1601090. doi: 10.1183/13993003.01090-2016
32. Badano JL, Mitsuma N, Beales PL, Katsanis N. The ciliopathies: an emerging class of human genetic disorders. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 2006;7:125–48. doi:

10.1146/annurev.genom.7.080505.115610

33. Lucas JS, Leigh MW. Diagnosis of primary ciliary dyskinesia: Searching for a gold standard. *Eur Respir J*. 2014;44:1418–22. doi: 10.1183/09031936.00175614
34. Werner C, Onnebrink JG, Omran H. Diagnosis and management of primary ciliary dyskinesia. *Cilia*. 2015;4:2. doi: 10.1186/s13630-014-0011-8
35. Leigh MW, Hazucha MJ, Chawla KK, Baker BR, Shapiro AJ, Brown DE, Lavange LM, Horton BJ, Qaqish B, Carson JL, Davis SD, Dell SD, Ferkol TW, Atkinson JJ, Olivier KN, Sagel SD, Rosenfeld M, Milla C, Lee HS, Krischer J, Zariwala MA, Knowles MR. Standardizing nasal nitric oxide measurement as a test for primary ciliary dyskinesia. *Ann Am Thorac Soc*. 2013;10:574–81. doi: 10.1513/AnnalsATS.201305-110OC
36. Raidt J, Wallmeier J, Hjejij R, Onnebrink JG, Pennekamp P, Loges NT, Olbrich H, Häffner K, Dougherty GW, Omran H, Werner C. Ciliary beat pattern and frequency in genetic variants of primary ciliary dyskinesia. *Eur Respir J*. 2014;44:1579–88. doi: 10.1183/09031936.00052014
37. Goutaki M, Maurer E, Halbeisen FS, Amirav I, Barbato A, Behan L, Boon M, Casaulta C, Clement A, Haarman E, Hogg C, Karadag B, Koerner-Rettberg C, Leigh MW, Loebinger MR, Mazurek H, Morgan L, Nielsen KG, Omran H, Schwerk N, Scigliano S, Werner C, Yiallourous P, Zivkovic Z, Lucas JS, Kuehni CE. The international primary ciliary dyskinesia cohort (iPCD cohort): Methods and first results. *Eur Respir J*. 2017;49. doi: 10.1183/13993003.01181-2016
38. Munch TN, Rostgaard K, Rasmussen MLH, Wohlfahrt J, Juhler M, Melbye M. Familial aggregation of congenital hydrocephalus in a nationwide cohort. *Brain*. 2012;135:2409–15. doi: 10.1093/brain/aws158
39. Munch TN, Rostgaard K, Rasmussen MLH, Wohlfahrt J, Juhler M, Melbye M. Familial aggregation of congenital hydrocephalus in a nationwide cohort. *Brain*. 2012;135:2409–15. doi: 10.1093/brain/aws158
40. Lee L. Riding the wave of ependymal cilia: Genetic susceptibility to hydrocephalus in primary ciliary dyskinesia. *J Neurosci Res*. 2013;91:1117–32. doi: 10.1002/jnr.23238
41. Munch TN, Rostgaard K, Rasmussen MLH, Wohlfahrt J, Juhler M, Melbye M. Familial aggregation of congenital hydrocephalus in a nationwide cohort. Charles H. Langley, editor. *Brain*. 2012;135:2409–15. doi: 10.1093/brain/aws158
42. Rubbo B, Lucas JS. Clinical care for primary ciliary dyskinesia: current challenges and

future directions. *Eur Respir Rev.* 2017;26:170023. doi: 10.1183/16000617.0023-2017

