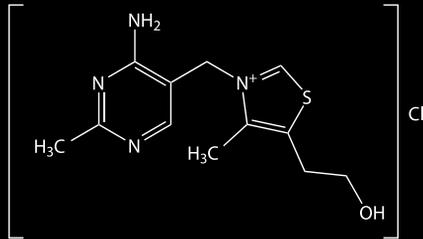


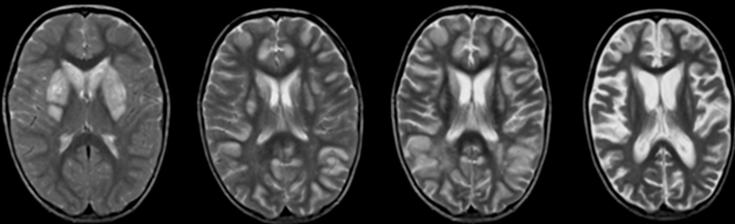
# Mutationen im *SLC19A3*-Gen bei einer Familie mit Biotin-abhängiger Basalganglienerkrankung

---

**Michelle Grzybowski**  
geb. Ondroushek



Thiamine (B1)



Inauguraldissertation zur Erlangung des Grades eines  
**Doktors der Medizin**  
des Fachbereichs Medizin der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Das Werk ist in allen seinen Teilen urheberrechtlich geschützt.**

**Die rechtliche Verantwortung für den gesamten Inhalt dieses Buches liegt ausschließlich bei den Autoren dieses Werkes.**

Jede Verwertung ist ohne schriftliche Zustimmung der Autoren oder des Verlages unzulässig. Das gilt insbesondere für Vervielfältigungen, Übersetzungen, Mikroverfilmungen und die Einspeicherung in und Verarbeitung durch elektronische Systeme.

1. Auflage 2016

All rights reserved. No part of this publication may be reproduced, stored in a retrieval system, or transmitted, in any form or by any means, electronic, mechanical, photocopying, recording, or otherwise, without the prior written permission of the Authors or the Publisher.

1<sup>st</sup> Edition 2016

© 2016 by VVB LAUFERSWEILER VERLAG, Giessen  
Printed in Germany



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

STAUFENBERGRING 15, D-35396 GIESSEN  
Tel: 0641-5599888 Fax: 0641-5599890  
email: [redaktion@doktorverlag.de](mailto:redaktion@doktorverlag.de)

[www.doktorverlag.de](http://www.doktorverlag.de)

**Mutationen im *SLC19A3*-Gen bei einer Familie  
mit Biotin-abhängiger  
Basalganglienerkrankung**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von

**Michelle Grzybowski,**  
geb. Ondroushek

aus Gießen

Gießen 2016

Aus dem medizinischen Zentrum für Kinderheilkunde und Jugendmedizin,  
Abteilung für Neuropädiatrie, Sozialpädiatrie und Epileptologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Leiter: Prof. Dr. Bernd A. Neubauer

1. Gutachter:	Prof. Dr. Bernd A. Neubauer
2. Gutachter:	PD Dr. D. von der Ahe
Tag der Disputation:	11.07.2016

## Inhaltsverzeichnis

<b>1.</b>	<b>Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1	<b>Biotin-abhängige Basalganglien Erkrankung (BBGD).....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie .....	1
1.1.2	Neurologisches Bild .....	2
1.1.3	Diagnostik.....	2
1.1.4	Differentialdiagnosen .....	4
1.1.5	Therapie und Prognose .....	4
1.1.6	Spektrum der klinischen Manifestationen bei <i>SLC19A3</i> -Defekt .....	5
1.1.7	Ätiologie und bekannte <i>SLC19A3</i> -Mutationen.....	6
1.2	<b>Störung des Thiaminstoffwechsels .....</b>	<b>7</b>
1.2.1	Thiamin und seine Funktion.....	7
1.2.2	Thiamin-Defizienz .....	8
1.3	<b>Die Familie der <i>SLC19</i>-Transporter.....</b>	<b>10</b>
1.3.1	<i>SLC19A1</i> .....	10
1.3.2	<i>SLC19A2</i> .....	11
1.3.3	<i>SLC19A3</i> .....	11
<b>2.</b>	<b>Zielsetzung.....</b>	<b>16</b>
<b>3.</b>	<b>Material und Methoden.....</b>	<b>18</b>
3.1	<b>Ethikvotum „Genomische Variation bei Patienten mit idiopathischen Epilepsien“, Aktenzeichen 03/11.....</b>	<b>18</b>
3.2	<b>Material .....</b>	<b>18</b>
3.2.1	Geräte .....	18
3.2.2	Bioinformatische Programme, Datenbanken und Software.....	19
3.2.3	Verbrauchsmaterial.....	20
3.2.4	Molekularbiologisches Material .....	22
3.2.5	Chemische Substanzen .....	24
3.2.6	Lösungen.....	26
3.2.7	Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe .....	28
3.2.8	Kommerziell erhältliche Kits.....	28
3.3	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>29</b>
3.3.1	DNA-Extraktion aus EDTA-Blut .....	29
3.3.2	Photometrische Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration .....	30

## Inhaltsverzeichnis

---

3.3.3	Agarose-Gelelektrophorese .....	31
3.3.4	Aufreinigung von PCR-Amplifikaten.....	31
3.3.5	Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
3.3.6	Restriktionsenzymatische Spaltung von Plasmid-DNA .....	32
3.3.7	Aufreinigung von pDNA im Mini-Maßstab .....	32
3.3.8	Aufreinigung von pDNA im Midi-Maßstab .....	32
<b>3.4</b>	<b>Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung von RNA.....</b>	<b>33</b>
3.4.1	RNA-Isolierung aus Fibroblasten .....	33
3.4.2	Leukozyten-Isolation.....	33
3.4.3	RNA-Isolierung aus Leukozyten-Lysat.....	34
3.4.4	cDNA-Synthese .....	34
<b>3.5</b>	<b>Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....</b>	<b>34</b>
3.5.1	PCR-Methodik im Rahmen der Sequenzanalyse des SLC19A3-Gens.....	35
3.5.2	Longrange-PCR.....	36
3.5.3	Expressionsnachweis von <i>SLC19A3</i> in Fibroblasten und Leukozyten.....	37
3.5.4	PCR-Methode zur Klonierung von cDNA .....	38
3.5.5	DNA-Klonierung.....	40
<b>3.6</b>	<b>Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen.....</b>	<b>41</b>
3.6.1	DNA-Sequenzierung.....	41
3.6.2	Sequenzanalyse .....	42
<b>3.7</b>	<b>TaqMan® Copy Number Untersuchung.....</b>	<b>42</b>
3.7.1	Versuchsprinzip .....	42
3.7.2	Versuchsdurchführung.....	43
3.7.3	Versuchsauswertung .....	44
<b>3.8</b>	<b>Kultivierung humaner Fibroblasten .....</b>	<b>45</b>
<b>3.9</b>	<b>Kultivierung von GripTite MSR-Zellen und MDCK-Zellen.....</b>	<b>45</b>
<b>3.10</b>	<b>Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen .....</b>	<b>46</b>
<b>3.11</b>	<b>Transportmessung an GripTite MSR-Zellen.....</b>	<b>47</b>
3.11.1	Versuchsvorbereitung.....	47
3.11.2	Aufnahmemessung.....	47
3.11.3	Flüssigszintillationsmessung.....	47
3.11.4	Proteinbestimmung.....	47
3.11.5	Auswertung der Aufnahmeversuche .....	48
<b>3.12</b>	<b>Indirekte Immunfluoreszenz .....</b>	<b>48</b>

## Inhaltsverzeichnis

---

3.12.1	Versuchsdurchführung.....	48
<b>3.13</b>	<b>Fluoreszenz-Mikroskopie.....</b>	<b>49</b>
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>50</b>
<b>4.1</b>	<b>Patienten.....</b>	<b>50</b>
4.1.1	Klinische Präsentation .....	50
4.1.2	Zerebrale Pathologie .....	52
<b>4.2</b>	<b>Mutationsanalyse .....</b>	<b>54</b>
4.2.1	Polymorphismen.....	56
4.2.2	Missense-Mutation in Exon 3.....	56
4.2.3	Kopienzahlvariations-Untersuchung (Copy Number Assay).....	58
4.2.4	Bruchpunktbestimmung mittels Longrange-PCR und Sequenzierung	59
<b>4.3</b>	<b>Expressionsnachweis von <i>SLC19A3</i> mittels PCR .....</b>	<b>65</b>
<b>4.4</b>	<b>Klonierung des <i>SLC19A3</i>.....</b>	<b>66</b>
<b>4.5</b>	<b>Funktionelle Auswirkung der <i>SLC19A3</i>-Mutationen.....</b>	<b>67</b>
4.5.1	Aufnahme von [3H]Thiamin hydrochlorid in transient transfizierten Zellen .....	67
4.5.2	Zeitabhängigkeit des <i>SLC19A3</i> -Transports .....	69
4.5.3	Kinetische Bestimmung des <i>SLC19A3</i> -vermittelten Transports .....	69
<b>4.6</b>	<b>Intrazelluläre Lokalisation der <i>SLC19A3</i>-Konstrukte.....</b>	<b>72</b>
<b>4.7</b>	<b>Neuropathologische Ergebnisse.....</b>	<b>73</b>
4.7.1	<i>SLC19A3</i> -Expression in unterschiedlichen Hirnregionen .....	73
4.7.2	<i>SLC19A3</i> -Expression unter Hypoxie- und Azidosebedingungen.....	75
<b>5.</b>	<b>Diskussion .....</b>	<b>77</b>
<b>5.1</b>	<b>Klinisches Spektrum der BBGD.....</b>	<b>77</b>
<b>5.2</b>	<b>Neuroradiologisches Spektrum .....</b>	<b>79</b>
<b>5.3</b>	<b>Neuropathologische Befunde der BBGD ähneln denen einer Wernicke-Enzephalopathie.....</b>	<b>80</b>
<b>5.4</b>	<b>Mutationsanalyse .....</b>	<b>81</b>
<b>5.5</b>	<b>Funktionelle Charakterisierung der <i>SLC19A3</i>-Mutationen.....</b>	<b>82</b>
5.5.1	Abhängigkeit der Transportfunktion von <i>SLC19A3</i> -Mutationen.....	82
5.5.2	Einfluss von <i>SLC19A3</i> -Mutationen auf die Proteinlokalisierung .....	84

## Inhaltsverzeichnis

---

5.6	Stressstimuli als Triggerfaktoren der BBGD.....	85
5.7	Auswirkungen einer Thiamin-Defizienz auf den zellulären Metabolismus .....	86
5.8	Therapie mit Biotin und Thiamin.....	86
6.	Konklusion.....	89
7.	Zusammenfassung.....	90
8.	Summary.....	91
9.	Abkürzungsverzeichnis .....	92
10.	Abbildungsverzeichnis .....	94
11.	Tabellenverzeichnis .....	95
12.	Literaturverzeichnis .....	96
13.	Anhang.....	107
14.	Publikationsverzeichnis.....	110
15.	Erklärung zur Dissertation.....	111
16.	Danksagung.....	112

# 1. Einleitung

## 1.1 Biotin-abhängige Basalganglien Erkrankung (BBGD)

Die BBGD gehört zur Gruppe der Progredienten Enzephalopathien. Diese beschreiben „einen unerbittlich destruktiven Prozeß im Gehirn“, welcher nach einem zunächst symptomfreien Intervall mit normaler kindlicher Entwicklung einsetzt und nach Krankheitsbeginn zu einer Regression zuvor erlernter Fähigkeiten führt (Hanefeld 1990). Progrediente Enzephalopathien im Kindesalter stellen eine heterogene Gruppe von Erkrankungen dar, die sich hauptsächlich aus angeborenen Stoffwechselstörungen zusammensetzen (Stromme et al. 2007). Hierzu gehören unter anderen auch die Infantile bilaterale striatale Nekrose oder die Akute nekrotisierende Enzephalopathie (Neilson et al. 2009; Straussberg et al. 2002). Eine kausale Therapie ist für diese und viele weitere Enzephalopathie-Syndrome nicht bekannt. Die BBGD, welche den Gegenstand der vorliegenden Arbeit darstellt, nimmt einen besonderen Stellenwert ein, da eine frühzeitige Behandlung mit den Vitaminen Biotin und Thiamin auf ungeklärte Weise die Progredienz der Erkrankung verhindern und bestehende neurologische Symptome bessern kann (Baertling et al. 2013; Marco et al. 2010; Okumura et al. 2009; Ozand et al. 1998). Die BBGD ist definiert als hereditäre neurometabolische Erkrankung mit zu Grunde liegenden autosomal-rezessiv vererbten Mutationen im *SLC19A3*-Gen. Mutationen in *SLC19A3* sind neben der BBGD auch mit weiteren Krankheitsbildern assoziiert. Hierzu zählen die Wernicke-ähnliche Enzephalopathie (WLE), die Atypischen Infantilen Spasmen (AIS) und das Leigh-Syndrom (Ozand et al. 1998; Kono et al. 2009; Yamada et al. 2010; Gerards et al. 2013; Kevelam et al. 2013).

Zunächst sollen die mit *SLC19A3*-Mutationen assoziierten Erscheinungsformen nach klinisch relevanten Gesichtspunkten gemeinsam besprochen werden. Anschließend werden die Unterschiede der Erkrankungen hervorgehoben.

### 1.1.1 Epidemiologie

Die BBGD ist eine sehr seltene Erkrankung. Bisher sind weltweit mindestens 70 Fälle beschrieben. 1998 wurde erstmals von zehn Patienten saudi-arabischen und jemenitischen Ursprungs berichtet, die an dieser Form der Enzephalopathie erkrankten (Ozand et al. 1998). Die BBGD tritt panethnisch auf (Debs et al. 2010), zeigt aber die höchste Prävalenz in der Region der Arabischen Halbinsel, insbesondere in Saudi-Arabien (Ozand et al. 1998; El-Hajj et al. 2008; Bindu et al. 2009; Tabarki et al. 2013a; Alfadhel et al. 2013). Die Erkrankung manifestiert sich überwiegend erstmals in der Zeit

zwischen Kleinkindalter (2. – 3. Lebensjahr) und später Kindheit (11. – 14. Lebensjahr) (Ozand et al. 1998; El-Hajj et al. 2008; Tabarki et al. 2013b; Tabarki et al. 2013a; Serrano et al. 2012; Bindu et al. 2009; Ortigoza-Escobar et al. 2014). Jedoch scheint das Manifestationsalter variabel zu sein, da auch bereits von Krankheitsausbrüchen im Säuglings- (El-Hajj et al. 2008; Yamada et al. 2010; Kevelam et al. 2013; Gerards et al. 2013) sowie im Erwachsenenalter berichtet wurde (Kono et al. 2009; Debs et al. 2010).

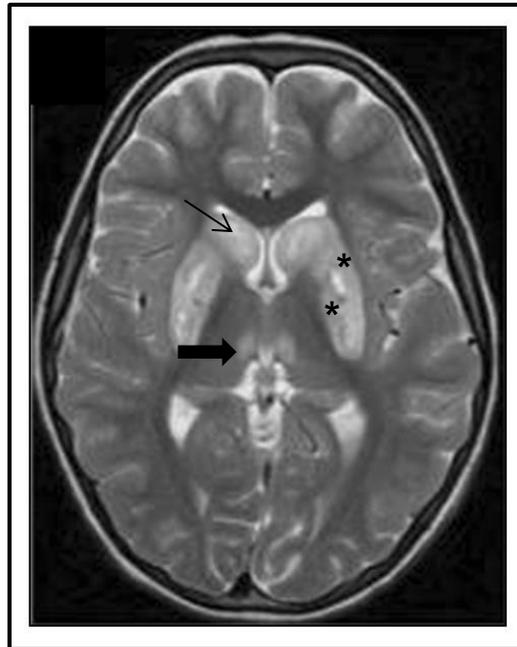
### **1.1.2 Neurologisches Bild**

Der klinische Phänotyp einer BBGD ist charakterisiert als subakute Enzephalopathie mit Bewusstseinsminderung, Dysarthrie, Dysphagie und Ataxie. Die Prodromalsymptome entwickeln sich zu einer akuten Enzephalopathie mit dystoner Bewegungsstörung als Zeichen einer extrapyramidalmotorischen Dysfunktion, epileptischen Anfällen (fokal oder generalisiert, oft tonisch-klonisch) und Verlust wichtiger Entwicklungsschritte. Infolge einer Pyramidenbahn-Schädigung kann es auch zu pathologischen Reflexen, Myoklonien, spastischer Tonuserhöhung der Muskulatur und Mono-, Para- oder Tetraparesen kommen. Ebenso sind Beeinträchtigungen der Kleinhirnfunktion bekannt, die sich neben einer Ataxie als Intentionstremor und Nystagmus manifestieren können. Auch von Einschränkungen der Hirnnervenfunktionen, wie Fazialisparesen oder externe Ophthalmoplegien, wurde berichtet. Unbehandelt verläuft die Enzephalopathie meist langsam progredient und endet nicht selten letal (Ozand et al. 1998; Tabarki et al. 2013a; Alfadhel et al. 2013; Fassone et al. 2013; Distelmaier et al. 2014).

### **1.1.3 Diagnostik**

Bislang existieren keine klar definierten Kriterien zur systematischen Diagnostik einer BBGD. Klinische sowie laborunterstützte Befunde geben aufgrund hoher Variation zwischen den Patienten lediglich Hinweise auf das Vorliegen eines Thiamin-Transporter-Defekts. So wurden nur bei wenigen Patienten eine leicht reduzierte Aktivität von Atmungsketten-Enzymen in Muskelgewebe, erhöhte Laktatwerte im Plasma (3,3 - 8,6 mmol/l) und im Bereich der Basalganglien nachgewiesen (Serrano et al. 2012; Gerards et al. 2013; Kevelam et al. 2013; Pérez-Dueñas et al. 2013). Ein Patient zeigte eine erhöhte Ausscheidung von alpha-Ketoglutarat im Urin und erhöhte Konzentrationen von Leucin und Isoleucin im Plasma (Pérez-Dueñas et al. 2013). Untersuchungen zum Nachweis von Infektionen, Speichererkrankungen und toxikologischen Schäden, die ebenfalls eine enzephalopathische Symptomatik auslösen können, waren dagegen bei allen untersuchten Patienten normwertig (Ozand et al. 1998; Zeng et al. 2005). Klinisch scheint die neuroradiologische Bildgebung ein

wichtiges diagnostisches Hilfsmittel zu sein (Kevelam et al. 2013). Der neurologische BBGD-Phänotyp ist assoziiert mit ausgeprägten Signalveränderungen in der Magnetresonanztomographie (MRT). In der T2-Wichtung zeigen sich charakteristischerweise Signalanhebungen in den Basalganglien, speziell in Nucleus Caudatus und Putamen (Ozand et al. 1998).



**Abbildung 1: Charakteristischer zerebraler MRT-Befund in T2-Wichtung einer BBGD (Alfadhel et al. 2013)**

In dieser T2-gewichteten zerebralen MRT-Darstellung zeigt sich eine für die BBGD charakteristische Signalanhebung und Schwellung des Nucleus lentiformis (\*), des Caput nuclei caudati (schmaler Pfeil) mit nekrotischen Veränderungen sowie eine Beteiligung des medialen Thalamus (kräftiger Pfeil).

Die beschriebenen MRT-Befunde der Patienten sind vielfältig. So zeigt die bildgebende Diagnostik einige Abweichungen von den charakteristischen striatalen Läsionen. Diffuse Signalanhebungen in kortikalen und subkortikalen Bereichen, Thalamus, Hirnstamm, Kleinhirn und zervikalem Rückenmark, sowie eine zerebrale und zerebelläre Atrophie erweitern das denkbare neuroradiologische Erscheinungsbild einer BBGD (Yamada et al. 2010; Kevelam et al. 2013; Tabarki et al. 2013a; Alfadhel et al. 2013). Unklar bleibt bislang, weshalb insbesondere die striatalen Bereiche des Gehirns im Rahmen der BBGD geschädigt werden.

Klinische und laborunterstützte sowie die charakteristischen neuroradiologischen Befunde sind wegweisend in der BBGD-Diagnostik. Um das Vorliegen einer BBGD zu verifizieren, steht – neben einem exiuvantibus Therapieversuch mit Biotin und Thiamin

- bislang die Mutationsanalyse des krankheitsverursachenden Gens (SLC19A3 siehe Kapitel 1.3.3) im Vordergrund. Bis heute sind für diese Entität weder Biomarker bekannt noch Screeningverfahren etabliert (Alfadhel et al. 2013). Aktuell ist daher eine zeitnahe Diagnosestellung mit Hilfe der verfügbaren diagnostischen Verfahren lebensrettend für BBGD-Patienten, da die Zeitspanne zwischen Ausbruch und Diagnose der Erkrankung direkt mit dem Krankheitsausgang der Patienten zu korrelieren scheint (Alfadhel et al. 2013).

### 1.1.4 Differentialdiagnosen

Das breit gefächerte klinische Bild sowie die unterschiedlichen Befunde in der neuroradiologischen Bildgebung erschweren die Diagnosestellung einer BBGD. Eine große Anzahl von toxischen, infektiösen, metabolischen und neurodegenerativen Erkrankungen gehen mit bilateralen Basalganglien-Läsionen sowie den in Abschnitt 1.2 beschriebenen neurologischen Symptomen einher (Straussberg et al. 2002; Bekiesinska-Figatowska et al. 2013). Insbesondere ist hier die Infantile bilaterale striatale Nekrose (IBSN) zu nennen. Es handelt sich hierbei um eine heterogene Gruppe von Erkrankungen, die durch eine symmetrische Degeneration vor allem des Nucleus Caudatus und des Putamens gekennzeichnet sind. Die klinische Erscheinung umfasst pyramidale sowie extrapyramidale Zeichen, wie Choreoathetose, Dystonie, Spastik, Dysarthrie und Dysphagie in Kombination mit mentaler Retardierung und Entwicklungsregression (Straussberg et al. 2002; Lal et al. 2013). Familiären Fällen der IBSN liegen unter anderem Mutationen des Gens *Nucleoporin 62 (Nup62)* zugrunde, welches für ein Protein der Kernporen kodiert und assoziiert mit weiteren Proteinen den nukleären Kernkomplex bildet. Dieser reguliert die Passage von messenger RNA und Proteinen zwischen Nukleus und Zytoplasma (Basel-Vanagaite et al. 2006).

### 1.1.5 Therapie und Prognose

Die Therapie der BBGD setzt sich aus einer Akut- und einer Erhaltungstherapie zusammen (Ozand et al. 1998; Tabarki et al. 2013a). Im Vordergrund der BBGD-Therapie steht die Akuttherapie mit Biotin (2 – 12 mg/kgKG/d) und/oder Thiamin (100 – 300 mg/kgKG/d). Die hochdosierte intravenöse Gabe der beiden B-Vitamine gleichzeitig oder Biotin / Thiamin alleine kann die Progredienz der BBGD verhindern und bestehende neurologische Symptome bessern (Ozand et al. 1998; Tabarki et al. 2013a; Alfadhel et al. 2013; Tabarki et al. 2015). Bei einigen Patienten konnte sogar eine vollständige Rekonvaleszenz erreicht werden. Bisher erbrachte die Behandlung bei Patienten mit *SLC19A3*-Mutationen jedoch - selbst bei verwandten erkrankten Personen - qualitativ unterschiedliche Ergebnisse (Debs et al. 2010). Während manche

Patienten gut auf die Therapie mit Biotin, jedoch nicht auf Thiamin ansprechen, besserte sich die Symptomatik anderer Patienten nur nach einer kombinierten Gabe von Thiamin und Biotin. Darüber hinaus wird von Patienten berichtet, die weder auf eine Biotin- noch eine Thiamin-Therapie reagierten, wohingegen andere lediglich mit Thiamin erfolgreich behandelt werden konnten (Ozand et al. 1998; Kono et al. 2009; Debs et al. 2010; Yamada et al. 2010; Serrano et al. 2012). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass vor allem der Zeitpunkt des Therapiebeginns für die Wirkqualität von entscheidender Bedeutung ist. So erzielte die hochdosierte Biotin- und/oder Thiamin-Therapie früh in der Krankengeschichte eine vollständige Genesung der Patienten mit BBGD innerhalb weniger Tage. Ein Therapiebeginn in späteren Krankheitsstadien hatte eine residuale Symptomatik unterschiedlichen Ausmaßes zur Folge. In den meisten Fällen blieben Auffälligkeiten in der kranialen MRT zurück, es zeigte sich jedoch keine weitere Progredienz (Ozand et al. 1998, 1998; Zeng et al. 2005; Alfadhel et al. 2013; Tabarki et al. 2013a; Ortigoza-Escobar et al. 2014; Kohrogi et al. 2015). Eine vollständige Regression der pathologischen MRT-Veränderungen ist ebenfalls möglich (El-Hajj et al. 2008). Aufgrund rezidivierender Symptome innerhalb eines Monats nach Therapie-Unterbrechung scheint vor allem die Erhaltungstherapie mit Biotin und/oder Thiamin zur dauerhaften Behandlung von hoher Relevanz zu sein (Ozand et al. 1998). Eine Dosierungsempfehlung der Langzeittherapie mit Biotin und Thiamin von *SLC19A3*-defizienten Patienten existiert allerdings nicht (Ortigoza-Escobar et al. 2014).

Bis heute ist ungeklärt, nach welchem Mechanismus Thiamin und insbesondere Biotin eine Besserung der BBGD herbeiführen. Die BBGD beruht auf Mutationen im *SLC19A3*-Gen, das für einen hochspezifischen Thiamin-Transporter kodiert. Biotin selbst ist kein Substrat des *SLC19A3* (Zeng et al. 2005; Subramanian et al. 2006a). Es wird vermutet, dass Biotin die Expression von *SLC19A3* erhöht und somit seine Funktionsfähigkeit bessern kann (Vlasova et al. 2005; Rodriguez-Melendez und Zempleni 2003). Ebenso bleibt bislang der Grund für die unterschiedliche Wirkqualität der Biotin- und/oder Thiamin-Therapie selbst bei verwandten Patienten unklar (Subramanian et al. 2006a; Gerards et al. 2013).

### **1.1.6 Spektrum der klinischen Manifestationen bei *SLC19A3*-Defekt**

*SLC19A3*-Mutationen traten bei unterschiedlichen Erkrankungsbildern mit einer Breite von klinischen und neuroradiologischen Symptomen auf. So stehen genetische Veränderungen in *SLC19A3* nicht nur mit der BBGD in Zusammenhang, sondern wurden ebenfalls bei zwei Geschwistern mit der sogenannten Wernicke-ähnlichen Enzephalopathie und bei vier verwandten Patienten mit Atypischen Infantilen Spasmen

beobachtet (Kono et al. 2009; Yamada et al. 2010). Aktuell wurden ebenfalls *SLC19A3*-Mutationen als eine Ursache des Leigh-Syndroms anhand von mindestens 14 Patienten nachgewiesen (Gerards et al. 2013; Kevelam et al. 2013; Fassone et al.; 2013; Distelmaier et al. 2014).

Folgende Gemeinsamkeiten lassen sich bei einer *SLC19A3*-Defizienz zusammenfassen:

1. Präsentation mit akuten und wiederkehrenden Episoden einer Enzephalopathie, die meist infolge eines febrilen Infekts oder in kataboler Stoffwechsellage auftreten (siehe Kapitel 1.1.7).
2. Bilateral symmetrische Verteilung von Läsionen im zerebralen Kortex, Basalganglien, Thalamus und Periaquäduktalem Grau.
3. Meist dramatische Besserung der Symptomatik während einer frühzeitigen Therapie mit Biotin und/oder Thiamin.

Die phänotypische Ausprägung von *SLC19A3*-Mutationen unterscheidet sich im Manifestationsalter, in der dominierenden neuroradiologischen Erscheinung und in der klinischen Morphologie. Gleichwohl differieren die Erscheinungsbilder in dem therapeutischen Effekt von Biotin und/oder Thiamin und somit auch im Outcome (Kevelam et al. 2013). In Tabelle A1 des Anhangs sind die verschiedenen, mit *SLC19A3*-Mutationen assoziierten Erkrankungen und ihre Unterschiede aufgeführt.

### **1.1.7 Ätiologie und bekannte *SLC19A3*-Mutationen**

Im Jahr 2005 identifizierte eine Arbeitsgruppe um Zeng autosomal-rezessiv vererbte Mutationen im Gen *SLC19A3*, des zweiten Thiamin-Transporters, auf dem Chromosomenabschnitt 2q36.3 als Ursache der BBGD (Zeng et al. 2005). Seitdem steht die molekulargenetische Diagnostik und Erforschung des zerebral exprimierten *SLC19A3* zur Aufklärung pathophysiologischer Mechanismen der BBGD im Mittelpunkt. Inzwischen wurden mehrere Mutationen im *SLC19A3*-Gen bei BBGD-Patienten nachgewiesen. Häufig handelt es sich dabei um Kinder konsanguiner Eltern (Alfadhel et al. 2013; Tabarki et al. 2013a).

Die funktionellen Effekte auf den Thiamin-Transport wurden nur für wenige *SLC19A3*-Mutationen untersucht. Bei einzelnen Mutationen konnte ein reduzierter Transport oder sogar ein Funktionsverlust des Transporters nachgewiesen werden (Subramanian et al. 2006a; Kono et al. 2009; Yamada et al. 2010).

Neben den molekulargenetischen Faktoren scheinen auch mehrere Umweltfaktoren im Zusammenhang mit der Krankheitsätiologie zu stehen. So können die neurologischen

Symptome infolge eines febrilen Infekts, einer Impfung oder in kataboler Stoffwechsellage, z.B. posttraumatisch oder bei neonataler Asphyxie, auftreten (Ozand et al. 1998; Debs et al. 2010; Kevelam et al. 2013; Pérez-Dueñas et al. 2013; Tabarki et al. 2013a). Bis heute ist jedoch nicht geklärt, wie extrinsische Faktoren Episoden einer Enzephalopathie auslösen können. Weiterhin sind die pathophysiologischen Mechanismen der Phänotyp-Ausprägung einer Thiamin-Transporter-Dysfunktion ungeklärt. Aktuelle Erklärungsansätze gehen davon aus, dass ein Thiamin-Transporter-2-Defekt einen intrazellulären Thiamin-Mangel zur Folge hat, der eine Störung des Energiemetabolismus bedingt (Kevelam et al. 2013).

Die Auswirkungen einer Thiamin-Defizienz auf den humanen Energiemetabolismus sollen im folgenden Gliederungspunkt beleuchtet werden.

## 1.2 Störung des Thiaminstoffwechsels

Die Integrität des Thiamin-Stoffwechsels trägt essentiell zur Aufrechterhaltung des Energiegleichgewichts im menschlichen Körper bei. Thiamin-Mangelzustände können weitreichende Folgen vor allem in Organen mit hohem Energiebedarf, wie dem menschlichen Nervensystem, auslösen (Subramanya et al. 2010).

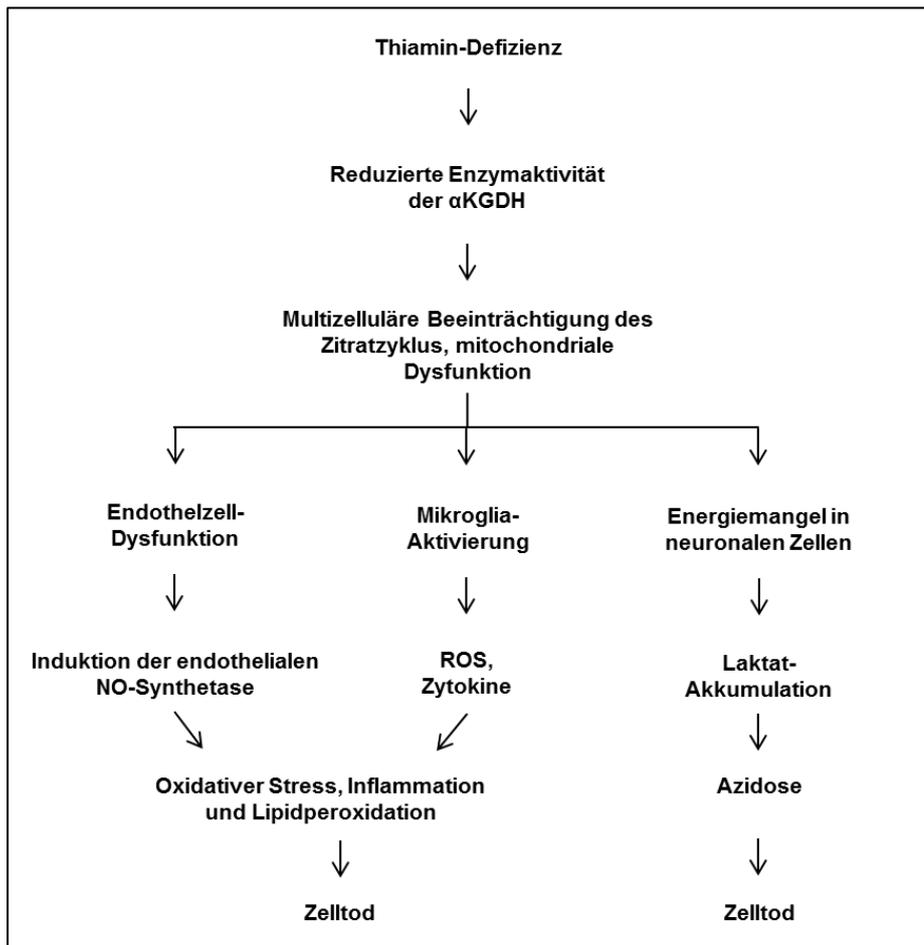
### 1.2.1 Thiamin und seine Funktion

Thiamin und seine im Organismus nachweisbaren Phosphorsäureester gehören zur Gruppe der wasserlöslichen Vitamine des B-Komplexes und können unter dem Begriff Vitamin B1 zusammengefasst werden (Lonsdale 2006). Der menschliche Körper ist nicht in der Lage Thiamin selbst zu synthetisieren und ist daher auf eine Zufuhr von 1,4 mg Thiamin pro Tag angewiesen (Thomson et al. 2002). Im menschlichen Organismus liegt Thiamin nur zu geringem Anteil frei vor (10 – 30 nM Plasmakonzentration) (Bettendorff et al. 1996). Im Intestinum wird Thiamin über einen aktiven Transporter-vermittelten Prozess aufgenommen. Es wurden zwei Transporter identifiziert; Thiamin-Transporter-1 und -2. Liegen höhere Thiamin-Konzentrationen vor, erfolgt die intestinale Aufnahme des Vitamins über passive Diffusion (Sriram et al. 2012). Mit Hilfe des Enzyms Thiamin-Pyrophosphokinase wird Thiamin zu dem biologisch aktiven Thiaminpyrophosphat umgewandelt (Desjardins und Butterworth 2005). Thiaminpyrophosphat hat als Kofaktor einiger mitochondrialer Dehydrogenasen, wie der Pyruvat-Dehydrogenase (PDH) und der  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase ( $\alpha$ KGDH), eine zentrale Rolle im Zitratzyklus und damit im Energiemetabolismus (Butterworth et al. 1993).

### 1.2.2 Thiamin-Defizienz

Der menschliche Organismus hat eine eingeschränkte Speicherkapazität von 30 – 50 mg Thiamin. Die biologische Halbwertszeit von Thiamin beträgt 9 – 18 Tage. Daher kann sich ein Nährstoffmangel bereits nach 2 – 3 Wochen unzureichender Thiamin-Zufuhr manifestieren (Ariaey-Nejad et al. 1970; Leevy 1982).

Häufig entwickelt sich aus einer Thiamin-Defizienz eine ausgeprägte neurologische Symptomatik, die 1881 von Carl Wernicke erstmals als Wernicke-Enzephalopathie (WE) beschrieben wurde. Diese ist durch die Symptomtrias Ataxie, Verwirrtheit und Ophthalmoplegie gekennzeichnet (Wernicke 1881; Harper et al. 1986). Charakteristisch für diese Erkrankung ist ein Aktivitätsverlust des Enzyms  $\alpha$ KGDH sowie ein ausgeprägter selektiver neuronaler Zellverlust (Butterworth 1989; Kril 1996; Desjardins und Butterworth 2005). Die Pathogenese der massiven Zellnekrose infolge einer Thiamin-Defizienz ist bislang ungeklärt. Ein möglicher Erklärungsansatz basiert auf der Hypothese einer Aktivitätsreduktion der  $\alpha$ KGDH bei Thiamin-defizienten Patienten mit konsekutiver mitochondrialer Dysfunktion und reduziertem Fluss des Zitratzyklus in Endothelzellen, Neuronen und Mikrogliazellen. Daraus folgt, neben einer Endothelzell-Dysfunktion, die Aktivierung der Mikrogliazellen, welche reaktive Sauerstoffspezies (ROS) und Zytokine produzieren. Gemeinsam lösen diese Veränderungen oxidativen Stress und Inflammation in den Zellen aus, die in einer oxidativen Degradation der Membranlipide resultieren und letztendlich im neuronalen Zelltod enden. Als mögliche Ursache des apoptotischen Zelltods wird auch eine Laktatazidose, die aus der Zitratzyklus-Dysfunktion mit konsekutiv gesteigerter anaerober Glykolyse hervorgeht, angenommen (Abbildung 2) (Pannunzio et al. 2000; Desjardins und Butterworth 2005; Hazell und Butterworth 2009).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung der potenziellen Konsequenzen einer Thiamin-Defizienz (modifiziert nach Desjardins und Butterworth 2005)**

Eine zelluläre Thiamin-Defizienz führt möglicherweise über den Aktivitätsverlust der  $\alpha$ KGDH zu einer Beeinträchtigung des Zitratzyklus sowie zu einer mitochondrialen Dysfunktion. Daraus folgt - neben einer Aktivierung von Mikrogliazellen mit der Produktion von reaktiven Sauerstoffspezies und Zytokinen – eine Endothelzell-Dysfunktion, die oxidativen Stress und Inflammation in den Zellen auslösen und über eine oxidative Degradation der Membranlipide im Zelltod enden. Als weitere mögliche Ursache apoptotischen Zelltods aufgrund einer Thiamin-Defizienz ist ein Energiemangel in neuronalen Zellen mit gesteigerter anaerober Glykolyse und darausfolgender Laktatazidose anzusehen.

Aufgrund der eingeschränkten Speicherkapazität und der geringen biologischen Halbwertszeit kann sich ein Thiamin-Mangelzustand rasch manifestieren (Ariaey-Nejad et al. 1970; Leevy 1982). Übermäßiger Alkoholkonsum und eine einseitige Ernährung sind die häufigsten Ursachen einer alimentären Thiamin-Defizienz (Sriram et al. 2012). Weitere prädisponierende Faktoren sind u.a. maligne Erkrankungen, parenterale Ernährung und Hyperemesis gravidarum (D'Aprile et al. 2000; Kornreich et al. 2005; Chiossi et al. 2006). Ein Thiamin-Mangel kann jedoch nicht nur ernährungs- und

krankheitsbedingt, sondern gleichfalls infolge eines Thiamin-Transporter-Defekts auftreten (Subramanian et al. 2006a), da die zelluläre Thiamin-Aufnahme über die Thiamin-Transporter 1 und 2 erfolgt (Said et al. 1999).

Im Folgenden sollen die zur *SLC19*-Familie gehörenden drei Thiamin- / Folat-Transporter dargestellt werden. Während die Eigenschaften des zweiten Thiamin-Transporters, der Gegenstand der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen war, unter Abschnitt 1.3.3 genauer betrachtet werden, wird nur zur Vollständigkeit kurz auf die beiden anderen Mitglieder der *SLC19*-Familie eingegangen.

### 1.3 Die Familie der *SLC19*-Transporter

Das *Human Genome Organisation Nomenclature Committee* unterscheidet aktuell 52 *SLC* Gen-Familien (Hediger et al. 2004; Hediger et al. 2013). Solute Carrier (*SLC*) sind Membranproteine, welche die Aufnahme und Abgabe lebenswichtiger Stoffe, wie Zucker, Aminosäuren, Nukleotide, organischer und anorganischer Ionen, sowie Arzneistoffe und Xenobiotika über die Zellmembran vermitteln (Höglund et al. 2011; Hediger et al. 2013).

Die *SLC19*-Familie der Folat/Thiamin-Transporter umfasst drei Subfamilien – *SLC19A1*, *SLC19A2* und *SLC19A3*. Alle drei Transporter teilen eine Aminosäure-Sequenzidentität von 39% bis 53%. Innerhalb der *SLC19*-Familie zeigen *SLC19A2* und *SLC19A3* die höchste phylogenetische Verwandtschaft mit einer 53%igen Sequenzidentität auf Aminosäureebene (Zhao und Goldman 2013; Ganapathy et al. 2004). Die drei Transporter zeigen eine ubiquitäre Expression im Körper (Eudy et al. 2000; Zhao und Goldman 2013).

#### 1.3.1 *SLC19A1*

*SLC19A1* wurde 1994 als erstes Mitglied der *SLC19*-Familie aus humanen Brustkrebszellen kloniert und als Folat-Transporter (reduced folate carrier-1, *RFC-1*) identifiziert (Dixon et al. 1994). Für *RFC-1* konnte das größte Substratspektrum der *SLC19*-Familie nachgewiesen werden. Er transportiert neben Folsäure ebenfalls Folat-Derivate und Folat-Antagonisten (z.B. Methotrexat) (Zhao und Goldman 2013), sowie negativ geladene Thiaminderivate, wie Thiaminpyrophosphat (Zhao et al. 2001). Der Membrantransport wird durch einen Antiport von Anionen gegen das Substrat getrieben (Henderson und Zevely 1983). Mutationen im *SLC19A1*-Gen können zu einem Funktionsverlust des *RFC-1* führen und spielen eine entscheidende Rolle in der

Resistenzbildung von Tumorzelllinien gegenüber Chemotherapeutika, wie dem Folsäure-Antagonisten Methotrexat (Zhao und Goldman 2003).

### 1.3.2 SLC19A2

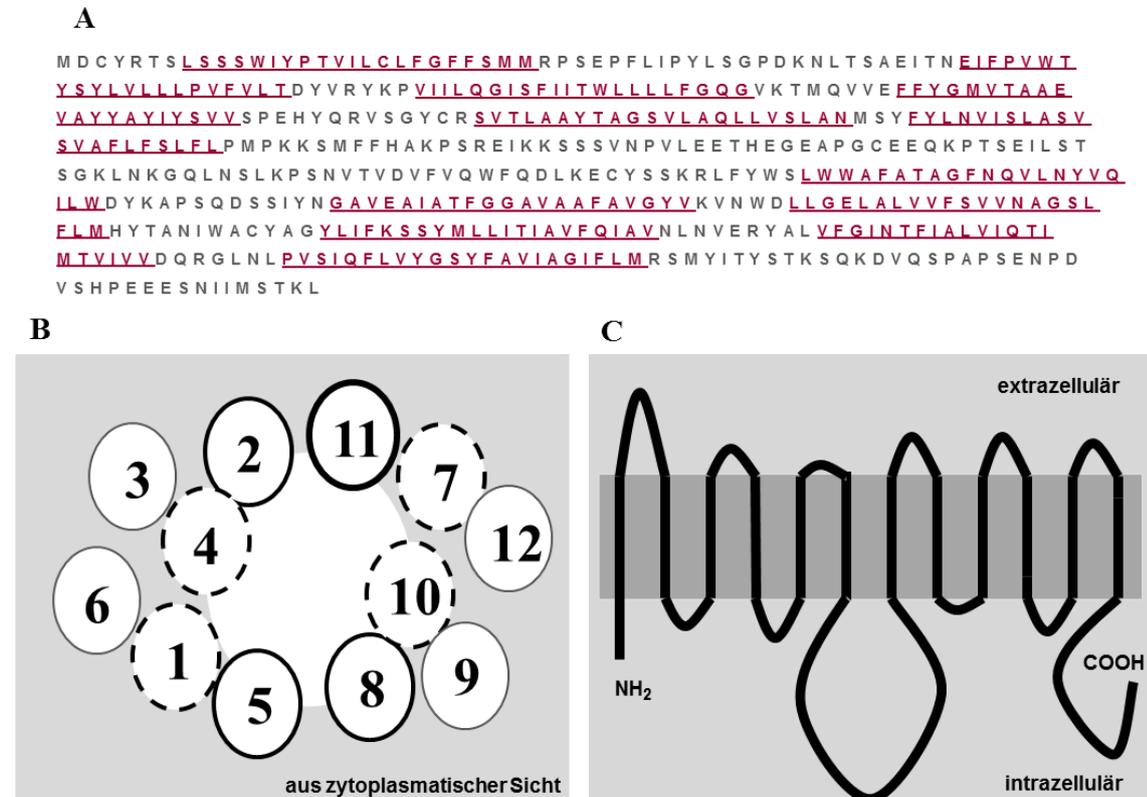
*SLC19A2* wurde erstmals im Jahr 1999 durch Positionsklonierung und Homologie-Suche als hochspezifischer Thiamin-Transporter-1 identifiziert (Diaz et al. 1999; Dutta et al. 1999; Fleming et al. 1999). *SLC19A2* weist eine besonders hohe Expressionsrate in Herz- und Skelettmuskelzellen auf. In polarisierten Zellen wird *SLC19A2* hauptsächlich in die basolaterale Zellmembran sortiert und sorgt dort für einen Natrium-unabhängigen und pH-abhängigen Thiamin-Transport (Dutta et al. 1999; Boulware et al. 2003). Die treibende Kraft bildet dabei ein nach außen gerichteter Protonen-Gradient (Dutta et al. 1999). Pathologische Mutationen im *SLC19A2*-Gen bedingen die sogenannte Thiamin-responsive megaloblastäre Anämie (TRMA) (Labay et al. 1999; Neufeld et al. 2001; Raz et al. 2000), welche durch die Symptomtrias makrozytäre Anämie, Diabetes mellitus und sensorineuronale Taubheit gekennzeichnet ist. Durch eine hochdosierte Thiamin-Therapie ist diese Erkrankung erfolgreich behandelbar (Porter et al. 1969). Angesichts der Tatsache, dass bei TRMA-Patienten weder klassische Symptome einer Thiamin-Defizienz (siehe Kapitel 1.2.2) noch aberrante Thiamin-Konzentrationen im Blut nachzuweisen sind, wurde schon früh die Existenz eines zweiten, bis dahin noch nicht bekannten, Thiamin-Transporters vermutet (Eudy et al. 2000; Fleming et al. 1999).

### 1.3.3 SLC19A3

#### Molekulare Struktur

Im Jahr 2000 gelang die Identifizierung des dritten und jüngsten Mitglieds der *SLC19*-Familie, *SLC19A3*, durch Homologie-Klonierung aus humaner Plazenta- und muriner Nieren-cDNA. Das *SLC19A3*-Gen befindet sich auf dem humanen Chromosom 2q37. Es bildet ein Protein aus 496 Aminosäuren mit einer Molekularmasse von ~56 kDa (Eudy et al. 2000; Rajgopal et al. 2001). Basierend auf bioinformatischen Berechnungen wurde für den *SLC19A3*-Transporter ein Membrantopologie-Modell mit zwölf Transmembrandomänen (TMD) mit zytoplasmatischem N- und C-Terminus angenommen. Zwischen TMD 6 und 7 befindet sich eine große zytoplasmatische Schleife, die die pseudosymmetrischen TMD 1-6 und 7-12 miteinander verbindet (siehe Abbildung 3) (Eudy et al. 2000; Dutta et al. 1999). Basierend auf der Kristallstruktur anderer Mitglieder der Major Facilitator Superfamily (Familie von Membranproteinen) werden die zwölf TMD in drei funktionelle Gruppen eingeteilt (siehe Abbildung 3). TMD 2, 5, 8 und 11 stellen den Poren-bildenden Anteil dar. Zentral liegen die TMD 1, 4, 7

und 10, peripher die TMD 3, 6, 9 und 12. Alle zwölf TMD umgeben einen zentralen hydrophilen Raum, in dem die Substrat-Bindung und -Translokation stattfindet (Eudy et al. 2000; Dutta et al. 1999).



### Abbildung 3: Schematischer Überblick über den Transporter *SLC19A3*

(A) Aminosäuresequenz (496 Aminosäuren) von *SLC19A3*, wobei die rot markierten Sequenzen die potentiellen TMD markieren. (B) Zyttoplasmatische Aufsicht: *SLC19A3* besitzt zwölf TMD, die sich in drei funktionelle Gruppen aufteilen: TMD 2,5,8 und 11 (schwarze Linien) stellen den Poren-bildenden Anteil, TMD 1,4,7 und 10 (unterbrochene Linien) den zentralen Anteil und 3,6,9, und 12 (graue Linien) den peripheren Bereich dar. Im zentralen hydrophilen Raum findet die Substratbindung und –translokation statt (nach Subramanian et al. 2006). (C) Orientierung von *SLC19A3* in der Zellmembran.

### Substratspektrum und Transporteigenschaften des *SLC19A2* und –A3

*SLC19A3* vermittelt eine effiziente, Natrium-unabhängige zelluläre Thiamin-Aufnahme. Als treibende Kraft des Membrantransports wird ein nach außen gerichteter Protonengradient vermutet, der die Thiamin-Aufnahme im Antiport mit H<sup>+</sup> vermittelt (Rajgopal et al. 2001). Dies wird bestätigt durch eine signifikante Abnahme der *SLC19A3*-Transportleistung bei extrazellulärer Azidose, im Vergleich zur optimalen Thiamin-Aufnahme im neutralen Bereich (Rajgopal et al. 2001). Für *SLC19A3* wurde

eine niedrige Thiamin-Affinität ( $K_m = 2,66 \mu\text{M}$ ), jedoch eine hohe Transportkapazität ermittelt (Rajgopal et al. 2001). *SLC19A2* hingegen wurde als hochaffiner Transporter ( $K_m = 70,0 \text{ nM}$ ) mit geringer Kapazität charakterisiert (Fleming et al. 1999; Dutta et al. 1999). In nativen *HEK293*-Zellen zeigten Thiamin-Analoga, wie Amprolium, Oxythiamin und Benfothiamin eine signifikante *Cis*-Hemmung, unmarkiertes Thiamin hingegen zeigte eine *Trans*-Stimulation des *SLC19A3*-vermittelten Transports (Ashokkumar et al. 2006).