9 Abkürzungsverzeichnis

Tabelle 10: Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Bedeutung
µl	Mikroliter
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
BB	Basal Bodies
bp	Basenpaare
CCNO	Cyclin O
CF	Cystische Fibrose
CFTR	cystic fibrosis transmembrane conductance regulator
chron.	chronisch
CP	zentrales Paar (engl. central pair)
CT	Computertomographie
ddNTP	Didesoxyribonucleosidtriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAH5	Dynein Axonemal Heavy Chain 5
DNA-Taq-Polymerase	thermostabile DNA-Polymerase
dNTP	Desoxynucleosidtriphosphat
EM	Elektronenmikroskopie
ERS	European Respiratory Society
EXO/SAP	Exonuclease Shrimp Alkaline Phosphatase
het.	heterozygot
H₂O	Chemische Formel des Wassermoleküls
hom.	homozygot
HVMA	Hochfrequenzvideomikroskopie-Analyse
IDA	innerer Dyneinarm
IF	Immunfluoreszenz
IFT	intraflagellares Transportprotein
LOF	Loss of Function (-Mutation)
MC	Mukoziliäre Clearance
MCC	Multiciliated Cell
MCIDAS	Multiciliate Differentiation And DNA Synthesis Associated Cell Cycle Protein
MgCl₂	Magnesiumchlorid

Min.	Minute
MRT	Magnetresonanztomographie
N/A	not applicable, not available
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
nNO	nasales NO
NO	Stickstoffmonoxid
nRDS	neonatal respiratory distress syndrome
ODA	äußerer Dyneinarm
PCD	Primäre ziliäre Dyskinesie
PCR	Polymerasekettenreaktion
RS	Radialspeiche
RGMC	Reduced Generation of Multiple Motile Cilia
Sek.	Sekunde
TEM	Transmissionselektronenmikroskopie
V	Volt
vgl.	vergleiche
WES	Whole Exome Sequencing
WT	Wildtyp

10 Abbildungsverzeichnis

<i>Abbildung 1: Lokalisation der Zilien im menschlichen Körper</i>	1
<i>Abbildung 2: Schematische Darstellung des Zilienquerschnitts</i>	2
<i>Abbildung 3: Querschnitt des Axonems einer motilen Zilie</i>	3
<i>Abbildung 4: Schematische Darstellung der Ziliogenese</i>	4
<i>Abbildung 5: Schematische Darstellung des respiratorischen Flimmerepithels</i>	7
<i>Abbildung 6: Pathophysiologie der mukoziliären Clearance Störung</i>	8
<i>Abbildung 7: Programm zur Analyse der Sequenzen</i>	19
<i>Abbildung 8: Schematische Darstellung der vermuteten Position der Bruchstellen</i>	20
<i>Abbildung 9: Gelelektrophorese des Primertests</i>	21
<i>Abbildung 10: Übersicht über nachgewiesene Mutationen</i>	23
<i>Abbildung 11: Übersicht über CCNO und MCIDAS Mutationen</i>	25
<i>Abbildung 12: CT-Thorax OP-1975 II1</i>	27
<i>Abbildung 13: Grafische Auswertung des WES von MCIDAS</i>	27
<i>Abbildung 14: Gelelektrophorese OP-1975</i>	28
<i>Abbildung 15: Schematische Darstellung der Bruchpunkte innerhalb der Sequenz</i>	29
<i>Abbildung 16: Übersicht über die Allelfrequenz mit LOF Mutationen der RGMC Gene MCIDAS und CCNO</i>	31
<i>Abbildung 17: EM Bilder des Patienten OP-1468 II1</i>	35
<i>Abbildung 18: Konservierung Aminosäuresequenz CCNO</i>	37
<i>Abbildung 19: Konservierung der CCNO cDNA</i>	V
<i>Abbildung 20: Konservierung Aminosäuresequenz MCIDAS</i>	VI