### **Gewebeexpression**

Eine *SLC19A3*-Expression findet sich in nahezu allen Geweben mit dem höchsten Expressionslevel in Plazenta, gefolgt von Leber, Niere und Herz (Eudy et al. 2000). Im Gehirn zeigte sich die höchste Expressionsrate im Thalamus (Kono et al. 2009). In Leukozyten und fetalem Hirngewebe konnte keine Expression nachgewiesen werden (Eudy et al. 2000).

Die Membranlokalisation des *SLC19A3* wurde in einigen Zellarten experimentell nachgewiesen. In Madin-Darby canine kidney (*MDCK*)-Zellen, Enterozyten und Azinuszellen des Pankreas wird *SLC19A3* in der apikalen, während *SLC19A2* in der basolateralen Zellmembran exprimiert wird. Die divergente Expression von *SLC19A3* und *SLC19A2* in polarisierten Zellen weist auf einen gerichteten Thiamin-Transport und unterschiedliche Funktionen der Transporter hin (Boulware et al. 2003; Said et al. 2004; Subramanian et al. 2012). *SLC19A3* scheint für die zelluläre Akkumulation und die Aufrechterhaltung der Thiamin-Konzentration in Enterozyten zuständig zu sein, während *SLC19A2* den Thiamin-Export vermittelt (Reidling et al. 2010). Die Beteiligung beider Transporter an der Thiamin-Rückresorption in der Niere wurde in *HEK293*-Zellen nachgewiesen (Ashokkumar et al. 2006).

### **Regulation der Expression des *SLC19A3***

2006 hat die Arbeitsgruppe um Reidling die Abhängigkeit der *SLC19A2*- und *SLC19A3*-Expression vom Entwicklungsstadium der Maus untersucht und eine Abnahme der Expression von *SLC19A2* und *SLC19A3* im Laufe der Entwicklung von Mäusen, vom Neugeborenen bis hin zu adulten Tieren, aufgezeigt (Reidling et al. 2006). Die basale Expression des humanen *SLC19A3* steht unter der Regulation der Transkriptionsfaktoren *stimulating protein SP1* und *SP3* (Nabokina und Said 2004). Exogene Faktoren beeinflussen ebenfalls die Expression des *SLC19A2* und *-A3*. Es ist bekannt, dass chronischer Alkoholkonsum auf Grund einer Inhibition der intestinalen Thiamin-Aufnahme zu einer Thiamin-Defizienz führt (Said 2011). In humanen duodenalen Adonokarzinomzellen (*HuTu-80*) reduzierte die chronische Exposition mit

Ethanol die Transporter-vermittelte Thiamin-Aufnahme über eine verminderte Expression von *SLC19A2* und *-A3* auf Protein, mRNA und transkriptionaler Ebene (Subramanya et al. 2010). Die intestinale Thiamin-Aufnahme wird auch durch eine Infektion mit enteropathogenen *E.coli* negativ beeinflusst. Dies zeigte eine herabgesetzte Expression von *SLC19A2* und *-A3* in humanen epithelialen kolorektalen Adenokarzinomzellen (*Caco-2*). (Ashokkumar et al. 2009). In *SLC19A2*- und *SLC19A3*-transgenen Mäusen führte eine Diät-induzierte Thiamin-Defizienz zu einer signifikant gesteigerten intestinalen Thiamin-Aufnahme durch eine transkriptionell gesteigerte Expression von *SLC19A3*. Im Zerebrum zeigte *SLC19A3* eine unveränderte Expression, während hier *SLC19A2* verstärkt exprimiert wurde. (Reidling und Said 2005). Darüber hinaus führte die Inkubation von *HEK293*-Zellen in Thiamin-defizientem Medium zu einer signifikanten Steigerung der initialen Thiamin-Aufnahme über *SLC19A2* und *SLC19A3* (Ashokkumar et al. 2006). Interessanterweise führt eine Biotin-Defizienz zu einer verminderten Expression von *SLC19A3* in humanen Leukozyten, wobei Biotin kein Substrat von *SLC19A3* ist. Der zuständige Mechanismus wurde bisher nicht eindeutig geklärt (Vlasova et al. 2005; Subramanian et al. 2006a). Des Weiteren konnte eine stärkere Expression von *SLC19A3* in Brustkrebszellen unter Hypoxie-Bedingungen nachgewiesen werden. Hier scheint die Aktivierung des Transkriptionsfaktors hypoxia-inducible-factor 1 $\alpha$  (*HIF1 $\alpha$* ) eine Anpassung des zellulären Glucose-Metabolismus und der Energie-Homöostase an hypoxischen Stress durch eine stärkere Expressionsrate des *SLC19A3* zu induzieren (Sweet et al. 2010).

### **Pathophysiologie**

Mutationen im *SLC19A3*-Gen scheinen, je nach Lokalisation im Protein, entweder die zelluläre Thiamin-Aufnahme zu verändern oder zu einem fehlerhaften Targeting des Proteins in die apikale Zellmembran zu führen. Der Einbau des *SLC19A3* in die apikale Membran hängt maßgeblich von der Integrität der transmembranären Polypeptid-Struktur ab, sodass schon minimale Protein-Trunkierungen im Bereich der C-terminalen TMD die Expression von *SLC19A3* an der Zelloberfläche verhindern (Subramanian et al. 2006b). Es wird vermutet, dass Mutationen in peripher gelegenen TMD eine Konformationsänderung der Poren-bildenden Helices bewirken, gefolgt von einem gestörten Sorting und somit zu einer Funktionseinschränkung des *SLC19A3*-vermittelten Transports führen. Auch einzelne Aminosäureaustausche können zu einer verringerten Membranexpression führen. Dies wurde für G23V in TMD1 und T422A in TMD11 gezeigt, welche bei Patienten mit Biotin-abhängigen Basalganglien Erkrankung (BBGD) gefunden wurden (Subramanian et al. 2006a). Mutationen in einer extrazellulären oder zytoplasmatischen Schleife scheinen dagegen keine Auswirkung

auf die Funktion von *SLC19A3* zu haben (Subramanian et al. 2006a; Subramanian et al. 2006b). Mit einigen Mutationen wurde eine verminderte oder aufgehobene zelluläre Thiamin-Aufnahme assoziiert, womit die Bedeutung eines funktionellen *SLC19A3* bei der Aufnahme von Thiamin in die Zellen bestätigt wurde (Subramanian et al. 2006a; Kono et al. 2009; Yamada et al. 2010; Gerards et al. 2013).

Wie Mutationen im *SLC19A3*-Gen über eine zelluläre Thiamin-Defizienz eine BBGD auslösen, oder ob weitere Faktoren zur Entstehung der BBGD beitragen, ist bislang ungeklärt.

## 2. Zielsetzung

Die BBGD ist eine seltene panethnische Erkrankung, deren pathophysiologische Mechanismen bislang noch zu großen Teilen unerforscht geblieben sind. Es ist bekannt, dass autosomal-rezessiv vererbte Mutationen im *SLC19A3*-Gen der Erkrankung ursächlich zugrunde liegen, jedoch wurden nur wenige Mutationen hinsichtlich ihrer funktionellen Auswirkungen auf den *SLC19A3*-Transporter untersucht. Daher ist bislang unklar, wie die Mutationen die Funktion des *SLC19A3* beeinflussen und welche Bedeutung sie an der Entstehung der Biotin-abhängigen Basalganglien-Erkrankung haben.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Mutationsanalysen im *SLC19A3*-Gen bei einem Kollektiv von zehn Patienten, die sich mit einer progredienten Enzephalopathie mit vornehmlicher Beteiligung der Basalganglien in der zerebralen Bildgebung präsentierten, durchgeführt. Des Weiteren sollte die Beeinflussung der Funktionalität und Membranlokalisation der identifizierten *SLC19A3*-Mutationen mittels Transportstudien und immunhistochemischen Methoden in transient transfizierten Zellen untersucht werden.

Wiederholt wurde in der Literatur von dem Auftreten der Enzephalopathie bei zuvor gesunden Kindern infolge eines febrilen Infekts oder einer katabolen Stoffwechsellage berichtet. Bislang ist nicht geklärt, wie diese extrinsischen Faktoren Episoden einer Enzephalopathie auslösen können. Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang ist, dass Stressstimuli, wie z.B. Fieber, die Expression von *SLC19A3* modulieren, wohingegen ein mutierter Thiamin-Transporter nicht auf Stressfaktoren reagieren kann. Im Rahmen eines Fortführungsprojektes am Institut für Neuropathologie wurde dazu die Expression von *SLC19A3* nach Inkubation von Kontroll- und BBGD-Patienten-Fibroblasten unter Hypoxie- und Azidose-Bedingungen untersucht und mit der *SLC19A3*-Expression in Fibroblasten nach Inkubation unter Normal-Bedingungen verglichen. Hypoxie und Azidose sind zwei Mikro-Umweltfaktoren, die mit inflammatorischen Prozessen und verändertem Metabolismus in Verbindung gebracht wurden (Kominsky et al. 2010; Majmundar et al. 2010) und sollten in den durchgeführten Expressionsstudien oxidativen Stress imitieren. Weiterhin sollte bis dahin erstmals postmortales Hirngewebe eines verstorbenen BBGD-Patienten hinsichtlich seiner histologischen und ultrastrukturellen Veränderungen untersucht und die *SLC19A3*-Expression in unterschiedlichen Hirnregionen des Patienten mit der Expression im Hirngewebe eines Kontroll-Patienten verglichen werden.

## Zielsetzung

---

Durch diese Untersuchungen erhoffen wir weitere Einblicke in die Entstehung der BBGD sowie Erklärungsansätze für die Bedeutung des *SLC19A3* in dieser Entwicklung.

### 3. Material und Methoden

#### 3.1 Ethikvotum „Genomische Variation bei Patienten mit idiopathischen Epilepsien“, Aktenzeichen 03/11

Unter ethischen, medizinisch-wissenschaftlichen und rechtlichen Gesichtspunkten wurde das vorliegende Forschungsvorhaben am 13. Januar 2011 von der Ethikkommission der Justus-Liebig Universität Giessen geprüft und genehmigt. Das Ethikvotum trägt das Aktenzeichen 03/11. Die schriftliche Einverständniserklärung zur Studienteilnahme wurde von allen Patienten bzw. deren Sorgeberechtigten gemäß den Vorgaben der Ethikkommission der Justus-Liebig Universität Giessen nach mündlicher Aufklärung abgegeben.

#### 3.2 Material

##### 3.2.1 Geräte

ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City
TaqMan® Analyzer	Applied Biosystems, Foster City
Brutschrank	Heraeus , Hanau
CO <sub>2</sub> -Inkubator	New Brunswick Scientific, N.J., USA
Divac 2,4L Vakuumpumpe	Leybold, Köln
Dri-Block® Techne DB-2A	Techne AG, Jahnsdorf
Electrophoresis Powersupply E844	Consort nv, Turnhout, Belgium
Electrophoresis Powersupply EPS600	Pharmacia Biotech, Buckinghamshire, UK
Elektrophorese-Kammern	Werkstatt MZI, Gießen
Elektronische Mehrkanalpipette	Rainin, Mettler Toledo Intl. Inc., Gießen
EDP®-3 Plus	
Flüssigkeitsszintillationszähler Wallc 1409	Pharmacia, Freiburg
Fluoreszenz Mikroskop DM5500AB	Leica, Wetzlar
S/W Kamera DFC340FX	
Gefrierschrank -20° C	Robert Bosch GmbH, Gerlingen-Schillerhöhe
Gefrierschrank -70° C	Heraeus GmbH, Hanau
Gelkammer Invitrogen™ Horizon 58	Invitrogen, Darmstadt
Gelschlitten	Werkstatt MZI, Gießen

## Material und Methoden

---

Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P 10	Gilson Inc., Middletown, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P 20	Gilson Inc., Middletown, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P 200	Gilson Inc., Middletown, USA
Manuelle Pipette Gilson Pipetman® P 1000	Gilson Inc., Middletown, USA
Mikrowelle LG MS 197H	LG Electronics Inc., Seoul
Mobile Pipettierhilfe Pipetboy acu	IBS Integra Bioscience GmbH, Fernwald
Photometer PEQLAB Nanodrop 1000®	Peqlab Biotechnologie, Erlangen
Thermocycler T3000	Biometra GmbH, Göttingen
Tischzentrifuge 5415D	Eppendorf, Hamburg
Stratagene UV-Stratalinker 1800	Stratagene AG, La Jolla
UV-Kamera-System	Polaroid Ecommerce, Minnetonka, USA
UV-Transilluminator	Bachofer, Reutlingen
Vortex Schüttler	VWR international Darmstadt
Vortexer VFZ	Janke und Kunkel, Staufen
Vortexer VF 2	Janke und Kunkel, Staufen
Vortexer Vortex Genie® 2	Scientific Industries Inc., New York, USA
Waage Ohaus Navigator™	Ohaus Corp., New Jersey, USA
Wärmeplatte	LKB Bromma, Schweden
Wärmeschrank	Melag, Berlin
Wasserbad	Memmert, Schwalbach
Wasserbad WB1	Köttermann Laborgeräte GmbH, Medingen
Wippschüttler	Eppendorf AG, Hamburg
Zentrifuge Hettich® Mikro 200R	Hettich GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Hettich® Rotana 50	Hettich, GmbH & Co. KG, Tuttlingen
Zentrifuge Hettich® Rotana 96R	Hettich, GmbH & Co. KG, Tuttlingen

### 3.2.2 Bioinformatrische Programme, Datenbanken und Software

ABI PRISM® Data Collection Software 3100	Applied Biosystems, Foster City, USA
Blast, NCBI	Vergleich von Sequenzen gegen Datenbanken
Copy Caller™ Software	Applied Biosystems, Foster City, USA
ClustalW	Sequenzalignments
DNASar Version 8.0.2	Bearbeiten von Sequenzen, Sequenz- vergleich, Ermitteln von Schnittstellen
Ensembl, EBI	Gen Browser

## Material und Methoden

---

Fruittfly, NNSplice	Berechnung funktioneller Effekte von Aminosäureaustauschen
GraphPad Prism 4	Berechnung und Darstellung von Kinetiken, Graphiken, statistische Auswertung
HUGO Gene Nomenclature Committee	Nomenklatur humaner Gene
Mutationdiscovery	Primerauswahl
NCBI	Datenbankportal zur Literaturrecherche
Oligo 3.0	Primerauswahl
Polyphen	Berechnung funktioneller Effekte von Aminosäureaustauschen
PredictProtein	Vorhersage von TMDs, Phosphorylierungsstellen, N-Glykosylierungsstellen
Primer 3	Primerauswahl
SeqScape® v2.1	Sequenzierungsauswertung
SNP Datenbank	Suche von Single Nucleotide Polymorphisms
LAS AF 6000 mit 3D Deconvolution	Leica, Wetzlar

### 3.2.3 Verbrauchsmaterial

12,5 cm <sup>2</sup> Kulturschalen	Becton Dickinson Falcon, Le Pont De Caix, Frankreich
12-well Platten	greiner bio one, Frickenhausen
24-well Platten	greiner bio one, Frickenhausen
25 cm <sup>2</sup> Kulturschalen	Sarstedt, Nürnberg
6-well Platten	greiner bio one, Frickenhausen
75 cm <sup>2</sup> Kulturschalen	Sarstedt, Nürnberg
96-well ELISA-Platten	Nunc, Wiesbaden
Deckgläschen	Roth, Karlsruhe
MicroAmp Optical 96-well reaction plate	Applied Biosystems, Singapur
Mikrotiterplatte PP 96 well	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Nitrilhandschuhe	Roth, Karlsruhe
Objektträger	Roth, Karlsruhe
Parafilm M Verschlussfolie	Parafilm, Oshkosh, WI, USA
Pipettenspitzen (10µl, 200µl, 1000µl)	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen Filter-Tips PE (10µl, 20µl, 200µl, 1000µl)	Nerbe plus GmbH Winsen / Luhe
PonyVial H/I (Minivial)	Perkin Elmer, Waltham, MA, USA

## Material und Methoden

---

Reaktionsgefäße 0,2 ml	Greiner Bio-One GmbH, Frickenhausen
Reaktionsgefäße (1,5ml, 2ml, 15ml, 50ml)	Sarstedt, Nürnberg
Transferpipetten	Sarstedt, Nürnberg
Uvetten	Eppendorf, Hamburg
Zellkulturflaschen 75 cm <sup>2</sup> Falcon®	Roth, Karlsruhe

### 3.2.4 Molekularbiologisches Material

#### Primer und Sonden

Die Synthese aller Oligonukleotidprimer wurde von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt.

Mutations-analyse	Sequenz (5' – 3')	Schmelz-temperatur
1-F	TCTGGACGCCCGGATTCGCATA	60.67 °C
1-R	CGAGGGATGACGGTGCTTCTTC	60.67 °C
2-F	CAACAGAGCGACCCTCCATCTCAA	60.93 °C
2-R	GCCCTGTATCCTTGTTCAAGTCCC	60.93 °C
3a-F	AGGCAGAATTTGAGATACAAACCACAGGTA	60.12 °C
3a-R	CTTGATGACTTCTTTATTTCTCTGCTGGGT	60.12 °C
3b-F	CCTCTGTCTCCGTGGCTTTCCT	60.67 °C
3b-R	CTGGAGGAATGGACTTAAGCGGG	60.81 °C
4-F	ATTTATCTTTCAGAATTACCCGAGACCTGG	60.12 °C
4-R	AGAAAGACAGAAGAGAGAGGAATACAGTTC	60.12 °C
5-F	GGAGGTGGGTGACACAAATACCC	60.81 °C
5-R	CTTTGTTTGGAGGCTGGTGCAATGCT	61.14 °C
6a-F	GCAAACCAACAGTATTAGGATGTATTATCATTG AC	60.63 °C
6a-R	CACGCCATCTGCATGTCTTTACAAGTG	61.24 °C
6b-F	CTGGATGCAATTGACAGGACCCG	60.81 °C
6b-R	TGGAGAGAAGGCTCACTGCCTC	60.67 °C
6c-F	CTCCCTCAAGAATAGCTTCAGATCCTC	61.24 °C
6c-R	TTGCCCAGGCTGGAGTGCAATG	60.67 °C
7a-F	GAGCACCTGTGTGGTGTCTGTCT	60.81 °C
7a-R	GTGAGCCACAGCTTCCAGCCTTA	60.81 °C
7b-F	TGAGCCACCATGCCTGGCCAAA	60.67 °C
7b-R	AGAAGGCAAAGTGGGAGCAGGC	60.67 °C
7c-F	CAGTGAGTTATCGTGAGATCTGGTAGTTTA	60.12 °C
7c-R	GGATTTGGAGAGGAGTATACTTGAGAAACA	60.12 °C

## Material und Methoden

<b>Longrange PCR</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>	<b>Schmelz- temperatur</b>
4a-F-longrange	AACTGGGACCTTCTGGGAGAGC	64,0°C
6-R-longrange	CTCTTCCTCTGGGTGAGACACATC	64,4°C
<b>Sequenzierung der pcDNA</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>	<b>Schmelz- temperatur</b>
SLC19A3-Seq-F1	AAGAAGTCAAGCGTG	54°C
SLC19A3-Seq-R1	CACCATAGAGACCAGTAG	54°C
CMV-F	CGCAAATGGGCGGTAGGCGTG	65,7°C
BGH-R	TAGAAGGCACAGTCGAGG	56,0°C
<b>Expressions- nachweis SLC19A3 in Fibroblasten und Leukozyten</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>	<b>Schmelz- temperatur</b>
5-F-cDNA	GCAGTTAATCTGAATGTGGAACG	58,9°C
6-R-cDNA	TCTCTTCCTCTGGGTGAGAC	59,4°C
3b-F-cDNA	CCTCTGTCTCCGTGGCTTTTCCT	60,6°C
Gr-R-cDNA	GCTCCATAAACTAAAACTGGAATGCTGAC	64,0°C
P-F-cDNA	AGAGCAGAAACCCACATCAGAAAT	59,3°C
ABL-F	CGGCCAGTAGCATCTGACTTTG	60,6°C
ABL-R	CCTTGCCATTTTTGGTTTGG	60,6°C
<b>Klonierung in pcDNA5/FRT/V5- His TOPO-Vektor</b>	<b>Sequenz (5' – 3')</b>	<b>Schmelz- temperatur</b>
SLC19A3-F	AGTGAGCGATTTGGTGAACAGAC	60,6°C
SLC19A3-R	CACTGTTGCGTTTGTGCGATG	60,3°C
SLC19A3- ohneStop-R	GAGTTTGTTGACATGATGATATTACTC	59,3°C
SLC19A3-Skip- ohneStop-R1	AAAACTGCTATGGTTATAAGAAGGCATATAG	60,2°C
SLC19A3-Skip- ohneStop-R2	AAAACTGCTATGGTTATAAGAAGC	56,4°C

## Material und Methoden

Sequenzierung	Sequenz (5' – 3')	Schmelz- temperatur
<b>SLC19A3-Klon</b>		
SLC19A3-F	AGTGAGCGATTTGGTGAACAGAC	60,6°C
3b-F	CCTCTGTCTCCGTGGCTTTCCT	60,6°C
5-F-cDNA	GCAGTTAATCTGAATGTGGAACG	58,9°C
3a-R	CTTGATGACTTCTTTATTTCTCTGCTGGGT	60,1°C
Gr-R	GCTCCCATAAACTAAAACTGAATGCTGAC	64,0°C
SLC19A3-R	CACTGTTGCGTTTGTGCGATG	60,3°C

SLC19A3 Exon	Assay Lokalisation (NC_000002.11)	Assay ID
Exon 1	228582687	Hs 00597074_cn
Exon 2	228566834	Hs 03081083_cn
Exon 3	228563464	Hs 03054984_cn
Exon 4	228560703	Hs 01202302_cn
Exon 5	228552903	Hs 02860606_cn
Exon 6	228551814	Hs 00899590_cn
Exon 7	228550479	Hs 04560725_cn

### Enzyme

DyNAzyme™ II DNA Polymerase	Life Technologies, Darmstadt
Expand High Fidelity Polymerase	Roche, Mannheim
Fast Start High Fidelity Polymerase	Roche, Mannheim
HotStar Taq®	Qiagen, Hilden
Restriktionsenzym Pst1	Stratagene, USA
5' --CTGCA G--3'	
3' --G ACGTC--5'	

### Vektor, Bakterienstämme und Zelllinien

pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO®-Vektor	Invitrogen, Karlsruhe
TOP10 Bakterien	Invitrogen, Karlsruhe
GripTite 293 MSR Zellen	Invitrogen, Karlsruhe
MDCK-Zelllinie canine	Sigma-Aldrich Co., München

### 3.2.5 Chemische Substanzen

Agarose	Roth, Karlsruhe
AmnioMax™ c-100 Basal	Gibco, Karlsruhe

## Material und Methoden

---

AmnioMax™ c-100 Suppl.	Gibco, Karlsruhe
Aqua ad iniectabilia	B.Braun, Melsungen
BigDye® Buffer	Applied Biosystems, Foster City, USA
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit v3.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Bromphenolblau	Serva, Heidelberg
BSA	Roche, Mannheim
Chloroform	Merck KGaA, Darmstadt
DAPI	Roche, Mannheim
Desoxyribonukleotidtriphosphate	Roche, Mannheim
D-Glukose	Merck KGaA, Darmstadt
D-MEM	Gibco, Karlsruhe
DMSO	Roth, Karlsruhe
DyNAzyme™ II-Puffer	Life Technologies, Darmstadt
EDTA (Ethyldiamintetraacetat)	Sigma-Aldrich Co., München
EDTA Puffer 10x	Applied Biosystems, Foster City, USA
Ethanol absolute	Honeywell Seelze GmbH, Seelze
Ethidiumbromid Lösung 1%	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
GeneRuler DNA Ladder Mix	Fermentas, Waltham, USA
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Foster City, USA
HPLC-H2O LiChrosolv®	Merck KGaA, Darmstadt
LB-Ampicillin-Medium	Sigma-Aldrich Co., München
Lipofectamine 2000 Reagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Loading Dye®	Fermentas, Waltham, USA
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Sigma-Aldrich Co., München
Mineralöl	Sigma, Steinheim
Mowiol Eindeckelmedium	Sigma-Aldrich Co., München
Natriumacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Oligo(dT) <sub>12-18</sub> Primer	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMem	Life Technologies, Darmstadt
PeqLab Universal Agarose	PEQLAB GmbH, Erlangen
Paraformaldehyd, PFA	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Phenol	Merck KGaA, Darmstadt
POP6™ Polymer	Applied Biosystems, Foster City, USA
PCR-Oligonukleotidprimer	Eurofins MWG Operon, Ebersberg
Penicillin/Streptomycin	Gibco, Karlsruhe

## Material und Methoden

---

ProLong Gold	Invitrogen, Karlsruhe
Protease K	Sigma-Aldrich Co., München
Puffer 0	Stratgene, USA
RNaseOUT	Invitrogen, Karlsruhe
Saccharose	Merck KGaA, Darmstadt
SaltSolution	Invitrogen, Karlsruhe
Salzsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Co., München
SOC-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
TaqMan <sup>®</sup> Genotyping Master Mix	Applied Biosystems, Foster City, USA
TRIS (Trometamol)	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton X-100	Bio-Rad Laboratories GmbH, München
Trypsin/EDTA	Gibco, Karlsruhe
β-Mercaptoethanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
[ <sup>3</sup> H]Thiaminhydrochlorid	Bio Trend, Köln

### 3.2.6 Lösungen

Blockierlösung	2,8 ml 4% Serum 62,7 ml Puffer B
DAPI/Methanol	50 µl DAPI 250 ml Methanol
DNA-Extraktionspuffer, steril filtriert	40 ml 1M TRIS pH 8,0 40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0 20 ml 5 M NaCl Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
GripTite MSR-Medium	430 ml D-MEM 50 ml FKS 10% 5 ml MEM non-essential 0,1 mM 10 ml L-Glutamin 4 mM 5 ml Pen/Strep 1%
Folinlösung	1 ml Folin-Reagenz 3 ml H <sub>2</sub> O

## Material und Methoden

---

Kern-Extraktionspuffer, steril filtriert	109,5 g Saccharose 5,0 ml 1 M MgCl <sub>2</sub> 10,0 ml Triton X-100 10,0 ml 1 M TRIS pH 8,0 Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Lysepuffer	40,01 g NaOH 1 g SDS 0,1%
Lösung C	20 ml 4% Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> 0,8 ml 1% CuSO <sub>4</sub> 0,8 ml 2% K-Na-Tartrat
Stammlösung für Protein-Standardreihe	2 mg BSA (bovines Serum Albumin) 1 ml Lysepuffer
Transportpuffer	8,35 g NaCl 142,9 mM 0,35 g KCl 4,7 mM 0,296 g MgSO <sub>4</sub> x 7H <sub>2</sub> O 1,2 mM 4,777 g HEPES 20 mM 9 ml CaCl <sub>2</sub>
TRIS-EDTA	50 mM TRIS pH 8,0 10 mM EDTA
TAE-Puffer 50-fach	242 g TRIS pH 8,0 57,1 ml Acetat 100 ml EDTA 0,5 M Ad 1000 ml H <sub>2</sub> O
Puffer A	20 mM Glycin 110 ml 1 x PBS
Puffer B	700 mg BSA 70 ml Puffer A

### 3.2.7 Antikörper und Fluoreszenzfarbstoffe

Primärantikörper	Epitop	Spezies	Hersteller
Anti-V5	GKPIPPELLGLDST	Monoklonal, Maus	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-V5	GKPIPPELLGLDST	Monoklonal, Kaninchen	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Cadherin	AA 410-460	Polyklonal, Maus	Invitrogen, Karlsruhe
Sekundärantikörper			
Anti-Maus IgG-Alexa Fluor 488	Maus IgG	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Anti-Kaninchen IgG-Alexa Fluor 555	Kaninchen IgG	Polyklonal, Ziege	Invitrogen, Karlsruhe
Fluoreszenzfarbstoff			
DAPI	Färbung von Zellkernen		Roche, Mannheim

### 3.2.8 Kommerziell erhältliche Kits

BigDye® Cycle Sequencing Kit v3.1	Applied Biosystems, Foster City, USA
Expand Long Range dNTPack	Roche, Mannheim
QIAamp® DNA Blood Midi Kit	Qiagen, Hilden
Qiagen® Multiplex PCR Kit 1000	Qiagen, Hilden
Quiaquick® Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden
Quiaquick® PCR Purification Kit 250	Qiagen, Hilden
Qiagen Plasmid Midi Kit	Qiagen, Hilden
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen, Hilden
QIAamp® RNA Blood Mini Kit	Qiagen, Hilden
RNeasy® Plus Mini Kit	Qiagen, Hilden
SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit	Invitrogen, Karlsruhe

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 DNA-Extraktion aus EDTA-Blut

Die Extraktion der genomischen DNA erfolgte aus mit EDTA-versetzten Vollblut-Proben der Patienten, ihrer Eltern und Geschwister und, soweit möglich der Großeltern sowie mehrerer Kontrollpersonen. Die Blutproben wurden im Universitätsklinikum Giessen oder anderen Kliniken gewonnen und teilweise bereits bei -20 °C gelagert. Zur DNA-Extraktion wurden zwei unterschiedliche Methoden angewendet, zum einen die Phenol/Chloroform-Methode und zum anderen die Extraktion mittels QIAamp® DNA Blood Midi Kit (Qiagen).

#### Phenol/Chloroform-Methode

Die zu extrahierenden Nukleinsäuren und Proteine besitzen unterschiedliche Löslichkeiten. Aufgrund dessen bilden sie in diesem Extraktionsverfahren drei Phasen aus. Die untere organische Phase beinhaltet Fette, denaturierte Proteine sammeln sich in der Intermediärphase und eine obere wässrige Phase enthält DNA bzw. RNA.

In der vorgelegten Arbeit wurde die Phenol/Chloroform-Methode wie folgt angewendet:

- Zu 5 ml EDTA-Blut wurde 40 ml 0,9% Natriumchlorid (NaCl 0,9%) hinzugegeben.
- Zentrifugation bei 1.400 rpm und 4°C für 10 min (Trennung der korpuskulären Bestandteile vom Blutplasma). Der Überstand wurde verworfen.
- Zugabe von 30 ml des hyperosmolaren Kern-Extraktionspuffers (Lyse der Leukozyten)
- Nach Mischen und Inkubation der Suspension für 30 min auf Eis erfolgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 2500 rpm und 4°C.
- Verwerfen des Überstands
- Anschließend wurden nacheinander 500 µl DNA-Extraktionspuffer, 500 µl DNA-Extraktionspuffer mit 1% SDS und eine Spatelspitze Protease K hinzugegeben.
- Danach erfolgte eine Inkubation im 50°C warmen Wasserbad für 3 h.
- Nach Zugabe von 1 ml Phenol, wurden die Proben für 20 min geschüttelt und anschließend bei 13.000 rpm und 4°C 10 min zentrifugiert. Phenol löste die lipophilen Proteine, die sich als Intermediärphase ansammelten.
- Der Überstand wurde in 500 µl Chloroform überführt, um Phenolrückstände zu beseitigen. Danach wurde erneut 20 min geschüttelt und für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C zentrifugiert.

- Der Überstand wurde in 1 ml 3 M Natriumacetat pH 5/Ethanol 100% (1:19) übertragen, um die DNA zu präzipitieren.
- Nach mehrmaligem Invertieren wurden die Proben 30 min bei -20°C gelagert.
- Durch 20-minütiger Zentrifugation bei denselben Bedingungen, wie die vorherigen Zentrifugationsschritte, pelletierte die präzipitierte DNA. Der Überstand wurde verworfen und das DNA-Pellet mit 200 µl 70% Ethanol zur Beseitigung von Natriumacetat-Rückständen gewaschen.
- Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt für 10 min bei 13.000 rpm und 4°C.
- Der Überstand wurde verworfen und das getrocknete Pellet in 300 µl TRIS-EDTA gelöst. Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (TRIS) diente hier als Puffersubstanz der pH-Stabilisierung im schwach alkalischen Milieu. Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA) wirkte enzymhemmend durch Komplexbildung mit Metallionen, die dadurch ihre Funktion als Kofaktoren verschiedener Enzyme verloren.
- Für 8 h wurde die Probe im Wasserbad bei 50 °C gelagert.

### **DNA-Extraktion mittels QIAamp® DNA Blood Midi Kit**

Die Extraktion von DNA aus EDTA-Blut mit Hilfe des QIAamp® DNA Blood Midi Kit erfolgte nach Angaben des Herstellers. Zu Beginn wurden 2 ml EDTA-Blut mit 200 µl QIAGEN Protease und 2,4 ml Buffer AL gemischt und für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert, um Proteine zu degradieren und die Blutzellen zu lysieren. Das Lysat wurde auf eine Silikasäule aufgetragen, an welches die DNA gebunden wurde. Nach mehrmaligem Waschen der DNA mit verschiedenen Puffern wurde die DNA mit 300 µl Buffer AE eluiert.

Soweit keine abweichenden Angaben vorliegen, wurden sämtliche DNA-Proben auf eine Konzentration von 10 ng/µl verdünnt. Die Verdünnung erfolgte für die PCR mit 1x TE und für die Kopienzahlvariations-Untersuchung mit HPLC-H<sub>2</sub>O.

### **3.3.2 Photometrische Bestimmung der DNA-/RNA-Konzentration**

Die Grundlage der photometrischen Konzentrationsmessung basiert auf dem Zusammenhang der Absorption bei 260 nm, dem Verdünnungsfaktor sowie dem Nukleinsäure-spezifischen Multiplikationsfaktor (MF). Somit ergibt sich folgende Formel zur Konzentrationsberechnung:

$$\text{Nukleinsäurekonzentration } (\mu\text{g/ml}) = A_{260\text{nm}} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times \text{MF}$$

$$MF_{dsDNA} = 50 \mu\text{g/ml}; MF_{RNA} = 40 \mu\text{g/ml}$$

In der vorliegenden Arbeit wurden Nukleinsäuren mit Hilfe des NanoDrop® 1000 Spektrophotometer quantitativ bestimmt. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte bei einer Wellenlänge von 260 nm, da einzel- sowie doppelsträngige Nukleinsäuren hier ihr Absorptionsmaximum besitzen. Als Leerprobe wurde der Lösungspuffer der DNA bzw. RNA eingesetzt. Für eine Messung genügte bereits der Einsatz von 1,5 µl der unverdünnten DNA-/RNA-Probe. Alle Messungen wurden als Zweifachbestimmungen durchgeführt und daraus der Mittelwert berechnet. Die Reinheit der DNA bzw. RNA wurde durch die Bestimmung des Absorptionsquotienten  $A_{260}/A_{280}$  bestimmt. Die Reinheitsindices aller DNA-Proben lagen zwischen den empfohlenen Werten von 1,7 - 2,0 und aller RNA-Proben zwischen 1,9 - 2,1.

### 3.3.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Auftrennung und Identifizierung von DNA-Amplifikaten erfolgte mit dem üblichen Verfahren der Agarose-Gelelektrophorese. Für DNA-Moleküle der Größe 50 – 800 bp wurde ein 2%iges Agarosegel und für DNA-Moleküle mit 800 – 9000 bp ein 1%iges Agarosegel verwendet. Hierzu wurden 1 g bzw. 2 g Agarose durch Kochen in 100 ml 1xTAE gelöst und in Gelschlitten gegossen. Der Gelschlitten mit dem Gel wurde in die mit dem Laufpuffer 1xTAE gefüllte Elektrophoresekammer gelegt. Die mit 6x Ladepuffer (LoadingDye®) versetzten Proben, Negativ-Kontrollen und der Größenstandard GeneRuler DNA Ladder Mix wurden in die einzelnen Taschen des Gels aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte unter 150 V und einer Stromstärke von 400 mA über eine Dauer von 45 Minuten. Im Rahmen der Long Range PCR und der Anfertigung eines präparativen Gels zur späteren cDNA-Klonierung existierten abweichende Laufzeiten von bis zu zwei Stunden. Zur optischen Darstellung und Dokumentation wurde das Gel in Ethidiumbromid gefärbt und nach zehn minütiger Wässerung im UV-Transilluminator fotografiert.

### 3.3.4 Aufreinigung von PCR-Amplifikaten

Zur Aufreinigung von PCR-Amplifikaten kam das QIAquick® PCR Purification Kit von Qiagen nach Angaben des Herstellerprotokolls zur Anwendung. Das PCR-Produkt wurde hierdurch von Reaktions-Überresten, wie Oligonukleotide, gereinigt. Im ersten Schritt wurde das PCR-Produkt in Buffer PB in der Silikamembran eines Säulensystems gebunden, um anschließend gewaschen zu werden. Die aufgereinigten PCR-Amplifikate wurden durch die Zugabe von 25 µl Elutionspuffer (Buffer EB) eluiert.

### 3.3.5 Elution von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach einem gelelektrophoretischen Lauf wurde die mit Ethidiumbromid angefärbte DNA unter UV-Licht mit einem Skalpell ausgeschnitten und anschließend mit Hilfe des QIAquick® Gel Extraction Kit nach Herstellerangaben aufgereinigt. Dadurch konnten unerwünschte PCR-Produkte sowie PCR-Reagenzien entfernt werden. Die aufgereinigte DNA wurde mittels Agarose-Gelelektrophorese überprüft.

### 3.3.6 Restriktionsenzymatische Spaltung von Plasmid-DNA

Die Orientierungskontrolle der klonierten SLC19A3-Konstrukte in den pcDNA5/FRT/V5-His TOPO Vektor erfolgte über Restriktion der Plasmid-DNA (pDNA) mit Hilfe der Restriktionsendonuklease Pst1 nach den Angaben des Enzymherstellers Fermentas. Für den Verdau von pDNA in einem 20 µl Reaktionsansatz wurden 0,5 µl des Restriktionsenzym Pst1 mit 2 µl Buffer 0, 0,5 µg pDNA, aufgefüllt auf 20 µl mit ddH<sub>2</sub>O, für 1 h bei 37°C inkubiert. Die Analyse der geschnittenen pDNA erfolgte auf einem Agarosegel.

### 3.3.7 Aufreinigung von pDNA im Mini-Maßstab

Zur Aufreinigung von pDNA im Mini-Maßstab wurde das QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) verwendet. Zunächst wurden 4 ml LB-Ampicillin-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für 16 h bei 37°C und 225 rpm vermehrt. Nach Zentrifugation (13000 rpm, 2 min) von 2 ml der Bakteriensuspension wurde der Überstand verworfen. Es folgte die Resuspension des Bakterienpellets in 250 µl Puffer P1. Danach wurden 250 µl Puffer P2 und 350 µl Puffer N3 hinzugegeben. Zum Mischen wurde das Reaktionsgefäß 4 – 6 mal invertiert. Anschließend wurde die Suspension 10 min bei 13000 rpm zentrifugiert und der Überstand in eine QIAprep Säule überführt und 60 sek zentrifugiert. Es erfolgten zwei Waschschrte mit 500 µl Puffer PB und 750 µl Puffer PE mit jeweils einer Zentrifugation von 60 sek bei 13000 rpm. Um verbliebene Reste des Waschpuffers zu beseitigen, folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt. Die pcDNA wurde mit 50 µl Puffer EB durch Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Eine dauerhafte Lagerung der pDNA bei -20°C war möglich.

### 3.3.8 Aufreinigung von pDNA im Midi-Maßstab

Zur Aufreinigung von Plasmid-DNA im Midi-Maßstab wurde das Qiagen Plasmid Midi Kit (Qiagen) verwendet. Zunächst wurden 4 ml LB-Ampicillin-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für 8 h bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. 50 µl dieser Vorkultur wurden in 50 ml LB-Ampicillin-Medium überführt und für 16 h bei 37°C und

225 rpm inkubiert. In einem 50 ml Reaktionsgefäß erfolgte zunächst die Pelletierung der Bakterien bei 3500 rpm und 4°C für 10 min. Das Bakterienpellet wurde anschließend in 6 ml Puffer P1 resuspendiert. Nach Zugabe von 6 ml Puffer P2 und Mischen durch Invertieren des Reaktionsgefäßes erfolgte eine Inkubation für 5 min bei 22°C. Die Suspension wurde mit 6 ml gekühltem Puffer P3 aufgefüllt, gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Bei 4°C wurde die Mischung für 30 min bei 3500 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde gefiltert und das Filtrat auf eine Qiagen-tip 100 Säule mit 4 ml Puffer QBT übertragen. Anschließend folgten zwei Waschschriffe mit je 10 ml Puffer QC. Die Elution der gebundenen Plasmid-DNA erfolgte mit 5 ml Puffer QF durch Zentrifugation in ein neues Reaktionsgefäß. Danach wurde die pDNA mittels 3,5 ml Isopropanol präzipitiert (13000 rpm, 30 min, 4°C). Der Überstand wurde abgenommen und das Pellet mit 2 ml 70% Ethanol gewaschen (13000 rpm, 10 min, 22°C). Wiederum wurde der Überstand vorsichtig verworfen und das Pellet für 5 – 10 min getrocknet. Abschließend folgte die Lösung des Pellets in 200 µl ddH<sub>2</sub>O und die Konzentrationsbestimmung.

### **3.4 Methoden zur Isolierung und Aufarbeitung von RNA**

In der vorgelegten Arbeit wurde RNA aus Patienten- und Kontroll-Fibroblasten, sowie aus Patienten- und Kontroll-EDTA-Blut isoliert und in cDNA umgeschrieben. Dies diente dazu, die in genomischer Patienten-DNA gefundenen Mutationen auf mRNA-Ebene zu verifizieren und zu klonieren.

#### **3.4.1 RNA-Isolierung aus Fibroblasten**

Die Isolation der RNA wurde nach Angaben des Herstellers mit dem RNeasy® Plus Mini Kit von Qiagen aus Fibroblasten durchgeführt. Dazu wurde zuerst das Medium der bei 37°C kultivierten Fibroblasten abgenommen und die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen. Nach Zentrifugation bei 300 rpm für 5 min konnte der Überstand vorsichtig abgenommen werden. Die Zellen wurden in 600 µl Lyse-Puffer (RLT-Puffer mit 10% β-Mercaptoethanol) lysiert und das Lysat auf die mitgelieferte Silikasäule aufgetragen und mit unterschiedlichen Puffern gewaschen. Im letzten Schritt wurde die RNA mit RNase freiem Wasser eluiert. Reinheit und Konzentration der gewonnenen RNA wurden mittels Photometrie bestimmt. Die RNA wurde direkt zur cDNA-Synthese eingesetzt.

#### **3.4.2 Leukozyten-Isolation**

800 µl EDTA-Blut wurden mit 4 ml Erythrozyten-Lysis-Buffer (EL-Buffer) des QIAamp® RNA Blood Mini Kits gemischt und 15 min auf Eis inkubiert. Nach Lyse der

Erythrozyten erfolgte die Zentrifugation der Proben für 10 min bei 1620 rpm und 4°C. Der Überstand wurde verworfen. Das entstandene Zell-Pellet wurde mit 1,6 ml EL-Buffer auf einem Vortexer vollständig gelöst. Nach erneuter zehn minütiger Lyse auf Eis erfolgte eine weitere Zentrifugation bei 1620 rpm und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde erneut verworfen. Das Pellet wurde in 600 µl RLT-Buffer mit 10% Mercaptoethanol durch auf- und abpipettieren gelöst, die Zellen homogenisiert und bestehende Proteinverbindungen aufgelöst.

### 3.4.3 RNA-Isolierung aus Leukozyten-Lysat

Die RNA-Isolation aus Leukozyten-Lysat erfolgte weiterhin mit dem QIAamp® RNA Blood Mini Kit nach Angaben des Herstellers. Das Leukozyten-Lysat wurde auf ein Säulensystem aufgetragen und mit unterschiedlichen Puffern gewaschen. Als letzten Schritt wurde die RNA mit 50 µl RNase freiem Wasser aus der Säule eluiert. Um einen Abbau durch RNAsen zu verhindern, wurde die RNA im Anschluss zur cDNA-Synthese verwendet.

### 3.4.4 cDNA-Synthese

Die Synthese von cDNA aus RNA erfolgte mit dem SuperScript™ II Reverse Transcriptase Kit von Invitrogen. 1 µg RNA wurde mit HPLC-Wasser auf ein Gesamtvolumen von 10 µl aufgefüllt. Dann wurden 1 µl Oligo(dT)<sub>12-18</sub> Primer (Invitrogen) und 1 µl dNTP Mix (10 mM) hinzugefügt und bei 65°C im Thermocycler erhitzt und anschließend für 1 min bei 4°C abgekühlt. Alle weiteren Versuchsschritte erfolgten auf Eis. Es wurden nun nacheinander 4 µl 5X First-Strand Buffer, 2 µl DTT (0,1 M), 1 µl RNaseOUT (40 Units/µl) hinzugegeben. Die Zugabe des rekombinanten Ribonuklease-Inhibitors RNaseOUT schützt die RNA vor dem Verdau durch Ribonukleasen. Nach Inkubation bei 25°C für 2 min wurde 1 µl der RNA-abhängigen DNA-Polymerase SuperScript™ II Reverse Transcriptase (200 Units) hinzu pipettiert und vorsichtig durch Auf- und Abpipettieren durchmischt. Der Reaktionsansatz wurde für 50 min bei 42°C inkubiert. Durch anschließendes Erhitzen auf 70°C für 15 min wurde die Reaktion inaktiviert. 2,5 µl der synthetisierten cDNA wurden im Anschluss für die PCR verwendet. cDNA kann aufgrund der hohen Stabilität auch langfristig bei -20°C aufbewahrt werden.

## 3.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ermöglicht eine exponentielle Vervielfältigung spezifischer DNA-Abschnitte. Diese Amplifikation basiert auf drei aufeinanderfolgenden

Reaktionsschritten, die sich durch verschiedene Temperaturstufen unterscheiden. In dieser Arbeit wurde die PCR zur Amplifikation kompletter Exons von genomischer DNA sowie des kompletten Leserahmens von cDNA genutzt.

Hier werden alle Zielparameter, Nebenzielparameter und Einflussgrößen aufgeführt und definiert. Dazu gehört auch die Angaben der Einheit und des Referenzbereiches.

### 3.5.1 PCR-Methodik im Rahmen der Sequenzanalyse des SLC19A3-Gens

#### Primerauswahl

In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Oligonukleotidprimer (kurz: Primer) entweder mithilfe des Programms [mutationdiscovery.com](http://mutationdiscovery.com) oder des Programms Primer3, soweit möglich, nach den allgemeinen Regeln zur Primerauswahl entworfen. Bei der Primerauswahl sollten folgende Rahmenbedingungen eingehalten werden:

- Die Primer sollten zwischen 22 und 35 Nukleotide lang sein.
- Der GC-Gehalt der Primer sollte im Bereich von 45% bis 65% liegen.
- Optimalerweise sollte das 3`-Ende des Primers mit zwei G's oder C's enden.
- Dimerbildungen sollten vermieden werden, indem 3`-Enden der Primer nicht untereinander und nicht mit sich selbst komplementär sind.

Die Primer-Synthese wurde von der Firma MWG (Ebersberg) durchgeführt. Gelöst wurden die Primer in Tris-EDTA. Jeder Primer wurde nach der Nummer des Exons benannt und mit einem Buchstaben zur Kennzeichnung der Ausrichtung versehen (f = forward = Hinstrang; r = reverse = Gegenstrang). Lange Exons machten es nötig mehrere Primerpaare zu erstellen, um eine Amplifikation des kompletten Exons zu gewährleisten. Die eingesetzten Primer mit Sequenz und Schmelztemperatur sind in tabellarischer Form im Anhang zu finden.

#### PCR-Reaktion

Obwohl nicht mehrere Exons gleichzeitig amplifiziert wurden, kam das Qiagen Multiplex Kit® zum Einsatz. Dieses Kit besteht aus HotStarTaq® DNA-Polymerase, Desoxyribonukleotidtriphosphate (dNTPs), einen patentierten Puffer (Q-Solution) und Magnesiumchlorid (MgCl<sub>2</sub>). Gemeinsam mit den jeweiligen Primerpaaren der Exons und der DNA stellten sie den PCR-Reaktionsansatz dar.

Es wurden folgende Pipettierschemata und Reaktionsbedingungen angewendet:

**Pipettierschema Exon-PCR *SLC19A3***

PCR-Ansatz pro Probe	5,0 µl HPLC-H <sub>2</sub> O
	12,5 µl Multiplex Mix
	2,5 µl Q-Solution
	2,5 µl Primersatz (f und r) (2 µM)
	2,5 µl gDNA (10 ng/µl)
Endvolumen	25 µl

**PCR-Bedingungen *SLC19A3***

15 min	95°C	Denaturierung
35 Zyklen		
30 sek	94°C	Denaturierung
1 min 30 sek	63°C	Primeranlagerung
45 sek	72°C	Elongation
10 min	72°C	Endelongation
∞	4°C	Kühlung

**3.5.2 Longrange-PCR**

Zur genauen Bruchpunkt-Charakterisierung einer identifizierten Mutation war die PCR-Amplifikation eines längeren DNA-Fragments notwendig. Dazu wurde die speziell entwickelte Longrange-PCR Methode verwendet, die u.a. durch speziell optimierte Enzymmischungen gekennzeichnet ist.