11 Tabellenverzeichnis

<i>Tabelle 1: PCR Ansatz</i>	16
<i>Tabelle 2: PRC-Programm</i>	17
<i>Tabelle 3: Aufreinigung mit EXO/SAP</i>	18
<i>Tabelle 4: Ansatz Sequenzierungsreaktion</i>	18
<i>Tabelle 5: Sequenzierungsprogramm</i>	18
<i>Tabelle 6: Übersicht über nachgewiesene Mutationen</i>	24
<i>Tabelle 7: In dieser Arbeit neu identifizierte, unpublizierte Mutationen</i>	26
<i>Tabelle 8: GC Anteil in CCNO</i>	30
<i>Tabelle 9: Klinischer Phänotyp von Patienten/Patientinnen mit homozygoten Mutationen in CCNO Exon 1</i>	34
<i>Tabelle 10: Abkürzungsverzeichnis</i>	47
<i>Tabelle 11: Klinische Symptome</i>	I
<i>Tabelle 12: Diagnostik</i>	II
<i>Tabelle 13: Primerliste (Hersteller: metabion international AG)</i>	III
<i>Tabelle 14: URLs</i>	III
<i>Tabelle 15: Bisher publizierte Mutationen</i>	IV
<i>Tabelle 16: Pathogenität der Missense Varianten</i>	IV

Anhang

Tabelle 11: Klinische Symptome

Patient	Mutation	Herkunft	konsanguin	rez. Otitis	nRDS	chron. obst. St.	rez. Pneum.	Bronchiektasen	rez. Sinusitis
OP-1532 II1	c.716A>Gp.His239Arg hom.	Bochum	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Op-1574 II1	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	München	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
Op-1574 II2	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	München	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein	Nein	Nein
Op-1574 II3	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	München	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
OP-1849	c.638T>C, p.Leu213Pro hom.	London	Ja	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
OP-1977 II1	c.262_263insGGCCC, p.Gln88Argfs*8 hom.	Münster	N/A	Ja	N/A	Nein	Nein	Ja	Ja
OP-1982	c.568-1G>C hom	Innsbruck	Nein	N/A	N/A	N/A	Ja	Ja	Ja
OP-219	c.262_263insGGCCC, p.Gln88Argfs*8 hom.	Braunschweig	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Nein
OP-2235 II1	c.568 -1 G>C hom	Regensburg	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
OP-2362 II1	c.267_268insAGCCC, p.Val90Serfs*5 + c.398G>T, p.Arg133Leu	Zürich	Nein	Ja	Ja	Ja	N/A	Nein	Ja
OP-2364 II1	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	München	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein	Nein
OP-2426 II1	c.584C>G, p.Pro195Arg hom.	Wiesbaden	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
OP-2562 II1	c.262_263insGGCCC, p.Gln88Argfs*8 hom.	Münster	Nein	Nein	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja
OP-2693 II1	c.253_262dup10, p.Gln88Argfs*51 + c.467T>C, p.Leu156Pro	München	Nein	Nein	N/A	Ja	Ja	Ja	Ja
OP-1869 II1	c.264_265insTA, p.Leu88Tyrfs*34 hom.	Bonn	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
OP-1975 II1	1-1381_382+379del hom.	Freiburg	Ja	N/A	N/A	Ja	Ja	Nein	Ja
OP-1950 II1	c.1150C>T, p.Pro384Ser hom.	Brescia, Italien	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
OP-1950 II3	c.1150C>T, p.Pro384Ser hom.	Brescia, Italien	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A	N/A
OP-1468 II2	c.1150C>T, p.Pro384Ser hom.	Münster	Ja	Nein	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja

CCNO

MCIDAS

* rez. Otitis: rezidivierende Otitis media, nRDS: neonatal respiratory distress syndrome, chron. obst. St.: chronische obstruktive Störungen, Video: Zilien Videomikroskopie, EM: Elektronenmikroskopie, IF (DNAHS): Immunfluoreszenzmikroskopie nach Färbung für DNAHS; N/A: Information nicht verfügbar oder Untersuchung nicht durchführbar; Nasales NO: bei Trennstich Mehrfachmessung