In der vorliegenden Arbeit wurde das Expand Long Range dNTPack von Roche verwendet, das eine thermostabile Taq DNA Polymerase und eine thermostabile DNA Polymerase mit 3'→5'-Korrekturlesefunktion beinhaltet. Zusätzlich zum 5x konzentrierten Buffer mit 12,5 mM MgCl<sub>2</sub>, einem PCR Nukleotid-Mix (10 mM) wird für diese PCR DMSO, das die Ausbildung von Sekundärstrukturen der Template-DNA verhindert und damit besonders die Amplifikation von GC-reicher Template-DNA erleichtert (Hung et al 1990). Die verwendete genomische DNA wurde zuvor mittels Phenol/Chloroform-Extraktion aus EDTA-Blut gewonnen und die Konzentration auf 55 ng/µl eingestellt. Die Reaktionsansätze setzten sich wie folgt zusammen:

Pipettierschema Long Range PCR	
PCR-Ansatz pro Probe	25,3 µl HPLC-H <sub>2</sub> O
	10,0 µl 5x Buffer mit MgCl <sub>2</sub>
	2,5 µl dNTP Mix
	1,5 µl DMSO
	0,7 µl Enzym Mix
	5,0 µl Primersatz (f und r) (2 µM)
	5,0 µl gDNA
Endvolumen	50 µl

Ein Durchmischen des Reaktionsansatzes erfolgte ausschließlich durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren, um die Integrität der Template-DNA zu gewährleisten. Um einen Abbau der Primer und der DNA durch das Enzymgemisch zu verhindern, wurde der Reaktionsansatz auf Eis zusammen pipettiert und im Anschluss die Reaktion im Thermocycler direkt gestartet. Die Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgte nach folgendem Programm:

PCR-Bedingungen Long Range PCR		
2 min	94 °C	Denaturierung
10 Zyklen		
10 sek	94 °C	Denaturierung
15 sek	62 °C	Primeranlagerung
8 min	68 °C	Elongation
20 Zyklen (+20 sek/Zyklus)		
10 sek	94 °C	Denaturierung
15 sek	62 °C	Primeranlagerung
8 min	68 °C	Elongation
7 min	68 °C	Endelongation
∞	8 °C	Kühlung

### 3.5.3 Expressionsnachweis von *SLC19A3* in Fibroblasten und Leukozyten

Die Expressionsanalyse von *SLC19A3* in Fibroblasten und Leukozyten erfolgte aus cDNA. Exon-übergreifende Primer gewährleisteten die Unterscheidung des zu amplifizierenden cDNA-Bereichs von eventuell fälschlicherweise vervielfältigten DNA-

Abschnitten aufgrund der Länge des amplifizierten Bereiches. Als Positiv-Kontrolle wurden Primer im Gen der Tyrosinkinase *ABL1* (Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1) gewählt. Das ABL-Gen ist ein Housekeeping-Gen, das in allen Zellen exprimiert wird, um grundlegende zelluläre Funktionen aufrecht zu erhalten. Die PCR erfolgte mittels Qiagen® Multiplex PCR Kit 1000 nach folgenden Pipettierschemata und Reaktionsbedingungen:

Pipettierschema Expressionsnachweis <i>SLC19A3</i> und Positiv-Kontrolle <i>ABL</i> -Gen		
PCR-Ansatz Probe	pro	9,0 µl HPLC-H <sub>2</sub> O
		12,5 µl Multiplex Mix
		2,5 µl Primersatz (f und r)(2 µM)
		1,0 µl cDNA
Endvolumen		25 µl

PCR-Bedingungen Expressionsnachweis <i>SLC19A3</i> und Positiv-Kontrolle <i>ABL</i> -Gen		
15 min	95°C	Denaturierung
35 Zyklen ( <i>SLC19A3</i> )		
44 Zyklen ( <i>ABL</i> )		
30 sek	94°C	Denaturierung
1 min 30 sek ( <i>SLC19A3</i> )	62°C ( <i>SLC19A3</i> )	Primeranlagerung
45 sek ( <i>ABL</i> )	64°C ( <i>ABL</i> )	
45 sek	72°C	Elongation
10 min	72°C	Endelongation
∞	4°C	Kühlung

### 3.5.4 PCR-Methode zur Klonierung von cDNA

Die Klonierungsprimer wurden anhand der mRNA-Sequenz des zu klonierenden *SLC19A3*-Transporters ausgewählt. Der Primer in Vorwärtsausrichtung beinhaltet das Startcodon. Zudem wurden zwei unterschiedliche Rückwärts-Primer gewählt. Einer umfasste das Stoppcodon, der andere endete direkt vor dem Stoppcodon (siehe Kapitel 3.1.4). Das amplifizierte *SLC19A3*-Konstrukt ohne Stoppcodon wurde anschließend in einen Vektor ligiert, welcher *in frame* ein V5-His-Tag beinhaltet und nach transienter Transfektion und Translation eine einfache Detektion des

## Material und Methoden

rekombinanten Proteins mittels indirekter Immunfluoreszenz ermöglichte. Die PCR zur Amplifikation des *SLC19A3*-Konstrukts wurde mittels Fast Start High Fidelity PCR System (Roche) durchgeführt. Dieses Polymerasegemisch gewährleistete zum einen eine hohe Lesegenauigkeit durch die Pfu DNA-Polymerase und zum anderen die Möglichkeit zur TA-Klonierung durch die enthaltene Taq DNA-Polymerase. Folgende Reaktionsansätze und Reaktionsbedingungen wurden eingehalten:

<b>Pipettierschema PCR Klonierung <i>SLC19A3</i></b>	
PCR-Ansatz pro Probe	37,5 µl HPLC-H <sub>2</sub> O
	0,5 µl Fast Start High Fidelity Polymerase
	5,0 µl Buffer Fast Start High Fidelity (FSHF)
	1,0 µl dNTPs
	2,0 µl Primer F (10µM)
	2,0 µl Primer R (10µM)
	2,0 µl cDNA
Endvolumen	50 µl

<b>PCR-Bedingungen Klonierung <i>SLC19A3</i></b>		
2 min	95°C	Denaturierung
35 Zyklen:		
30 sek	95°C	Denaturierung
30 sek	58°C	Primeranlagerung
1 min 30 sek	72°C	Elongation
7 min	72°C	Endelongation
∞	4°C	Kühlung

Die Amplifikation erfolgte aus cDNA eines Wildtyp-Patienten und des BBGD-Patienten sowohl mit als auch ohne Stoppcodon.

Als Negativ-Kontrolle wurde HPLC-H<sub>2</sub>O anstelle der Template DNA eingesetzt. Die PCR-Produkte wurden über ein Agarosegel aufgereinigt und in die TOPO-Klonierung eingesetzt (siehe Kapitel 3.4.5).

### 3.5.5 DNA-Klonierung

Die Klonierung in der Molekularbiologie dient der identischen Vervielfältigung von DNA. Dazu erfolgt die Integration eines gewünschten DNA-Fragments in einen Vektor (Plasmid) und deren Einbringung in eine Bakterienzelle. In dieser Arbeit wurde die durch PCR erhaltenen *SLC19A3*-Sequenzen einer Kontrollperson (Wildtyp-Sequenz) und der Patienten (Mutanten-Sequenz) in den Epitop-markierten pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO®-TA-Vektor (Invitrogen) kloniert.

#### TOPO-Klonierung

Zunächst wurde mit Hilfe der Fast High Fidelity Polymerase (Roche) das gewünschte PCR-Produkt amplifiziert (siehe Kapitel 3.4.4). Für die TA-Klonierung in linearisierte TOPO-Vektoren mit einem 3'-A-Überhang müssen die zu klonierenden PCR-Produkte einen 3'-A-Überhang besitzen. Bei der Gelaufreinigung der PCR-Produkte kann es leicht zu einem Verlust von A-Überhängen kommen. Daher wurden diese mit Hilfe der thermostabilen DyNAzyme™ II DNA Polymerase (Invitrogen) erneut angefügt. Dazu wurden 2 µl DyNAzyme™ II-Puffer, 0,4 µl dATP (10µM), 0,5 µl DyNAzyme™ II DNA Polymerase, 10 µl aufgereinigtes PCR-Produkt und 7,2 µl ddH<sub>2</sub>O gemischt und bei 72°C für 30 min inkubiert. Nun folgte die Ligation von Vektor und PCR-Produkt über die komplementären Enden. Hierzu folgte das Mischen von 2 µl des PCR-Produkts mit 3'-A-Überhang und 0,5 µl SaltSolution (Invitrogen) sowie 0,5 µl pcDNA5/FRT/V5-His-TOPO®-Vektor mit anschließender Inkubation für 30 min bei Raumtemperatur.

#### Transformation von chemisch-kompetenten TOP10-Zellen

Für die Transformation der zirkulären Plasmide wurden chemisch kompetente TOP10 Bakterien (Invitrogen) auf Eis aufgetaut und mit 2 µl des TOPO-Klonierungsansatzes vorsichtig gemischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der Hitzeschock für 30 sek bei 42°C und zweiminütiger Kühlung der Probe auf Eis. Nach Zugabe von 250 µl SOC-Medium (Invitrogen) (37°C) wurde für 60 min bei 37°C und 225 rpm inkubiert. 100 µl und 200 µl des Bakterien-Ansatzes wurden auf 37°C vorgewärmte LB-Ampicillin-Agarplatten ausplattiert und bei 37°C 16 h vermehrt, wobei sich durch das Ampicillin-Resistenz-Gen des Plasmids nur positive Transformanten vermehrten. In den Bakterien enthaltene Plasmide wurden mit Hilfe des QIAprep® Spin Miniprep Kit (Qiagen) aufgereinigt und mittels Restriktionsverdau sowie Sequenzierung auf ihre Korrektheit überprüft.

### 3.6 Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen

Während dieser Arbeit diente die DNA-Sequenzierung der Mutationsanalyse und der Analytik im Rahmen der DNA-Klonierung.

#### 3.6.1 DNA-Sequenzierung

Alle Sequenzanalysen wurden mit Hilfe des ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) basierend auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger durchgeführt. Diese Sequenzier-Methode beruht auf dem Prinzip der PCR, wobei nur ein geeigneter Primer zur linearen DNA-Amplifikation und zusätzlich zu unmarkierten dNTPs gleichzeitig vier mit unterschiedlichen Fluoreszenz-Farbstoffen-gekoppelte Didesoxynukleosid-triphosphate (ddNTPs) eingesetzt werden (Sanger et al. 1977). ddNTPs fehlt die 3`-Hydroxygruppe zur Verknüpfung mit der 5`-Phosphatgruppe des nächsten Nukleotids. Aufgrund dessen bricht die DNA-Verlängerung durch die Taq-Polymerase nach Einbau eines ddNTPs in den neusynthetisierten Strang ab. Dies geschieht statistisch gesehen nach jeder Base, sodass DNA-Fragmente unterschiedlicher Längen entstehen, die kapillarelektrophoretisch über eine Polymermatrix (POP6®) aufgetrennt und durch zwei Argon-Laserstrahlen zur Fluoreszenz angeregt werden. Die vier unterschiedlichen fluoreszierenden Farben der ddNTPs am Ende eines jeden DNA-Fragments werden detektiert und als Elektropherogramm dargestellt.

Für die Sequenzierreaktion wurde jede Probe des aufgereinigten PCR-Amplifikats oder Plasmids mit den entsprechenden Sequenzier-Primern und den beiden Bestandteilen, BigDye® Buffer und BigDye® Terminator, des BigDye® Cycle Sequencing Kit v3.1 zusammengefügt. Die Reaktionsansätze sowie das Sequenzierprogramm setzten sich im Detail wie folgt zusammen:

Reaktionsansatz		
Reaktionsansatz Probe	pro	12,5 µl PCR-Produkt (150 ng) / Plasmid-DNA (1 µg) und HPLC-H <sub>2</sub> O
		4,0 µl BigDye® Buffer
		2,0 µl BigDye® Terminator
		1,5 µl Primer F oder R (1,6 µM)
Endvolumen		20 µl

### Reaktionsbedingungen

24 Zyklen:

10 sek	96°C	Denaturierung
5 sek	55°C	Primeranlagerung
4 min	60°C	Elongation
∞	4°C	Kühlung

Zur Fällung der Sequenzreaktionsprodukte wurden 50 µl 100% Ethanol und 2 µl 3M Natriumacetat beigefügt. Diese Lösung wurde auf eine Zentrifugalplatte überführt und für 20 min bei 4000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Zum Aufreinigen des Sequenzansatzes wurden anschließend 150 µl 70% Ethanol hinzupipettiert und 10 min bei 4000 rpm erneut zentrifugiert und anschließend der Überstand verworfen. Zur Resuspension wurde jedes Well mit 20 µl HiDi™ Formamid aufgefüllt, vorsichtig auf dem Vortexer gemischt und auf eine Sequenzerplatte übertragen.

### 3.6.2 Sequenzanalyse

Die erhaltenen Sequenzdaten wurden mit Hilfe des Programmes ABI PRISM® Data Collection Software zusammengefasst und graphisch dargestellt. Zur Sequenzanalyse wurden die Daten in das Computerprogramm SeqScape®2.1 importiert. Ein Vorteil dieses Programmes lag darin, dass mehrere Sequenzen parallel mit den Referenzsequenzen NT\_005403.17 und NM\_025243.3 verglichen werden konnten.

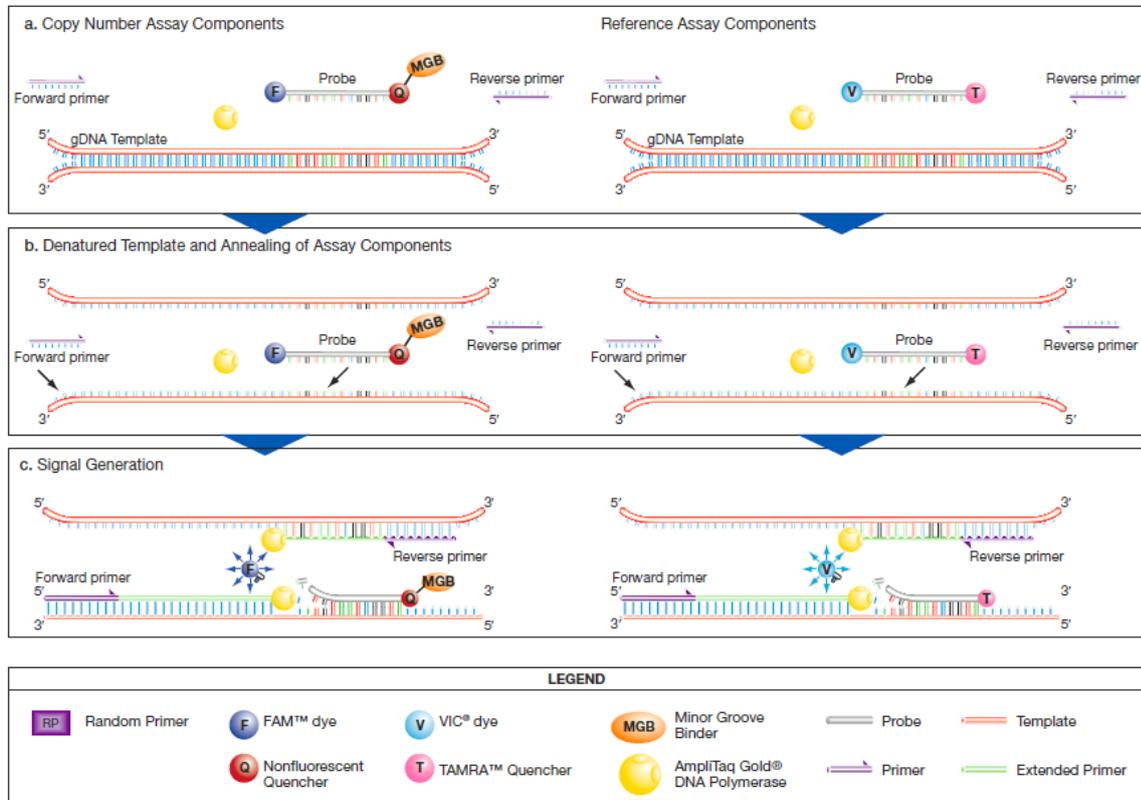
## 3.7 TaqMan® Copy Number Untersuchung

Kopienzahlvariationen (Copy number variation; kurz CNV) beschreiben die Abweichung der Kopienanzahl eines bestimmten DNA-Abschnitts innerhalb eines Genoms.

### 3.7.1 Versuchsprinzip

Die TaqMan® Copy Number Quantifizierungsreaktion basiert auf dem Prinzip zweier simultan ablaufender Real-Time PCRs, bei denen mit jedem amplifizierten DNA-Strang ein Fluoreszenzfarbstoff abgespalten wird und somit die Fluoreszenz proportional zum entstehenden DNA-Produkt steigt. In einer Reaktion amplifiziert der TaqMan® Copy Number Assay die zu untersuchende genomische Sequenz, während der TaqMan® Reference Assay eine spezifische Kontroll-Sequenz detektiert und vervielfältigt, die immer in zwei Kopien eines diploiden Genoms vorliegt (Heid et al. 1996; Mayo et al.

2010). Beide Reaktionen können durch die Abspaltung eines spezifischen Fluoreszenzfarbstoffes (FAM für SLC19A3, VIC für Reference Assay) unterschieden werden.



**Abbildung 4: Prinzip der TaqMan® Copy Number Quantifizierungsreaktion**

Während der Denaturierung erfolgt die Trennung der DNA-Doppelstränge. In der nächsten Phase lagern sich Primer und Sonde an die jeweilige Zielsequenz an. Zu diesem Zeitpunkt wird die Fluoreszenz der Farbstoffe FAM<sup>TM</sup> und VIC<sup>TM</sup> an den Sonden durch die räumliche Nähe zu dem jeweiligen Quencher und durch die strahlungsfreie Energieübertragung unterdrückt. Erst mit der Verlängerung der Primer gelangt die AmpliTaq Gold<sup>®</sup> DNA-Polymerase an das Fluoreszenz-markierte 5'-Ende der angelagerten Sonde und baut sie durch ihre 5'→3'-Exonukleaseaktivität ab. Die Farbstoffe FAM<sup>TM</sup> und VIC<sup>TM</sup> entfernen sich von ihrem Quencher und das Fluoreszenzsignal kann in Echtzeit detektiert werden. (Handbuch TaqMan® Copy Number Assays - lifetechnologies)

### 3.7.2 Versuchsdurchführung

Zur quantitativen Untersuchung des SLC19A3-Gens kam jeweils ein TaqMan® Copy Number Assay für jedes einzelne Exon zum Einsatz (siehe Kapitel 3.1.4). Als endogene Kontrolle wurde das H1RNA-Gen (TaqMan® Copy Number Reference Assay RNase P) gewählt. Diese Assays, mit sequenzspezifischen Primern und Sonden mit 5'-FAM<sup>TM</sup> (SLC19A3)- bzw. VIC<sup>TM</sup> (RNase P)-Markierung und MGB-/ TAMRA<sup>TM</sup>-

Quencher am 3'-Ende, sowie TaqMan® Genotyping Master Mix mit AmpliTaq Gold® DNA Polymerase und dNTPs waren vorgefertigt erhältlich (Applied Biosystems). Die Durchführung erfolgte nach Angaben des Herstellers unter Verwendung des folgenden Reaktionsmixes in einer 96-well Platte sowie unter den angegebenen Reaktionsbedingungen in einem TaqMan Analyzer:

Reaktionskomponenten	Volumen pro well (µl)
TaqMan® Genotyping Master Mix (2X)	10,0
TaqMan® Copy Number Assay (20X)	1,0
TaqMan® Copy Number Reference Assay	1,0
Nuklease freies Wasser	4,0
gDNA (5 ng/µl)	4,0
Gesamtvolumen	20,0

Reaktionsbedingungen TaqMan® CNA	
10 min	95°C
40 Zyklen:	
15 sek	95°C
60 sek	60°C

In jeder Untersuchung wurde eine Negativkontrolle ohne gDNA sowie Kontroll-Proben von gesunden Personen mitgeführt.

### 3.7.3 Versuchsauswertung

Zur Auswertung und graphischen Darstellung der Daten wurde das auf die TaqMan®-Analysen zugeschnittene Programm CopyCaller™ verwendet. Die Daten-Auswertung in diesem Computerprogramm erfolgte mittels relativer Quantifizierung mit Hilfe der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode.

Zur Normalisierung der Patienten-Gruppe wurden die  $C_T$ -Werte der *SLC19A3*-Detektion (Threshold cycle, Schwellenwertzyklus) von den  $C_T$ -Werten der RNase P-Referenz subtrahiert:  $\Delta C_T = C_T \text{ Zielgen} - C_T \text{ Referenzgen}$ . Dann wurden diese  $\Delta C_T$  Werte auf die Kontrollproben (gesunde Personen) bezogen:  $\Delta\Delta C_T = \Delta C_T \text{ Patienten-Probe} - \Delta C_T \text{ Kontroll-Probe}$ .

Zur graphischen Darstellung der Kopienzahlveränderungen wurde die n-fache Veränderung  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  verwendet.

### 3.8 Kultivierung humaner Fibroblasten

Die Zellen wurden standardmäßig in AmnioMAX™ C-100-Medium (Gibco) unter 5% CO<sub>2</sub> und 37°C in Wasserdampf-gesättigter Atmosphäre kultiviert.

Die Fibroblasten in den Kryogefäßen wurden in einem 37°C Wasserbad aufgetaut. und in 37°C erwärmtes AmnioMAX™ C-100-Medium in eine 25 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen ausgesät. Fibroblasten wachsen einschichtig als Monolayerkultur. Ihre Proliferation kommt durch Kontaktinhibition zum Stillstand, daher wurden die Zellen nach Erreichen einer 70% Konfluenz in drei weitere 25 cm<sup>2</sup> Zellkultur-Flaschen überführt. Zum Passagieren der Zellen wurde das Medium abgezogen, die Fibroblasten mit 5ml sterilem Phosphatpuffer (Phosphate-buffered saline, PBS) gewaschen und anschließend mit 2 ml Trypsin/EDTA für 10 min bei 37°C inkubiert und somit gelöst. Durch die Zugabe von 6 ml AmnioMax™ C-100-Medium wurde die Trypsinierung inaktiviert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 1200 rpm für 4 min wurde der Überstand abgenommen, die Zellen mittels 10 ml PBS gewaschen und erneut bei 1200 rpm für 4 min zentrifugiert. Nach Abpipettieren des Überstands, wurde das Zellpellet in 10 ml Medium gelöst. 0,5 ml Zellsuspension wurden in eine mit 5 ml AmnioMax™ C-100-Medium gefüllte Zellkulturflasche überführt, bis zu einer Konfluenz von 70% kultiviert und für weitere Versuche, z.B. RNA-Isolation, verwendet.

### 3.9 Kultivierung von GripTite MSR-Zellen und MDCK-Zellen

Die GripTite MSR-Zellen wurden standardmäßig in GripTite MSR-Medium und die MDCK-Zellen in MDCK-Medium unter 95% Wasserdampfsättigung, 5% CO<sub>2</sub> und 37°C inkubiert.

Um eingefrorene Zellen zu kultivieren, wurde das jeweilige Kryoröhrchen im 37°C warmen Wasserbad aufgetaut und in 5 ml Medium überführt. Nachdem sich die Zellen am Boden abgesetzt haben, wurde das Medium zur Entfernung des Einfriermediums gewechselt. Nach 2 – 3 Tagen erreichten die Zellen eine 80 – 90%ige Konfluenz, sodass sie in eine 75 cm<sup>2</sup> Kulturschale zur weiteren Vermehrung überführt werden konnten. Hierzu wurden folgende Arbeitsschritte durchgeführt:

- Abziehen des Mediums
- Zweimaliges Waschen der Zellen mit 10 ml sterilem Phosphatpuffer (PBS,)
- Inkubation der Zellen mit 1 ml Versene oder Accutase für 5 min bei Raumtemperatur (verbessert die Zelldissoziation von Zellen mit hoher Adhärenz)
- Nach Abziehen von Versene/Accutase Zugabe von 1 ml Trypsin-EDTA mit anschließender Inkubation bei 37°C bis sich die Zellen lösen

- Beendigung der Trypsinierung durch Zugabe von 2 ml des jeweiligen Zell-Mediums
- Nach Auszählen der Zellen in einer Neubauer-Zählkammer erfolgte ein gleichmäßiges Aussäen in 24-well Schalen

### 3.10 Transiente Transfektion eukaryotischer Zellen

Zur funktionellen Charakterisierung der *SLC19A3*-Transporter (WT-, W94R- und Q393\*fs-*SLC19A3*) wurden die unmarkierten und V5-His-markierten *SLC19A3*-Konstrukte als auch ein Leervektor zur Negativ-Kontrolle transient in GripTite MSR-Zellen und MDCK-Zellen transfiziert. Hierzu wurde das Lipofectamin2000<sup>®</sup> Reagenz (Invitrogen) verwendet. Für Transportmessungen und Immunfluoreszenz-Untersuchungen erfolgte die transiente Transfektion in Zellen, welche in 24-well Platten ohne (Transport) oder mit (Immunfluoreszenz) Deckgläschen bis zu einer Konfluenz von ca. 80% kultiviert wurden. Das Medium während der Transfektion war Antibiotikafrei.