Tabelle 12: Diagnostik

Patient	Mutation	Video	EM	IF (DNAH5)	Nasales NO (in ppb)	
CCNO	OP-1532 II1	c.716A>Gp.His239Arg hom.	wenig Zilienbesatz, immotil	angefordert in Bochum	normal	1,8/37
	Op-1574 II1	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	N/A	N/A	Keine Zilien	N/A
	Op-1574 II2	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	N/A	N/A	Keine Zilien	N/A
	Op-1574 II3	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	N/A	N/A	Keine Zilien	N/A
	OP-1849	c.638T>C, p.Leu213Pro hom.	N/A	N/A	N/A	N/A
	OP-1977 II1	c.262_263insGGCCC, p.Gln88Argfs*8 hom.	keine Zilien	keine Zilien	keine Zilien	173/166/157
	OP-1982	c.568-1G>C hom	keine Zilien	keine Zilien	keine Zilien	N/A
	OP-219	c.262_263insGGCCC, p.Gln88Argfs*8 hom.	N/A	keine Zilien	N/A	N/A
	OP-2235 II1	c.568 -1 G>C hom	N/A	N/A	keine Zilien	68
	OP-2362 II1	c.267_268insAGCCC, p.Val90Serfs*5 + c.398G>T, p.Arg133Leu	vereinzelte Monozilien	N/A	N/A	50/50
	OP-2364 II1	c.252_253insTGCCC, p.Gly85Cys*10 hom.	viele Zilien, immotil	N/A	keine Zilien	N/A
	OP-2426 II1	c.584C>G, p.Pro195Arg hom.	N/A	einzelne Zilien kaum Basalkörper, Rootlets fehllokalisiert	N/A	N/A
	OP-2562 II1	c.262_263insGGCCC, p.Gln88Argfs*8 hom.	vereinzelte Zilien, immotil	keine Zilien, kaum Basalkörper BB und Rootlets fehllokalisiert	N/A	N/A
	OP-2693 II1	c.253_262dup10, p.Gln88Argfs*51 + c.467T>C, p.Leu156Pro	immotil, Frequenz verringert	N/A	N/A	330
	MCIDAS	OP-1869 II1	c.264_265insTA, p.Leu88Tyrfs*34 hom.	N/A	N/A	N/A
OP-1975 II1		1-1381_382+379del hom.	Azilie	keine Zilien	keine Zilien	114
OP-1950 II1		c.1150C>T, p.Pro384Ser hom.	N/A	N/A	N/A	N/A
OP-1950 II3		c.1150C>T, p.Pro384Ser hom.	N/A	N/A	N/A	N/A
OP-1468 II2	c.1150C>T, p.Pro384Ser hom.	normo- bis hochfrequenter Zilienschlag geringe Amplitude, steifer Schlag	unauffällig	viele Zilien kein path. Befund	25-30	

Tabelle 13: Primerliste (Hersteller: metabion international AG)

Gen & Exon	Forward Primer (5' - 3')	Reverse Primer (5' - 3')
MCIDAS Ex. 1-3	CAACCTCTGGCTGGCTTC	GACCCGAGAGGAGCTTTTG
MCIDAS Ex. 4	GGGGGACTTAGGGGTACAAG	TCACACCGATCCCAGATAAAG
MCIDAS Ex. 5	ACACCCTACACCCAGAGTGG	CCAGTCAGTCCACTGGTTCC
MCIDAS Ex. 6	TCCCCAGTTCCTGATGAGAC	GTTCCGGAGCGTGCAAAAG
MCIDAS Ex. 7	GGAGAGGAGAGTACCGCTGAG	AGTGTTTCAGGGTGGCATTTC
CCNO Ex. 1	CGGGCGTTGAAGGTAGTAAA	GACTCAACCCGAAACGAAT
CCNO Ex. 2	GAAGCTCCCCGATTCTTCTT	CAGGATTTTTCGTTTGTGGAG
CCNO Ex. 3	AGATCAACTGCGCTGGAAGT	TACAACCTGCAGCTGACCAA
MCDIDAS In0-1_1	ACACCAGGTCAGGTGAGGTC	GATATGGCTTTCCCCACTT
MCDIDAS In0-1_2	ACTCAGTGCTCCCCATTGAG	GTGCTGCATCAGATTCGTA
MCDIDAS In0-1_3	AGAAAGGTCCCTCGCCTAAG	ACGCCACAGTGGAAGTACC
MCIDAS In4-5	AAGTGCAGTCTCCTGGCAGT	TAGATCCAGCGGTTGACTT
MCIDAS_Ex.1-3_v2	CAGATTGTCCCGGGCTGAAG	AGGGTTTGGGTTGCGTGAAA
MCIDAS_In0-1_2.1	ACGAATCTGATGCAGGCACT	TTGCTTAAGGTCACCTGGCA
MCIDAS_In0-1_2.2	AACCTGCACAGTGATGGGAG	ATACCCTAGGTGCAGGGGAA
MCIDAS_In0-1_2.3	GTGGAAGAAGGACGTGGTGAT	ATTGGTGAAGACAACCTCCGC
MCIDAS_In0-1_2.4	GGCTAGTGGTCGTGCTACTC	GGCTTTAGGGTCAGAGTGCC
MCIDAS_In0-1_2.5	CTTCCACCGCTGTTAGGGTA	ATCCTTAGGCGAGGGACCTT
MCIDAS_In4-5_2	CGTGGTCGTGAAGGTGGTAA	CCAGAACTCACACCGATCCC
MCIDAS_In4-5_3	GGTGGTAAACCCAGCCAACCT	CACTCGTCACTCAACCTCCC