Mengenangaben pro well	
DNA-Menge	1 µg
Transfektionsreagenz	2 µl (MSR) bzw. 4 µl (MDCK)
Verdünnungsvolumen für DNA und Transfektionsreagenz in OptiMem I	50 µl
Medium im well	500 µl

Mit dem Medium OptiMem I wurden die Plasmid-DNA und das Transfektionsreagenz zunächst verdünnt. Nach einer Inkubationsdauer von 5 min wurde die Lösung aus DNA und Medium sowie die Lipofectamin2000/Medium-Lösung zusammengeführt und für 30 min zur Ausbildung der DNA/Lipofectamin-Vesikel inkubiert. Anschließend wurde die Lösung auf die Zellen getropft. Die Zellen wurden daraufhin 4-16 h bei 37°C inkubiert und dann mit PBS gewaschen. Die weitere Kultivierung erfolgte mit normalem Medium, supplementiert mit 2 mM Natriumbutyrat, um eine Steigerung der Protein-Expression zu erreichen. Ca. 36 - 48 h nach transienter Transfektion wurden die Zellen für die Transportmessungen oder die immunhistochemischen Untersuchungen eingesetzt.

### 3.11 Transportmessung an GripTite MSR-Zellen

Um den Einfluss der Mutationen auf die Funktion des *SLC19A3* zu untersuchen wurden diese Konstrukte transient in GripTite MSR- und MDCK-Zellen transfiziert und die Aufnahme von Thiamin hydrochlorid ermittelt. Als Negativ-Kontrollen dienten mit einem Leervektor transfizierten Zellen.

#### 3.11.1 Versuchsvorbereitung

Für eine zeitgenaue Durchführung der Aufnahme-Versuche wurden die 24-well-Platten mit Hilfe eines heißen Drahts in Vierer-Cluster oder Einzelwells vereinzelt. Die Messlösung bestand anteilig aus radioaktiv-markiertem und unmarkiertem Thiamin. Die entsprechende Konzentration wurde durch unmarkiertes Thiamin eingestellt und ein geringer prozentualer Anteil [<sup>3</sup>H]-markiertes Thiamin zugegeben.

#### 3.11.2 Aufnahmemessung

Zu Beginn der Aufnahmemessung wurde das Zellmedium abgezogen, die Zellen dreimal mit 37°C warmem PBS gewaschen und 10 min in 500 µl Natrium-haltigem Transportpuffer auf einer Wärmeplatte bei 37°C vorinkubiert. Nach Abziehen des Natrium-haltigen Transportpuffers wurde die Aufnahmemessung durch Zugabe von 250 µl [<sup>3</sup>H]Thiamin-Messlösung gestartet. Nach Inkubation der Zellen für die geplante Zeitspanne wurde die Aufnahme durch Abkippen der Messlösung und fünfmaliges Waschen der Zellen in eiskaltem PBS beendet.

#### 3.11.3 Flüssigszintillationsmessung

Nach Beendigung der Aufnahmemessung erfolgte die Lyse der Zellen über Nacht bei 37°C je nach Zelldichte in 400 µl – 500 µl Lysepuffer. Ein kleiner Anteil des Zelllysats sowie 3 ml Szintillationsflüssigkeit wurden in Counterröhrchen gründlich durchmischt. Danach erfolgte die Bestimmung der Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler.

#### 3.11.4 Proteinbestimmung

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit Hilfe einer modifizierten Methode nach Lowry (Lowry et al. 1951). Eine Standardreihe mit definierten Konzentrationen wurde bei jeder Proteinbestimmung eingesetzt. Je 3 x 20 µl des Standards oder des Zelllysats wurden auf eine 96-well Platte überführt. Anschließend wurden 200 µl Lösung C hinzupipettiert und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Es folgte die Zugabe von 40 µl Folinreagenz und eine zweistündige Inkubation bei Raumtemperatur zur Ausprägung der Farbreaktion. Danach erfolgte die Bestimmung der Extinktion bei

655 nm im ELISA-Reader. Die Extinktionen der Standardreihe lieferten in einer linearen Regression eine Eichgrade, anhand derer die Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben bestimmt wurden.

### 3.11.5 Auswertung der Aufnahmeversuche

Unter Berücksichtigung des prozentualen Anteils des radioaktiv-markierten Thiamins in der Messlösung wurde die aufgenommene Substratmenge in Bezug zur ermittelten Proteinkonzentration gesetzt und in der Einheit pmol/mg Protein ausgedrückt. Zur statistischen Auswertung und zur graphischen Darstellung der Ergebnisse fand das Programm GraphPad Prism 4 Anwendung.

## 3.12 Indirekte Immunfluoreszenz

Bei der indirekten Immunfluoreszenz bindet ein Epitop-spezifischer Antikörper (Primärantikörper) an das zu untersuchende Protein. Ein sekundärer Antikörper ist gegen den primären Antikörper gerichtet und trägt einen Fluoreszenzfarbstoff, welcher im Fluoreszenzmikroskop visualisiert werden kann.

In der vorgelegten Arbeit wurden die kommerziell erhältlichen Primärantikörper Maus anti-V5 (Invitrogen), Kaninchen anti-V5 (Invitrogen) und Maus anti-Cadherin (Sigma) und die Sekundärantikörper Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelter anti-Maus (Invitrogen) oder Ziege Alexa Fluor 555-gekoppelten anti-Kaninchen (Invitrogen) eingesetzt.

### 3.12.1 Versuchsdurchführung

Nach transienter Transfektion der V5-His-Transporter-Konstrukte und des pcDNA5/FRT/TO-Leervektor als Negativkontrolle in GripTite MSR- oder MDCK-Zellen in 24-well Platten auf Deckgläschen wurden die Zellen 5 min bei RT mit PBS gewaschen und 15 min mit 2% PFA fixiert. Die Fixierung wurde durch zweimaliges Waschen für 5 min mit PBS und Inkubation mit Puffer A für weitere 5 min beendet. Durch die anschließende Inkubation mit Puffer A + 0,2% Triton-X 100 (5 min, RT) erfolgte die Permeabilisierung der Zellen. Mit Blockierlösung wurden die unspezifischen Epitope zunächst blockiert (30 min, RT) und schließlich die gewünschten Proteine durch Inkubation mit dem primären monoklonalen Maus anti-V5-Antikörper (1:5000) oder mit den primären Antikörpern Kaninchen anti-V5 (1:3000) und Maus anti-Cadherin (1:500) in Blockierlösung über Nacht bei 4°C markiert. Nach Waschen mit PBS (3 x 5 min, RT) erfolgte die Inkubation der Zellen für 1 h bei Raumtemperatur mit dem sekundären Ziege Alexa Fluor 488-gekoppelten anti-Maus (1:800) Antikörper oder/und Ziege Alexa Fluor 555-gekoppelten anti-Kaninchen (1:800)

Antikörper in Blockierlösung. Die folgenden Schritte fanden in einem abgedunkelten Raum statt, um die eingesetzten Fluoreszenzfarbstoffe zu schützen. Nach dreimaligem Waschen der Zellen mit PBS (5 min, RT) wurden die Zellkerne mit DAPI/Methanol (1:5000) gefärbt (5 min, RT). Nach einem Waschschrift mit Methanol für 5 min bei RT wurden die Zellen getrocknet und mit Prolong Gold Antifade (Invitrogen) auf Objektträger eingedeckelt.

### **3.13 Fluoreszenz-Mikroskopie**

Die Aufnahme der Fluoreszenzbilder erfolgte am Leica DM5500B Fluoreszenzmikroskop mit motorisiertem Z-Fokus. Anschließend wurden die Bilder mit Hilfe des Programms LAS AF6000 mit 3D Deconvolution (Leica Microsystems) bearbeitet.

### 4. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Proben eines Kollektivs bestehend aus zehn Patienten, die sich mit einer progredienten Enzephalopathie mit vornehmlicher Beteiligung der Basalganglien präsentierten, sowie deren Geschwister und Eltern, gewonnen. Diese wurden auf Mutationen im Gen des zweiten Thiamin-Transporters *SLC19A3* untersucht und der Einfluss der identifizierten Mutationen auf Funktionalität und Membranlokalisation beleuchtet. Zusätzlich wurde *post mortem* die Expression von *SLC19A3* in verschiedenen Hirnregionen im Vergleich zu Kontroll-Hirngewebe eines Patienten ähnlichen Alters durchgeführt. Die Patienten-Fibroblasten wurden unter den zellulären Stress verursachenden Bedingungen Hypoxie und Azidose auf Veränderungen im Expressionsmuster von *SLC19A3* untersucht.

Übliche schriftliche Aufklärung und Einverständniserklärung wurden von allen Patienten oder deren gesetzlichen Vertretern eingeholt.

Im Folgenden werden die Krankheitsverläufe, die Befunde der zerebralen Kernspintomografien sowie der histopathologischen Untersuchungen der beiden betroffenen Kinder, bei denen Mutationen im untersuchten *SLC19A3*-Gen innerhalb dieses Projektes nachgewiesen werden konnten, dargestellt.

#### 4.1 Patienten

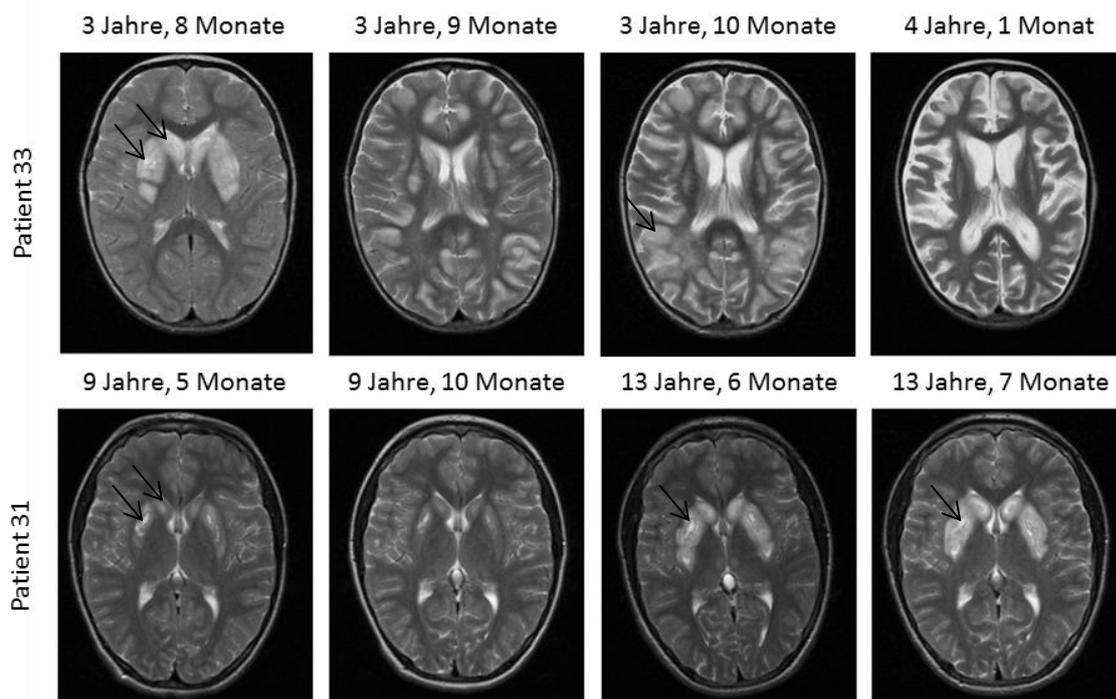
Das betroffene Geschwisterpaar stammt aus einer nicht-konsanguinen Familie deutscher Herkunft. Beide Brüder haben dieselbe Mutter, sind jedoch von unterschiedlichen Vätern, die wiederum Brüder sind. (siehe Abbildung 13).

##### 4.1.1 Klinische Präsentation

Patient 33 präsentierte sich im Alter von 3 ½ Jahren mit Somnolenz und generalisierter Dystonie nach febrilem Infekt des oberen Respirationstrakts. Im Verlauf zeigte sich eine Progredienz der Symptome bis hin zu einem komatösen Zustand mit Hypoventilation, die eine Beatmung erforderlich machte. Die initiale T2-gewichtete MRT-Untersuchung zeigte bilateral symmetrische Signalveränderungen und zystische Veränderungen von Putamen und Nucleus Caudatus (siehe Abbildung 5). Diese Abweichungen weisen auf das Vorliegen eines zytotoxischen Ödems und neuronaler Nekrose hin. Die Signalveränderungen waren in den darauffolgenden Wochen rückläufig, während progrediente diffuse kortikale und subkortikale Läsionen in beiden Hirnhemisphären in Erscheinung traten. Begleitet wurden die MRT-Befunde von prolongierten multifokalen Anfällen und *Epilepsia partialis continua*. Der

Allgemeinzustand des Patienten stabilisierte sich langsam über einige Wochen, zurück blieb jedoch eine ausgeprägte Residualsymptomatik mit schwerer Rigidität und dystoner Tetraparese, eine profunde mentale Retardierung sowie eine Medikamenten-resistente Epilepsie. Die MRT-Untersuchung vier Monate nach Einsetzen der anfänglichen Symptome zeigte eine generalisierte zerebrale Volumenminderung ohne weitere Signalveränderungen. Bei Erstmanifestation war das Krankheitsbild und vor allem die typischen zur Diagnose führenden MRT-Muster noch nicht bekannt. Es wurde eine nekrotisierende Enzephalopathie (ANE) angenommen die zu identischer Symptomatik und sehr ähnlichen MRT Befunden führen kann (Neilson et al. 2009).

Der ältere Bruder von Patient 33 (Patient 31) präsentierte sich im Alter von 9 ½ Jahren mit fazialer Dyskinesie und Dysarthrie. Ähnlich der Befunde seines Bruders zeigten sich in der T2-gewichteten MRT-Untersuchung Signalanhebungen der Basalganglien mit bilateral nekrotischen Läsionen in Nucleus Caudatus (siehe Abbildung 5). Innerhalb von zwei Wochen besserte sich die klinische Symptomatik ohne spezifische Behandlung. Eine Kontroll-MRT-Untersuchung fünf Monaten später zeigte minimale residuale bilateral zystische Läsionen in Nucleus Caudatus, während eine Regression von Schwellung und Signalanhebung zu verzeichnen war. Im Alter von 13 ½ Jahren manifestierte sich eine erneute Krankheitsepisode, die durch Verwirrtheit, orale Dyskinesie und Dysarthrie gekennzeichnet war, ohne vorhergehenden Infekt. Seine Symptome schritten zu einer generalisierten Dystonie und Rigidität mit Hypoventilation und Dysphagie voran. Der Patient wurde komatös und zeigte dilatierte und lichtstarre Pupillen. Im weiteren Verlauf entwickelte sich eine *Epilepsia partialis continua*, welche vom Auftreten ungleichmäßiger kortikaler Läsionen in beiden Hirnhemisphären in der MRT-Bildgebung begleitet war. Vor Diagnosestellung verstarb der Junge vier Wochen nach Beginn der zweiten Krankheitsperiode an einer respiratorischen Insuffizienz infolge einer Aspiration im Status epilepticus.



**Abbildung 5: Befunde der seriellen MRT-Diagnostik**

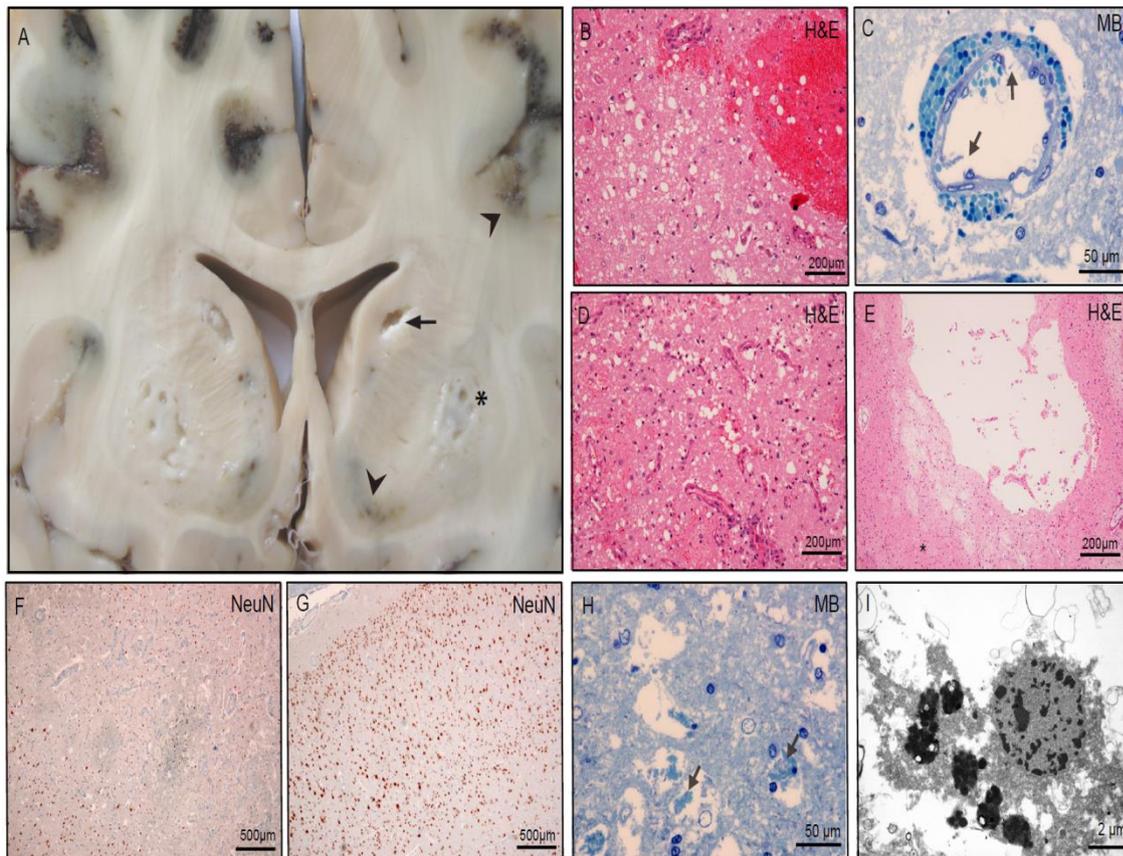
Abgebildet sind T2-gewichtete MRT-Sequenzen im axialen Schnitt von Patient 33 (obere Bildreihe) und Patient 31 (untere Bildreihe). Zu Beginn der enzephalopathischen Episode zeigte die Bildgebung bei Patient 33 bilaterale hyperintense Schwellungen des Caudatus-Kopfes und des Putamens (Pfeile) mit zentraler Nekrose. Nach einem Monat waren die Veränderungen teilweise rückläufig, während diffuse und progressive kortikale Läsionen an der Grenze zwischen grauer und weißer Substanz hinzutraten (Pfeil). Eine deutliche Erweiterung der äußeren und inneren Liquorräume ohne Signalveränderungen war nach fünf Monaten zu erkennen. Während seiner ersten Episode der Enzephalopathie zeigte Patient 31 in der initialen MRT-Bildgebung ähnliche, jedoch weniger intensiv ausgeprägte Veränderungen im Bereich der Basalganglien (Pfeile) verglichen mit seinem jüngeren Bruder. Die hirnanatomischen Veränderungen hatten sich nach fünf Monaten deutlich zurückgebildet, traten jedoch vier Jahre später betont in den Basalkernen erneut auf (Pfeil).

### 4.1.2 Zerebrale Pathologie

Die neuropathologischen Befunde wurden von Prof. Acker, Leiter des neuropathologischen Instituts des Universitätsklinikums Giessen, zur Verfügung gestellt.

In der makroskopischen Untersuchung des Gehirns von Patient 31 fanden sich zystische, nekrotische und hämorrhagische Läsionen in Putamen, Nucleus Caudatus und Kortex (siehe Abbildung 6). Die histologische Untersuchung ergab eine Kombination aus akuten, subakuten und chronischen Veränderungen. Die

nachgewiesene Vakuolisierung des Hirnparenchyms und das Vorkommen von eosinophilen Neuronen wiesen auf einen akuten Zellschaden hin. Eine ausgeprägte petechiale perivaskuläre Blutung konnte beobachtet werden. Des Weiteren demonstrierten Semi-Dünnschnitt-Untersuchungen einen Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke mit perivaskulärem Ödem, Hämorrhagie und Endothelzellverlust. Darüber hinaus waren subakute und chronische Veränderungen mit Hirnparenchym-Nekrosen, Gliose und Neovaskularisation sowie alte zystische Läsionen zu erkennen. Die immunhistochemische NeuN-Färbung ließ einen schweren neuronalen Zellverlust in einigen kortikalen Arealen, vor allem in den Zellschichten II – IV, erkennen. NeuN (Neuronal Nuclei) ist ein neuronales Protein mit nukleärer Lokalisation und gilt als spezifischer Marker reifer Nervenzellen (Mullen et al. 1992). Die Ergebnisse der immunhistochemischen NeuN-Färbung konnten sowohl durch die ultrastrukturellen Untersuchungen der Basalganglien, die akute nekrotische neuronale Veränderungen zeigten, als auch durch Western Blot des Hirn-Lysats, der eine herabgesetzte NeuN-Expression im Kortex und in den Basalganglien nachwies, bekräftigt werden. Die Lymphozyten-Färbungen (CD3, CD8, CD20 und CD45) ergaben keinen Anhalt für inflammatorische Prozesse.



**Abbildung 6: Mikroskopische und makroskopische Veränderungen in verschiedenen Hirnregionen**

**(A)** Der midfrontale Schnitt durch das Gehirn von Patient 31 zeigte akute hämorrhagische Läsionen in Globus pallidus und Kortex (Pfeilspitzen), subakute nekrotische Läsionen in Putamen (Sternchen) sowie alte zystische Läsionen in Nucleus Caudatus (Pfeil). **(B)** Die Basalganglien-Histologie zeigte akute Läsionen mit Ödem des Hirnparenchyms und fokaler Hämorrhagie. **(C)** Semi-Dünnschnitt-Untersuchungen deckten eine vaskuläre Leckage, ein perivaskuläres Ödem sowie Hämorrhagie und Endothelzellverlust auf (Pfeile). **(D, E)** In der Histologie der Basalganglien fanden sich subakute und chronische Läsionen mit Gliose, Neovaskularisation und alten zystischen Arealen. **(F)** Die NeuN-Immunhistochemie wiesen einen schweren Neuronen-Verlust im parietalen Kortex **(G)** neben angrenzenden Bereichen normalen Parenchyms nach. **(H, I)** In Semi-Dünnschnitt und Elektronenmikroskopie ließ sich der akute neuronale Zellverlust bestätigen (Pfeile). Mit freundlicher Genehmigung Prof. Acker, Neuropathologie Giessen.

## 4.2 Mutationsanalyse

Bislang wurde nur von wenigen Mutationen im *SLC19A3*-Gen berichtet, deren funktionelle Auswirkung auf die zelluläre Thiamin-Aufnahme untersucht wurden. Eine Auflistung der bislang in der Literatur publizierten *SLC19A3*-Mutationen findet sich im Anhang (siehe Tabelle A1).

## Ergebnisse

Das humane *SLC19A3*-Gen, Gegenstand des Kapitels 1.3.3, ist mit einer Gesamtlänge von 32,8 Kilobasen (kb) auf Chromosom 2q37 lokalisiert (NC\_000002.11). Das aus insgesamt 3775 Basenpaaren (bp) bestehende mRNA full length Transkript des *SLC19A3* (Genbankeintrag NM\_025243.3) setzt sich aus sechs Exons zusammen, wobei Exon 1 mit einer Länge von 89 bp den 5'-untranslatierten Bereich umfasst und der Großteil von Exon 6 den 3'-untranslatierten Bereich darstellt. Das *SLC19A3*-Protein besteht aus 496 Aminosäuren (Uniprot-Eintrag Q9BZV2) mit einem kalkulierten Molekulargewicht von ca. 56 kDa.

**Tabelle 1: Exon/Intron-Organisation des humanen *SLC19A3*-Gens**

Exon	Exonlänge (bp)	Intronlänge (kb)	Kodierend / Nicht-kodierend
1	87	15,6	nicht-kodierend
2	150	2,6	kodierend
3	828	2,7	kodierend
4	194	7,6	kodierend
5	142	0,6	kodierend
6	2340		die letzten 2166 bp sind nicht-kodierend

In dieser Arbeit wurden die DNA-Proben des oben vorgestellten Geschwisterpaares mit einer BBGD, deren Bruder und deren Eltern sowie weitere in diese Arbeit inkludierten Patienten, auf Mutationen im *SLC19A3*-Gen untersucht.

Nach Isolation der genomischen DNA aus EDTA-versetzten Vollblut-Proben aller Patienten, deren Eltern und Geschwistern, wurden die 6 Exons des *SLC19A3*-Gens mittels PCR amplifiziert (PCR-Bedingungen siehe Kapitel 3.1.4) und im ABI PRISM® 3100 Genetic Analyzer sequenziert. Mit Hilfe des Programms ABI PRISM® Data Collection konnten die erhobenen Sequenzdaten graphisch dargestellt und im Vergleich zur Referenzsequenz NT\_005403.17 ausgewertet werden.