Tabelle 14: URLs

Website	URL
Ensembl	www.ensembl.org
GeneCards	www.genecards.org
NCBI Primer-BLAST	https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/
Primer 3	http://biotools.umassmed.edu/bioapps/primer3_www.cgi
UCSC Gnomad Gene Browser	https://gnomad.broadinstitute.org
Endmemo	http://www.endmemo.com/bio/gc.php
PolyPhen2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
SIFT	https://sift.bii.a-star.edu.sg
mutationTaster	http://www.mutationtaster.org

Tabelle 15: Bisher publizierte Mutationen

Pat. ID	Exon	cDNA Veränderungen	Protein Veränderungen	Mutationstyp	Quelle	
OI-10 II1	1,2	c.258_262dupGGCCC; 481_482delCT	p.Gln88Argfs*8; Leu161Glyfs*73	Duplikation + Deletion	Amirav I, Wallmeier J, Loges NT, Menchen T, Pennekamp P, Mussaffi H, et al. Systematic Analysis of CCNO Variants in a Defined Population: Implications for Clinical Phenotype and Differential Diagnosis. Hum Mutat. 2016;37(4):396–405.	
OI-10 II2	1,2	c.258_262dupGGCCC; 481_482delCT	p.Gln88Argfs*8; Leu161Glyfs*73	Duplikation + Deletion		
OI-13 II1	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OI-13 II2	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OI-33 II1	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OI-66 II1	3,3	c.638T>C hom.	p.Leu213Pro hom.	Missense		
OI-66 II2	3,3	c.638T>C hom.	p.Leu213Pro hom.	Missense		
OI-78 II1	1,3	c.258_262dupGGCCC; 638T>C	p.Gln88Argfs*8; Leu213Pro	Duplikation + Missense		
OI-83 II1	1,1	c.165delC; 258_262dupGGCCC	p.Gly56Alafs*38; Gln88Argfs*8	Duplikation + Deletion		
OI-103 II1	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OI-114 II1	3,3	c.638T>C hom.	p.Leu213Pro hom.	Missense		
OI-114 II2	3,3	c.638T>C hom.	p.Leu213Pro hom.	Missense		
OI-118 II1	1,1	c.165delC hom.	p.Gly56Alafs*38 hom.	Deletion		
OI-122 II1	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OI-122 II2	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OP-92 II1	1,2	c.248_252dupTGCCC + c.481_482delCT	p.Gly85Cysfs*10 + p.Leu161Glyfs*72	Duplikation + Deletion		Wallmeier J, Al-Mutairi DA, Chen CT, Loges NT, Pennekamp P, Menchen T, et al. Mutations in CCNO result in congenital mucociliary clearance disorder with reduced generation of multiple motile cilia. Nat Genet. 2014;46(6):646–51.
OP-151 II1	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OP-642 II1	3,3	c.926delC hom.	p.Pro309Argfs*17 hom.	Deletion		
OP-857 II1	3,3	c.961C>T hom.	p.Gln321* hom.	Stop		
OP-971 II1	3,3	c.716A>G hom.	p.His239Arg hom.	Missense		
OP-1246 II3	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OP-1367 II1	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OP-1367 II2	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OP-1367 II3	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OP-1777 II1	1,1	c.248_252dupTGCCC hom.	p.Gly85Cysfs*10 hom.	Duplikation		
OP-1777 II2	1,1	c.248_252dupTGCCC hom.	p.Gly85Cysfs*10 hom.	Duplikation		
OP-1777 II3	1,1	c.248_252dupTGCCC hom.	p.Gly85Cysfs*10 hom.	Duplikation		
OP-1777 II4	1,1	c.248_252dupTGCCC hom.	p.Gly85Cysfs*10 hom.	Duplikation		
OP-1784 II1	1,1	c.263_267dupAGCCC hom.	p.Val90Serfs*5 hom.	Duplikation		
OP-1784 II2	1,1	c.263_267dupAGCCC hom.	p.Val90Serfs*5 hom.	Duplikation		
BEL-1213 II1	1,1	c.248_252dupTGCCC hom.	p.Gly85Cysfs*10 hom.	Duplikation		
N/V	1,3	c.262_263 insGGCCCGCCC + c.848T>C	p.Leu283Pro + p.Gln88Argfs*51	Missense + Insertion	Shen N, Meng C, Liu Y et al. Genetic diagnosis of a case with primary ciliary dyskinesia type 29 by next generation sequencing. Chinese journal of medical genetics. 2019	
N/V	1,1	c.248_249insGCCCG hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Insertion	Guo T, Tan Z-P, Chen H-M, Zheng D-Y, Liu L, Huang X-G, et al. An effective combination of whole-exome sequencing and runs of homozygosity for the diagnosis of primary ciliary dyskinesia in consanguineous families. Sci Rep [Internet]. 2017 [cited 2019 Apr 17];7(1):7905. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28801648	
Family B II1	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation	Casey JP, McGettigan PA, Healy F, Hogg C, Reynolds A, Kennedy BN, et al. Unexpected genetic heterogeneity for primary ciliary dyskinesia. Commun. 5:4418 doi: 10.1038/ncomms5418 (2014)	
Family B II2	1,1	c.258_262dupGGCCC hom.	p.Gln88Argfs*8 hom.	Duplikation		
OI-116 II1	7,7	c.1142G>A; hom.	p.Arg381His hom.	Missense		
OI-116 II2	7,7	c.1142G>A; hom.	p.Arg381His hom.	Missense		
OP-34 II1	7,7	c.1142G>A; hom.	p.Arg381His hom.	Missense		
OP-34 II2	7,7	c.1142G>A; hom.	p.Arg381His hom.	Missense		
UCL-128 II1	5,5	c.441C>A; hom.	p.Cys147* hom.	Stop		
UCL-128 II2	5,5	c.441C>A; hom.	p.Cys147* hom.	Stop		
BEL-1785 II1	5,5	c.441C>A; hom.	p.Cys147* hom.	Stop		
BEL-1790 II1	7,7	c.1097G>A; hom.	p.Gly366Asp hom.	Missense		
BEL-1790 II3	7,7	c.1097G>A; hom.	p.Gly366Asp hom.	Missense		

Tabelle 16: Pathogenität der Missense Varianten

Gen & Exon	Mutation	PolyPhen2	SIFT	mutationTaster
CCNO Ex. 2	c.398G>T, p.Arg133Leu het.*	1	not tolerated	disease causing
CCNO Ex. 2	c.467T>C, p.Leu156Pro het.*	0,77	not tolerated	disease causing
CCNO Ex. 3	c.584C>G, p.Pro195Arg hom.	1	not tolerated	disease causing
CCNO Ex. 3	c.716A>G, p.His239Arg hom.	1	tolerated	disease causing
CCNO Ex. 3	c.638T>C, p.Leu213Pro hom.	1	not tolerated	disease causing
MCIDAS Ex.7	c.1150C>T, p.Pro384Ser hom.	1	N/A	disease causing