Alle in den einzelnen Exons gefundenen Sequenzabweichungen sind im Folgenden in tabellarischer Übersicht aufgeführt (siehe Tabelle 2).

**Tabelle 2: Auflistung aller im Rahmen der vorgelegten Arbeit aufgedeckten Sequenzabweichungen**

Exon	Sequenzabweichung vom Wildtyp	rs-Nummer
1	Polymorphismus c.-90C>T	rs_4972919
2	Polymorphismus c.-62G>A	rs_6713116
3	Mutation c.280T>C (p.Trp94Arg)	
4	Polymorphismus c.980-4delT	rs_11334205
	Polymorphismus c.980-39_980-38insA	rs_79287293
5	Polymorphismus c.1314+173G>A	rs_13025803
6	Polymorphismus c.*1815A>C	rs_34020562
	Polymorphismus c.*2109C>T	rs_7593437

Die Nomenklatur der Polymorphismen und Mutationen basiert auf der Referenzsequenz NM\_025243. +1 korrespondiert mit dem A des ATG-Initiatorcodons der Translation.

### 4.2.1 Polymorphismen

Als Polymorphismen werden DNA-Varianten bezeichnet, die in der Population so weit verbreitet sind, dass sie nicht als wiederholte Mutationen angesehen werden können (Karki et al. 2015). Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv wies sieben verschiedene Polymorphismen auf, die bereits in der Literatur beschrieben wurden. Sie umfassen fünf Einzelnukleotidpolymorphismen und zwei intronische Ein-Basen-Insertions-/Deletionspolymorphismen, deren Vorkommens-Häufigkeiten zwischen 0,004 und 0,456 liegen (siehe Tabelle 2). Die Sequenzveränderungen bewirken weder eine Änderung der Aminosäure-Sequenz noch eine Änderung wichtiger regulatorischer Sequenzen, sodass mit hinreichender Sicherheit davon ausgegangen werden kann, dass es sich hier nicht um erkrankungsspezifische Sequenzveränderungen, sondern um einfache Polymorphismen handelt.

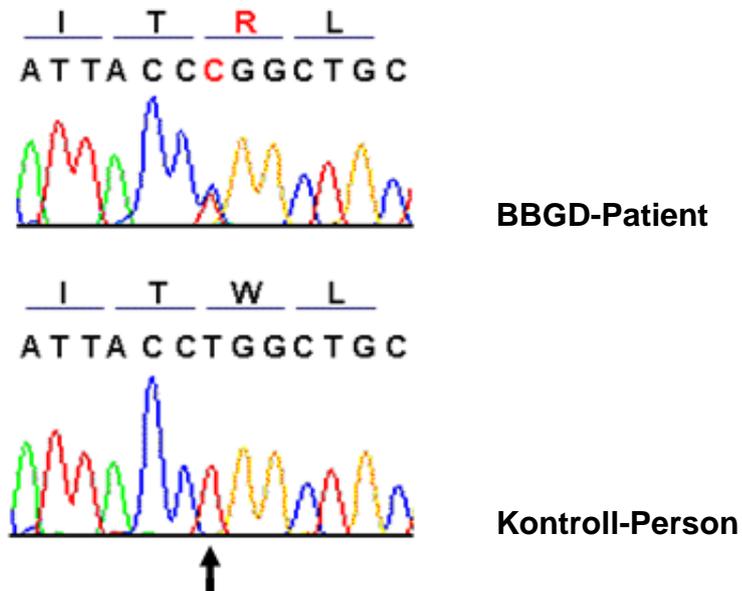
### 4.2.2 Missense-Mutation in Exon 3

Im Folgenden soll das Sequenzierungsergebnis von Exon 3 ausführlich beschrieben werden. Im Rahmen der DNA-Sequenzanalysen des *SLC19A3*-Gens konnte bei den beiden betroffenen Brüdern, deren Krankheitsverlauf in Kapitel 4.1.1 dargestellt wurde, eine Missense-Mutation aufgedeckt werden. Es handelt sich hierbei um einen heterozygoten Austausch von Thymin zu Cytosin (siehe Abbildung 7), was in einer nicht-konservativen Substitution von Tryptophan zu Arginin resultiert (p.W94R). Die Mutation ist in der dritten peripheren TMD des Thiamin-Transporters lokalisiert. Zur genaueren Charakterisierung der Punktmutation erfolgten Sequenzvariantenanalysen

mit Hilfe von *in silico* Verfahren zur Untersuchung des Grads der evolutionären Konservierung auf Protein-Ebene und auf DNA-Ebene sowie zur Untersuchung von Protein-Auswirkung der DNA-Veränderung. Die Analysen wurden mit den drei web-basierten Computerprogrammen ConSurf (Ashkenazy et al. 2010), PolyPhen-2 (Adzhubei et al. 2010) und Alamut 2.0 Interactive Biosoftware (Houdayer 2011) durchgeführt. Die Programme prognostizierten einen durchschnittlichen Konservierungsgrad auf Protein-Ebene (5 von 10) und einen hohen Konservierungsgrad auf DNA-Ebene (0,984 von 1,0). Des Weiteren wurde eine Protein-Schädigung durch die Mutation mit einem Wert von 0,984 vorhergesagt. Tryptophan und Arginin haben einen vom Computerprogramm berechneten moderaten physiko-chemischen Unterschied mit einem Grantham-Wert von 101 [0 – 215]. Tryptophan ist eine aromatische Aminosäure, die durch ihren Benzolring eine lipophile Eigenschaft besitzt. Arginin hingegen ist eine basische und hydrophile Aminosäure (Müller-Esterl 2004). Aufgrund der Ergebnisse der bioinformatischen Programme konnte von einer möglicherweise eingeschränkten Funktion des SLC19A3 durch Proteinschädigungen auf Grund der Missense-Mutation in Exon 3 ausgegangen und ihr somit Potenzial für die Entstehung der BBGD zugesprochen werden. Dies wurde durch Uptake-Messungen experimentell überprüft (siehe Kapitel 4.5).

Um zu klären, ob es sich hier um eine Neumutation oder eine vererbte Mutation handelt, wurden die elterlichen DNA-Abschnitte ebenfalls sequenziert. Die Punktmutation wurde bei der Mutter der Patienten nachgewiesen, jedoch ließ sie sich bei keinem der beiden Väter aufzeigen. Somit haben die beiden Brüder die Mutation von der Mutter geerbt.

## Ergebnisse



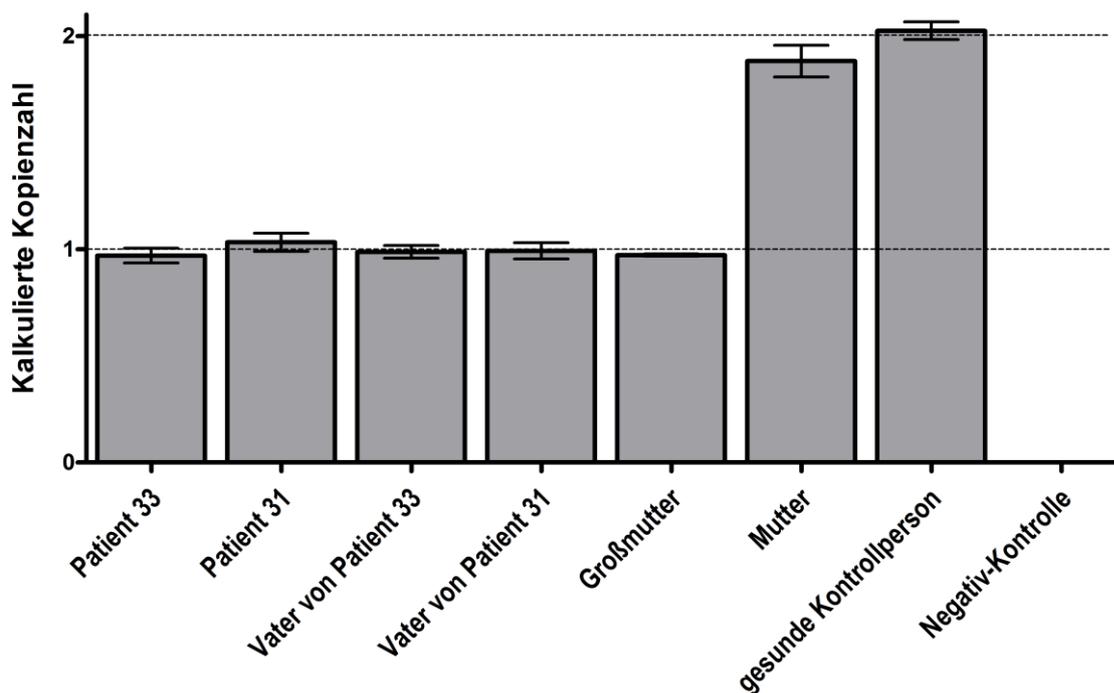
**Abbildung 7: Mutation c.T280C, Exon 3 - genomische DNA**

Abgebildet ist das Elektropherogramm der genomischen DNA-Sequenz im Bereich der Mutation c. T280C (p. W94R), die bei beiden Patienten und deren Mutter heterozygot vorliegt.

Da es sich bei der DNA-Sequenzabweichung um eine heterozygote Mutation handelt, jedoch im Rahmen der Sequenzierungsuntersuchungen keine weitere heterozygote Mutation gefunden werden konnte, wurde die Kopienzahlvariation eines jeden Exons des *SLC19A3*-Gens mit Hilfe der TaqMan® Copy Number Quantifizierungsreaktion in der quantitativen Real-Time PCR bestimmt.

### 4.2.3 Kopienzahlvariations-Untersuchung (Copy Number Assay)

Zur quantitativen Untersuchung des *SLC19A3*-Gens kam jeweils ein kommerziell erhältlicher TaqMan® Copy Number Assay für jedes einzelne Exon zum Einsatz (siehe Kapitel 3.1.4). Die Bestimmung der Kopienzahl im *SLC19A3*-Gen erfolgte im Vergleich mit einer Kontrollsequenz, die grundsätzlich in zwei Kopien eines diploiden Genoms vorliegt. Die Kalkulation der relativen Kopienzahl von Exon 1 bis 4 und Exon 6 ergab keinen Hinweis auf eine quantitative Abweichung. In Exon 5 des *SLC19A3*-Gens (Assay ID: Hs02860606\_cn) konnten jedoch relative Kopienzahl-Werte von 0,8 bis 1,3 nachgewiesen werden. Diese weisen auf eine reduzierte Kopienzahl mit einer Konfidenz von > 0,99 bei beiden Patienten, deren Väter, sowie deren Großmutter väterlicherseits hin. Kein weiteres Mitglied des Kollektivs zeigte eine Abweichung der Kopienzahl in dieser Untersuchung.



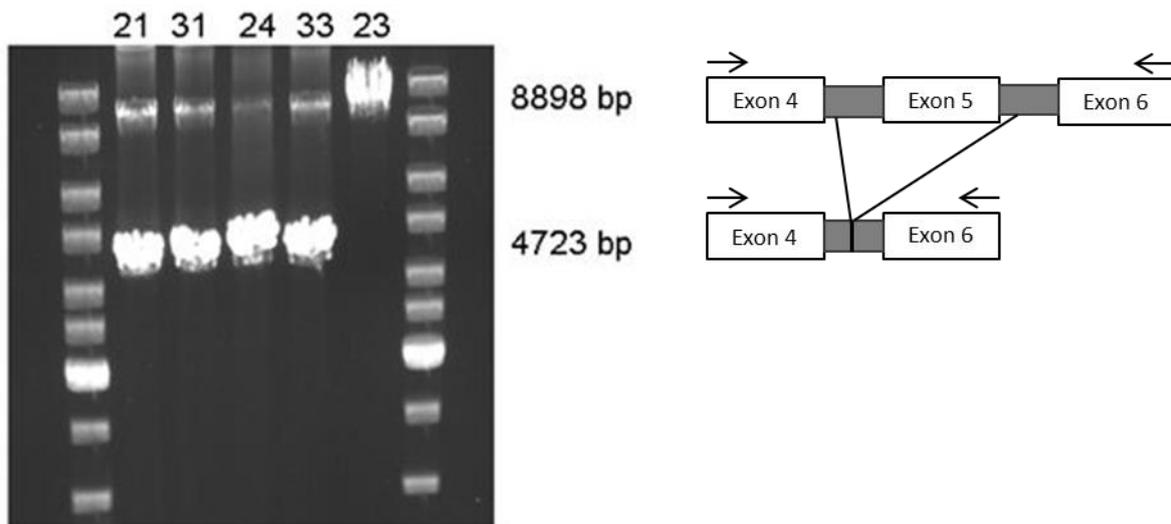
**Abbildung 8: Kopienzahlvariationsuntersuchung von Exon 5 mittels TaqMan® Copy Number Assay (Assay ID: Hs02860606\_cn)**

Diese Abbildung zeigt die prognostizierte Kopienzahl von Exon 5 des *SLC19A3*-Gens. Für Patient 33, Patient 31, deren Väter und deren Großmutter wurde eine Kopienzahl von 1 vorausgesagt mit kalkulierten Kopienzahl-Werten von 0,8 – 1,3, wohingegen für ihre Mutter und eine gesunde Kontrollperson normale Kopienzahlwerte mit kalkulierten Kopienzahl-Werten von 1,92 – 1,98 prognostiziert wurden. Alle Ergebnisse basieren auf einem Konfidenzniveau von >0,99.

Zur Detektion der genauen Bruchpunkte und somit des Ausmaßes der heterozygoten Deletion von Exon 5, wurde die vermutete Genregion mittels Longrange PCR amplifiziert und anschließend sequenziert.

#### 4.2.4 Bruchpunktbestimmung mittels Longrange-PCR und Sequenzierung

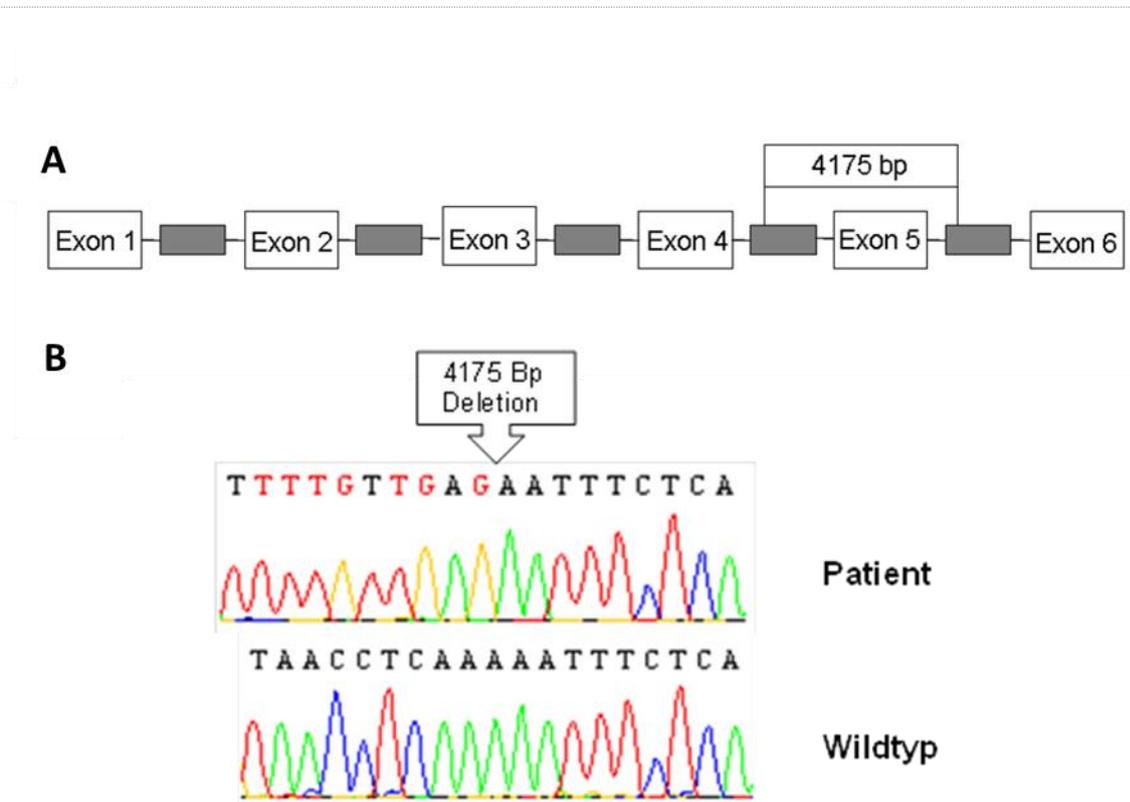
Zur detaillierten Analyse der Bruchpunkt-Region wurde der DNA-Bereich vom Ende von Exon 4 bis zum Anfang von Exon 6 amplifiziert. Die Existenz beider Allele von Exon 4 und Exon 6 wurde in der vorangegangenen Kopienzahlvariations-Untersuchung nachgewiesen. Die Primer amplifizierten ein 8,898 kb langes PCR-Produkt aus der DNA von neurologisch-gesunden Kontrollpatienten, wohingegen die Proben der beiden Patienten, deren Väter sowie deren Großmutter eine Doppelbande in der Agarose-Gelelektrophorese zeigten. Somit konnte eine Deletion mit einer geschätzten Länge von 4,0 kb im *SLC19A3*-Gen aufgedeckt werden



**Abbildung 9: Auftrennung des Longrange-PCR-Produkts in der Agarose-Gelelektrophorese**

Die Produkte der Longrange-PCR zur Detektion der Deletion von Exon 5 wurden auf einem 1,5%igem Agarose-Gel aufgetragen, aufgetrennt und anschließend mit Ethidiumbromid angefärbt und visualisiert. Die PCR-Produkte der Patienten (31 und 33), sowie deren Väter (21 und 24) zeigten eine Doppelbande in der Agarose-Gelelektrophorese auf, wohingegen das PCR-Amplifikat der Mutter (23) nur eine Einzelbande aufwies, die mit einer Länge von 8898 bp dem PCR-Produkt von Kontroll-Patienten entsprach. Die größere Bande der Patienten und deren Väter stimmten ebenfalls mit dem PCR-Produkt der Kontroll-Patienten überein. Die kleinere Bande stellte eine Deletion von ungefähr 4,0 kb dar. Die Grafik im rechten Bildabschnitt soll die Größe der Deletion verdeutlichen. Die grauen Balken stellen die jeweiligen Introns dar.

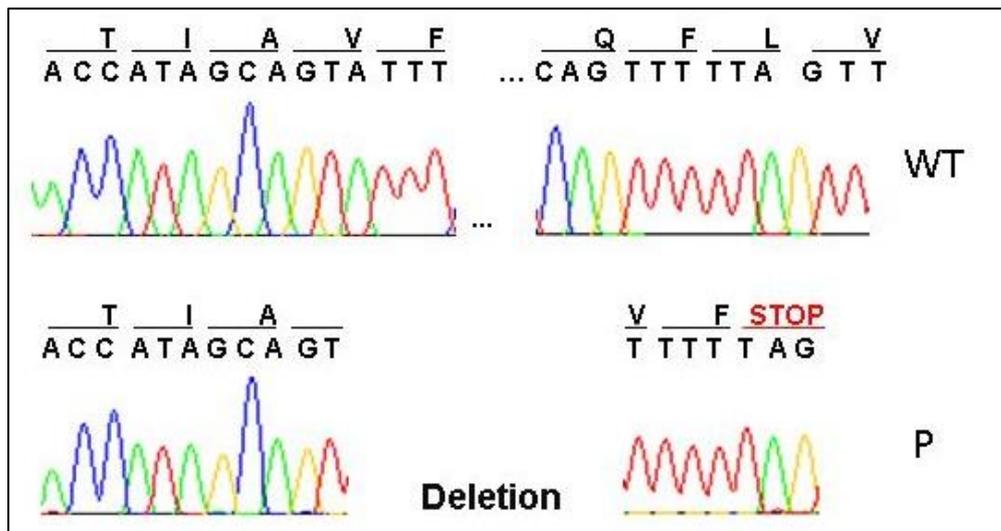
Erst die Sequenzanalyse der PCR-Produkte konnte die genaue Länge der Deletion von 4,175 kb beweisen.



**Abbildung 10: Mutation c.1173-3992\_1314+41del4175, Exon 5 - genomische DNA**

**(A)** Abgebildet ist die Exon-Intron-Abfolge im SLC19A3-Gen mit orientierender Darstellung der 4,175 kb langen Deletion. Die grauen Kästchen stellen die Intron-Sequenzen dar. Es handelt sich hierbei lediglich um eine nicht-maßstabgetreue schematische Darstellung. **(B)** Abgebildet ist das Elektropherogramm der genomischen DNA-Sequenz im Bereich der Mutation in Form der 4,175 kb langen Deletion, die bei beiden Patienten, deren Vätern und deren Großmutter heterozygot vorliegt.

Nach Isolation von RNA aus EDTA-Blut und aus Fibroblasten der Patienten sowie eines Kontroll-Patienten mit anschließender cDNA-Synthese, erfolgte die Amplifikation und Sequenzierung des full-length SLC19A3-Transkripts.

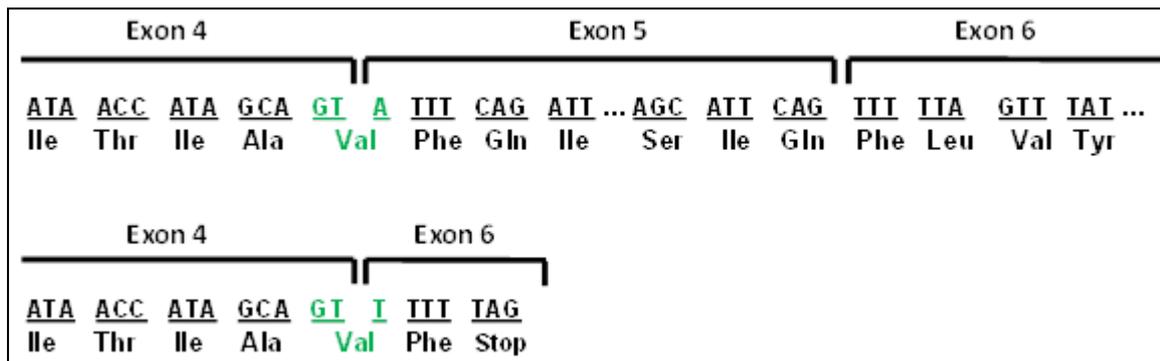


**Abbildung 11: Mutation p.Q393\*fs, Exon 5 - cDNA**

Abgebildet ist das Elektropherogramm der cDNA-Sequenz im Bereich der Deletion p.Q393\*fs eines Kontroll-Patienten (oberer Teil der Abbildung) und einem der BBGD-Patienten (unterer Teil der Abbildung). Die Abbildung zeigt den 5'-Anfang (Position 1174) und das 3'-Ende (Position 1314) der Deletion, die an Position 1319 (entspricht der Aminosäure 393) durch Verschiebung des Leserahmens zum vorzeitigen Proteinsyntheseabbruch führt. Die Deletion liegt bei beiden Patienten (31 und 33), deren Väter und der Großmutter väterlicherseits heterozygot vor. Zur besseren Übersicht und zur Kennzeichnung der in der Wildtyp-Sequenz vorhandenen Basen wurden diese auf die Länge der Deletion mit drei Auslassungspunkten kenntlich gemacht. Durch Verschiebung des Leserahmens kommt es nach zwei Aminosäuren zum vorzeitigen Proteinsyntheseabbruch.

Die Auswertung der Sequenzen des full-length *SLC19A3*-Transkripts bestätigte die Deletion auf genomischer Ebene. Die Deletion umspannt das komplette Exon 5, das sich von Position 1174 bis zur Position 1314 erstreckt. Dies hat gerade im Fall des Exon 5 weitreichende Auswirkungen, da das letzte Basentriplett von Exon 4 in Exon 5 endet (siehe Abbildung 12). Daraus resultiert eine Verschiebung des Leserahmens und die Entstehung eines vorzeitigen Stopcodons, welches zu einem Abbruch der Proteinsynthese führt (c.1173-3992\_1314+41del4175; p.Q393\*fs).