Human	MQACGGGAAGRRAFDSICPNRMLALPGRALLCKPGKPERKFAPPRKFFPGCTGGSPVSVY
Chimpanzee	MQACGGGAAGRRAFDSICPNRMLALPGR-LLCKPGKPERKFAPPRKFFPGCTGGSPVSVY
Mouse	MQACEGSAAGRRAFDSICPNRMLDLRRTL-GKPGKPERKFVPSWKSFSGCGGGSPVAVY ***** *.****** **.*:* *****.*.* **.* *****:***
Human	EDPPDAEPTALPALTTIDLQDLADCSSLLGSDAPPGDLAASQNHSHQTEADFNLQDFRD
Chimpanzee	EDPPDAEPTALPALTTIDLQDLADCSSLLGSDAPPGDLAASQNHSHQTEADFNLQDFRD
Mouse	EDPPDAEPALPALTTIDLQDLADCTSLLGTEASPSGDSSASQNPSLQTEEDFNLQNFDR *****:.******:*****:*.*.** :**** * ** *****:***
Human	TVDDLISDSSSMSPPTLASGDFPFSPCDISPFPGCLSPPLDPRALQSPPLRPPD--VPPP
Chimpanzee	TVDDLISDSSSMSPPTLASGDFPFSPCDISPFPGCLSPPLDPRALQSPPLRPPD--VPPP
Mouse	AMDDLIADSSSLMSPPLTNSDFPFSPCDVSSFGSCLSPSLDPPALGS-----PDLPPPPT :****:****:***.*:.******:*.**.***.*** ** * ** **
Human	EQYWKEVADQNQRALGDALVENNQLHVTLTQKQEEIASLKERNVQLKELASRTRHLASVL
Chimpanzee	EQYWKEVADQNQRALGDALVENNQLHVTLTQKQEEIASLKERNVQLKELASRTRHLASVL
Mouse	EQYWKEVADQNQRALGTALIENNQLHVTLTQKQEEIASLRERNVQLKELASRTRHLASVL ***** **:******:*****:*****
Human	DKLMITQSRDCGAAAEPFLLKAKAKRSLEELVSAAGQD---CAEVDAILREISERCDEAL
Chimpanzee	DKLMITQSRDCGAAAEPFLLKAKAKRSLEELVSAAGQD---CAEVDAILREISERCDEAL
Mouse	DKLMITQS-----PAEPFQIKATTKRSLEELFCAAGQAGQGCAEVDAILRDISQRCEEAL ***** .**** :*.*:*****.***** *****:***:***
Human	QSRDPKRPRLLEPANTDTRPGNLHGAFRGLRTDCSRSALNLSHSELEEGGSFSTRIRSH
Chimpanzee	QSRDPKRPRLLEPANTDTRPGNLHGAFRGLRTDCSRSALNLSHSELEEGRSFSTRIRSH
Mouse	HNRDPKRPRLQPEPDSKDCSSRNLHGAFRGLRTDCSASSVNLNSHSELEEGGSFSTPIRSH :.****** **.*.* .***** **:******:***** *****
Human	STIRTLAFPQGNAFTIRTANGGYKFRWVPS
Chimpanzee	STIRTLAFPQGNAFTIRTANGGYKFRWVPS
Mouse	STIRTLAFPQGKAFRTVTGGYKFRWVPS *****:*****.******

Abbildung 20: Konservierung Aminosäuresequenz MCIDAS

MCIDAS liegt stark konserviert vor. Die jeweils obenstehende humane MCIDAS Sequenz aus Aminosäuren (AS) wird mit der des Schimpansen und der Maus verglichen. Unter der Aminosäuresequenz findet sich jeweils eine Zuordnung welche Folgen ein möglicher Aminosäureaustausch hat. * = identische AS, : = AS unterscheiden sich, die Funktion ist aber konserviert, . = AS unterscheiden sich, die Funktion ist aber semi-konserviert, Leerstelle = AS unterscheiden sich und die Funktion ist nicht konserviert. - = Lücken im Alignment. Datenquelle: ensembl.org.