## Ergebnisse

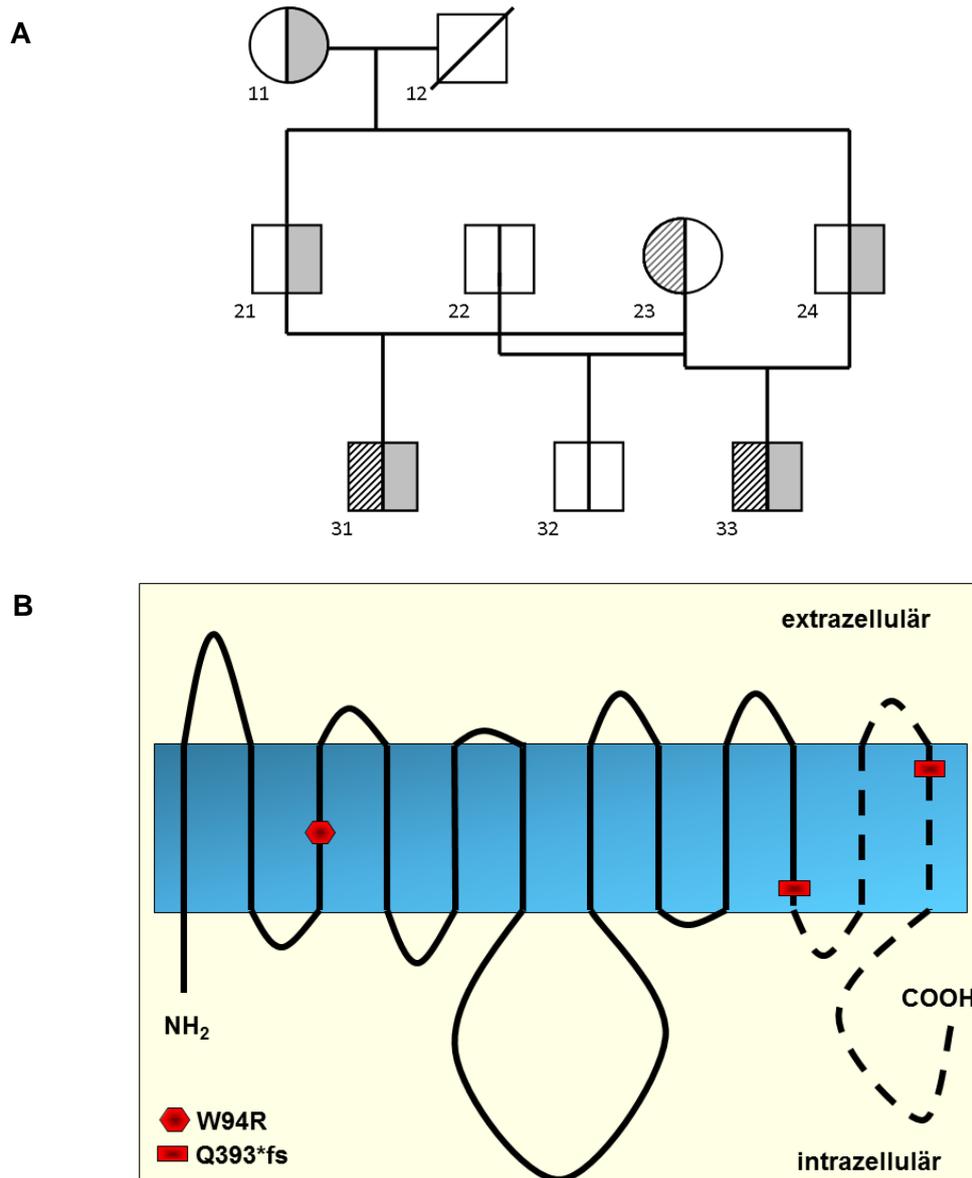


**Abbildung 12: Auswirkungen der Exon 5-Deletion**

Abgebildet ist die Deletion von Exon 5, die durch Endigung des letzten Basentriplets von Exon 4 in Exon 5 eine Verschiebung des Leserasters verursacht und damit zum vorzeitigen Stoppcodon führt. Grün markiert ist hier das auf Exon 4 und Exon 5 aufgeteilte Basentriplett.

Die heterozygote Deletion von Exon 5 umspannt nicht nur die zentral gelegene zehnte TMD, sondern gleichfalls die zwei letzten transmembranären Helices, von denen eine einen Poren-bildenden Bereich des *SLC19A3* darstellt (siehe Abbildung 3). Teile der Deletion von Exon 5 umfassen hoch konservierte Aminosäuren des *SLC19A3* (vorausgesagt durch das Internet-basierte Computer-Programm ConSurf (Ashkenazy et al. 2010)), sodass eine Auswirkung der Mutation auf die Funktion des Transporters zu erwarten ist. Uptake-Messungen an Zellen, die dieses cDNA-Konstrukt exprimierten, sollten diese Vorhersage überprüfen (siehe Kapitel 4.5).

Zusammengefasst konnten bei beiden Patienten (31 und 33) zwei zusammengesetzt heterozygote Mutationen nachgewiesen werden, wohingegen die Mutter und die Väter heterozygot für jeweils eine der Mutationen sind. So konnte bei der Mutter die heterozygote Punktmutation W94R und bei beiden Vätern die Exon 5 Deletion Q393\*fs aufgedeckt werden (siehe Abbildung 13). Es handelt sich hierbei daher um autosomal-rezessiv vererbte Mutationen. In Abbildung 13 ist die Lokalisation der W94R-Mutation in TMD3 und der Deletion an dem 3'-Ende der TMD10 dargestellt.



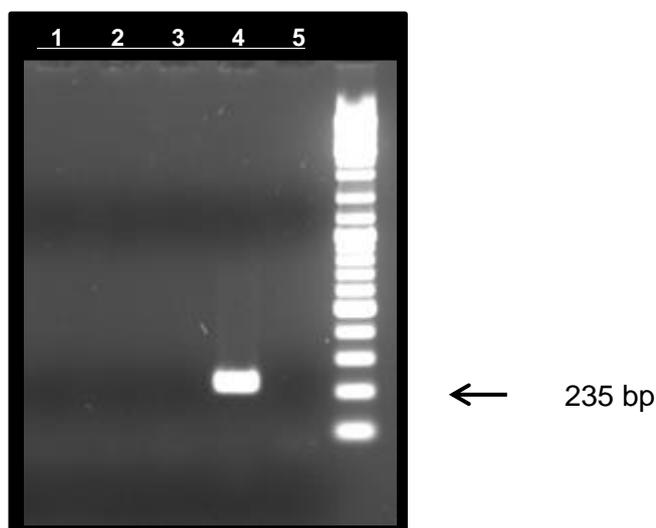
**Abbildung 13: Familienstammbaum und topologische Darstellung von *SLC19A3* mit eingezeichneten Mutationen**

**A)** Abgebildet ist der Familienstammbaum. Grau gefüllte Symbole entsprechen den Personen, die die Q393\*fs-Deletion tragen, die grau gestreiften Symbole repräsentieren die Personen mit W94R-Missense-Mutation. Die Abbildung **B)** zeigt die verifizierten Mutationen W94R und Q393\*fs in der topologischen Darstellung des *SLC19A3*. Das rote Sechseck symbolisiert die Missense-Mutation W94R, die roten Vierecke die Deletion von Exon 5 mit vorzeitigem Stoppcodon. Die gestrichelte Linie soll das Ausmaß der Deletion verdeutlichen.

### 4.3 Expressionsnachweis von *SLC19A3* mittels PCR

Um den Leserahmen von *SLC19A3* später zur Klonierung einsetzen zu können, war die Transkription des Gens in den zur Verfügung stehenden Zellen, Fibroblasten und Leukozyten, notwendig. Hierzu wurden Exon-übergreifende Primer gewählt, sodass sich der zu amplifizierende cDNA-Bereich in der Länge deutlich von eventuell fälschlicherweise vervielfältigten DNA-Abschnitten unterschied. Als Positiv-Kontrolle wurden Primer im *ABL*-Gen gewählt. Hierbei handelt es sich um ein ubiquitär exprimiertes Housekeeping-Gen.

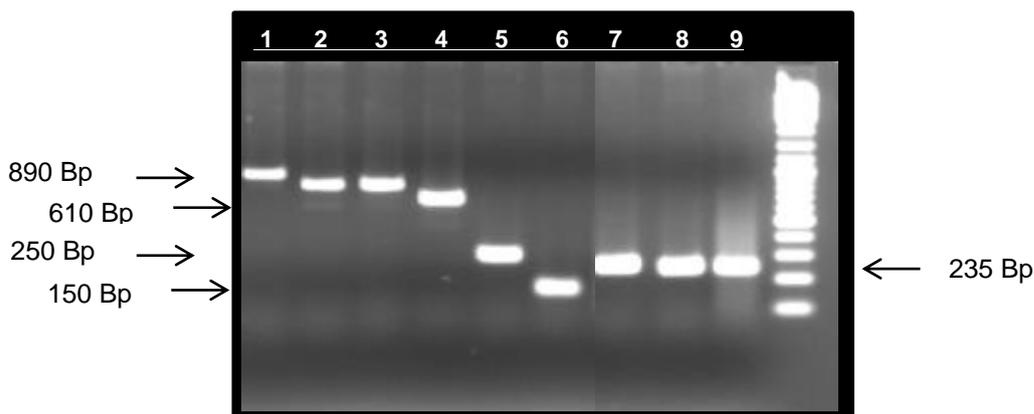
In Leukozyten konnte lediglich die mRNA des Kontroll-Gens *ABL* nachgewiesen werden, das *SLC19A3*-Transkript ließ sich in Leukozyten nicht nachweisen.



**Abbildung 14: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte zum Nachweis der *SLC19A3*-Expression in Leukozyten**

Aus Leukozyten cDNA wurde ein Teil des *ABL*- und ein Teil des *SLC19A3*-Gens Exon-übergreifend (Exon 5 nach Exon 6) amplifiziert und auf einem 1,5% Agarosegel aufgetragen, aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt und visualisiert. Leukozyten zeigten nur die Expression des *ABL*-Gens (Spalte 4). Die Spalten 1 – 3 blieben ohne *SLC19A3*-cDNA Amplifikat. Somit konnte die Expression von *SLC19A3* in Leukozyten nicht nachgewiesen werden. In Spalte 5 wurde die Negativ-Kontrolle aufgetragen.

Im Rahmen der PCR-Untersuchung konnte der Expressionsnachweis von *SLC19A3* in Fibroblasten in unterschiedlichen Reaktionen mit den in Tabelle A2 aufgelisteten Primer-Kombinationen erbracht werden. Daraus resultierend wurde zur darauffolgenden Klonierung des *SLC19A3*-Leserahmens cDNA aus Patienten- sowie Kontroll-Fibroblasten verwendet.



**Abbildung 15: Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte zum Nachweis der *SLC19A3*-Expression in Fibroblasten**

Aus Fibroblasten cDNA wurde *ABL* und *SLC19A3* exonübergreifend (Exon 5 nach Exon 6) amplifiziert und auf ein 1,5% Agarosegel aufgetragen, aufgetrennt und mit Ethidiumbromid angefärbt und visualisiert. Alle PCR-Amplifikate (lane 1 – 6) zeigten die erwartete cDNA-Länge (siehe Tabelle A2). Die Expression von *SLC19A3* in Fibroblasten wurde damit belegt. Lane 7 – 9 zeigen die Expression von *ABL* in Leukozyten und dienen als Positivkontrolle.

### 4.4 Klonierung des *SLC19A3*

Um die funktionellen Auswirkungen der detektierten *SLC19A3*-Mutationen W94R und Q393\*fs auf die Aktivität des Transporters zu untersuchen, wurden die beiden Varianten W94R und Q393\*fs sowie der Wildtyp in den Expressionsvektor pcDNA5/FRT/V5-His (Invitrogen) für die Expression in Säugetierzellen kloniert.

Nach Amplifikation der cDNA von Patient 33 und einem Kontroll-Patienten mit den Primern *SLC19A3*-F und *SLC19A3*-R<sub>mit Stop</sub> wurden die Produkte auf einem Agarosegel überprüft. Die Elektrophorese der Patienten-cDNA zeigte aufgrund der Deletion Doppelbanden, von welchen eine die W94R- und die andere die Q393\*fs-Mutation beinhaltet. Das Amplifikat der Wildtyp-cDNA zeigte eine Einzelbande. Die einzelnen Banden wurden über TOPO-TA Klonierung in den Expressionsvektor pcDNA5/FRT/V5-His ligiert. Danach lagen folgende *SLC19A3*-Konstrukte vor:

- *SLC19A3* W94R (Missense-Mutation)
- *SLC19A3* Q393\*fs (Exon 5 Deletion)
- *SLC19A3* WT (Wildtyp)

Aufgrund der Amplifikation mit Stoppcodon wird der im Plasmid enthaltene V5-His-Tag während der Expression nicht mit translatiert.

Da für *SLC19A3* keine etablierten Antikörper zur Verfügung standen, wurden Transporter-Konstrukte mit C-terminalem V5-His-Epitop erstellt, um später die

Möglichkeit der Detektion über einen kommerziell verfügbaren V5-Antikörper zu haben. Dazu wurden alle zu untersuchenden Leserahmen (W94R, Q393\*fs und Wildtyp) ohne entsprechendes Stopp-Codon amplifiziert und in den Vektor pcDNA5/FRT/V5-His (Invitrogen) kloniert. Die Leserahmen umfassten somit die C-terminale V5-His-Markierung des Vektors. Folgende Fusionsproteine wurden durch die Translation der Leserahmen gebildet:

- *SLC19A3* W94R V5-His
- *SLC19A3* Q393\*fs V5-His
- *SLC19A3* WT V5-His

Die Plasmide wurden in *E. coli* vermehrt, aufgereinigt und der korrekte fehlerfreie Leserahmen durch Sequenzierung verifiziert.

### 4.5 Funktionelle Auswirkung der *SLC19A3*-Mutationen

Bereits bioinformatische Vorhersageprogramme bewerteten die W94R-Mutation als nachteilig für die Proteinfunktion. Um diese Ergebnisse experimentell zu verifizieren, wurden die generierten WT-, W94R- und Q393\*fs-Konstrukte mit und ohne Stopp-Codon nach transienter Transfektion in GripTite MSR293- und MDCK-Zellen funktionell charakterisiert.

#### 4.5.1 Aufnahme von [<sup>3</sup>H]Thiamin hydrochlorid in transient transfizierten Zellen

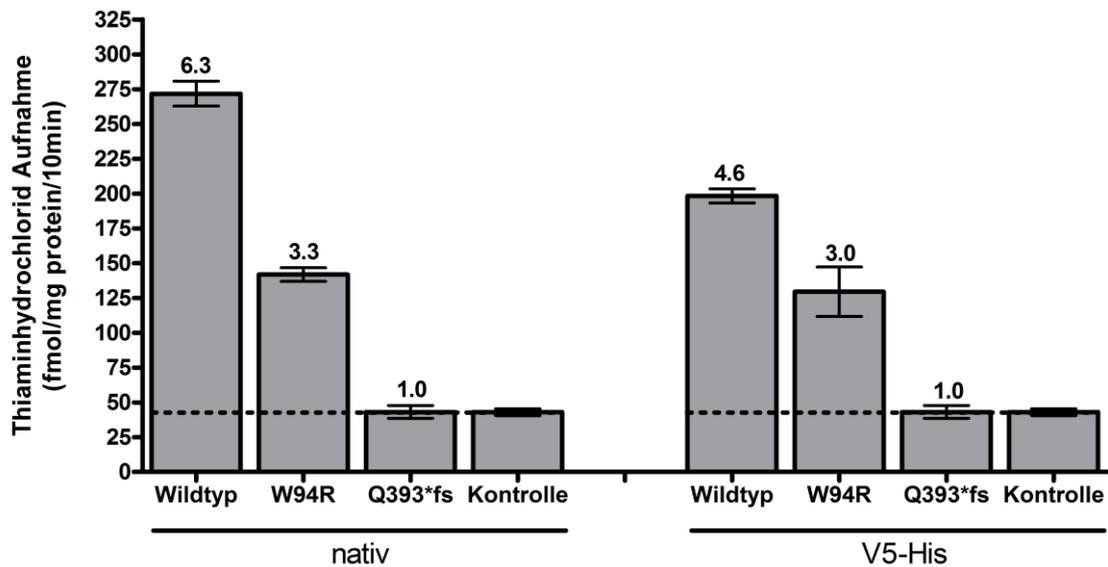
Die Bestimmung der funktionellen Auswirkungen der Mutationen W94R und Q393\*fs erfolgte durch die Aufnahme von radioaktiv-markiertem Thiamin hydrochlorid (<sup>3</sup>H]Thiamin), dessen zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler bestimmt wurde.

Die Kontrollzellen zeigten keine spezifische Aufnahme von Thiamin (10 µM) nach 10-minütiger Inkubation. In MSR-Zellen zeigte der W94R-*SLC19A3* eine um 50% reduzierte Transportaktivität im Vergleich zum WT-*SLC19A3*, dessen Thiamin-Aufnahme im Mittel 271,7 pmol/mg Protein/10 min beträgt. Einen kompletten Funktionsverlust verzeichnete der Q393\*fs-*SLC19A3*. Die Aktivitäten der unmarkierten und V5-His markierten *SLC19A3*-Konstrukte scheinen bis auf die WT-*SLC19A3* vergleichbar zu sein. MDCK-Zellen zeigten insgesamt eine geringe Aufnahmeratio als es in MSR-Zellen der Fall war. Aber auch hier war die Thiamin-Aufnahme über den W94R-*SLC19A3* im Vergleich zum WT-*SLC19A3* reduziert (11%). Der Q393\*fs-*SLC19A3* zeigte wie schon zuvor einen vollständigen Verlust der Transportaktivität. Äquivalent zu den Ergebnissen der Transportmessungen in MSR-Zellen, scheint die

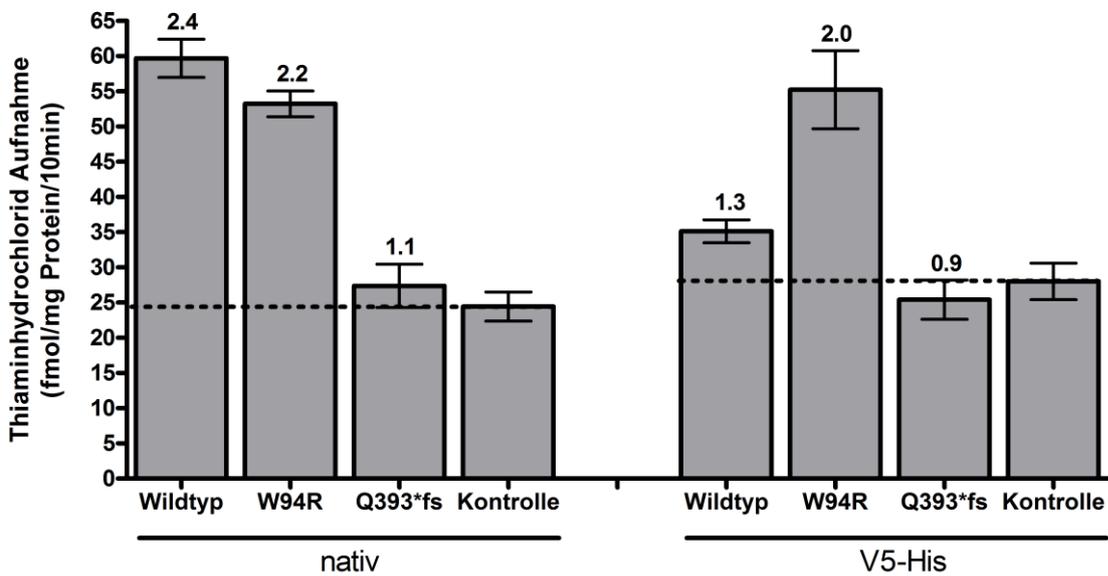
## Ergebnisse

Aktivität der unmarkierten und V5-His markierten *SLC19A3*-Konstrukte in MDCK-Zellen mit Ausnahme des WT-*SLC19A3* vergleichbar zu sein.

**A**



**B**



**Abbildung 16: Aufnahme von Thiamin in WT-*SLC19A3*-, W94R-*SLC19A3*- und Q393\*fs-*SLC19A3*-exprimierende Zellen**

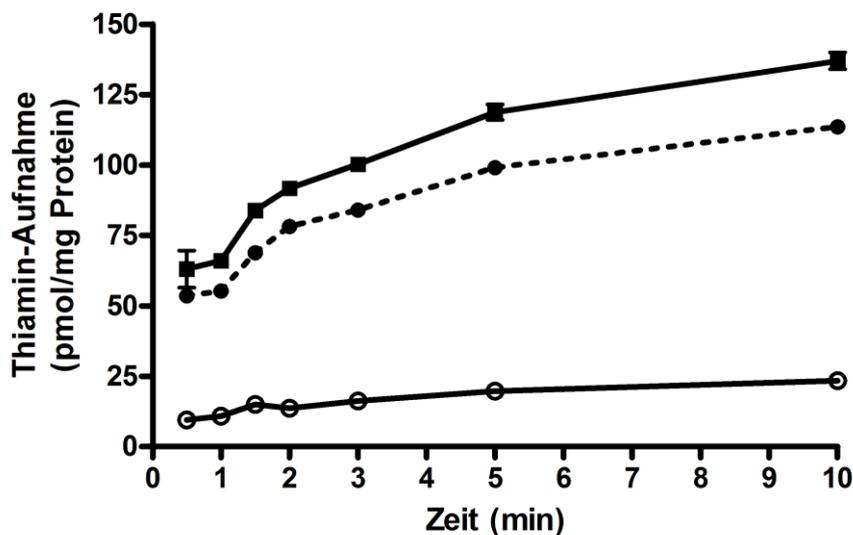
WT-*SLC19A3*, W94R-*SLC19A3* und Q393\*fs-*SLC19A3* wurden transient in MSR- (**A**) und MDCK-Zellen (**B**) transfiziert. Als Negativkontrolle dienten mit dem Leervektor (pcDNA5/FRT/V5-His) transient transfizierten GripTite MSR-Zellen (**A**) / MDCK-Zellen (**B**). Die Zellen wurden mit [<sup>3</sup>H]Thiamin (10 µM) für 10 min bei 37 °C inkubiert. Nach Waschen und

## Ergebnisse

Lysierung der Zellen wurde die zellassozierte Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte (MW)  $\pm$  Standardabweichung (SD) eines repräsentativen Experiments in Vierfachbestimmung. Die Zahlenwerte beschreiben das Vielfache der Thiamin-Aufnahme in die Kontrollzellen.

### 4.5.2 Zeitabhängigkeit des SLC19A3-Transports

Die Aufnahme von Thiamin über den WT-SLC19A3 in MSR293-Zellen wurde in Abhängigkeit der Zeit untersucht. Die Kontrollzellen zeigten keine spezifische Aufnahme über die Zeit von 10 min. Die Aufnahme von Thiamin (10  $\mu$ M) in MSR293-Zellen verlief bis zu 1 min 30 sek nahezu linear und ging dann in eine Sättigung über.



**Abbildung 17: Zeitabhängiger Transport von Thiamin in WT-SLC19A3 MSR-Zellen**

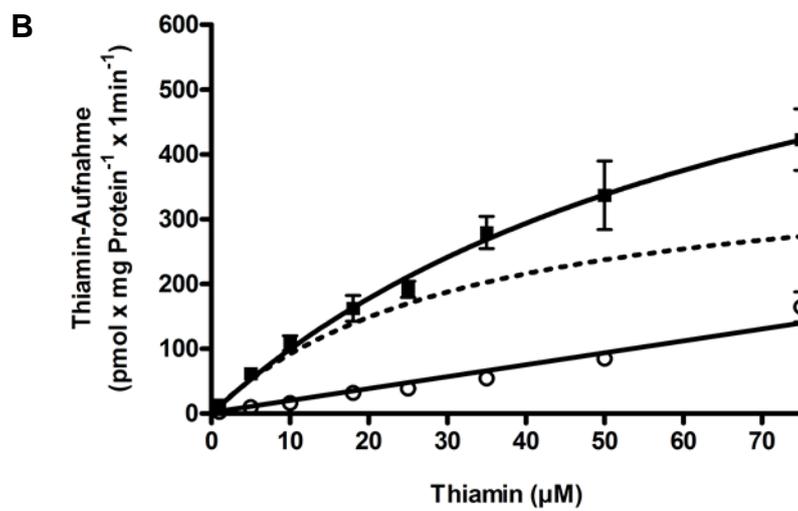
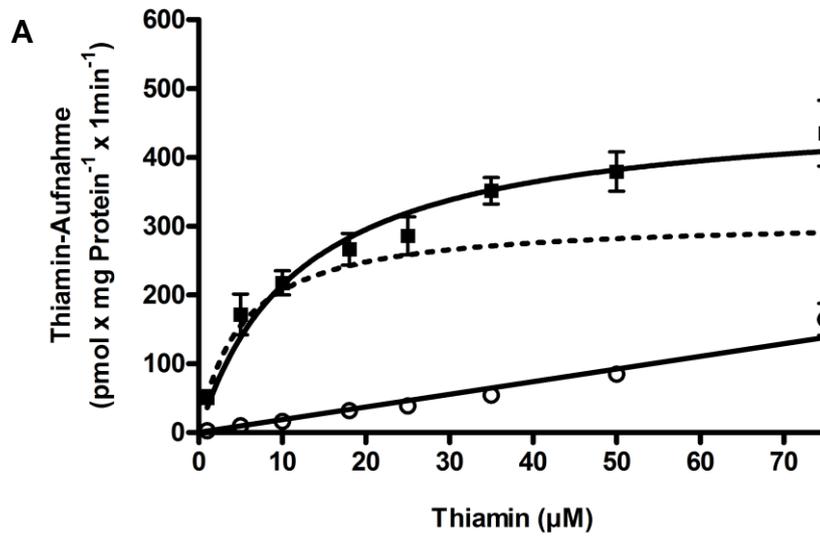
Abgebildet ist die Aufnahme von 10  $\mu$ M Thiamin in WT-SLC19A3 MSR-Zellen ( $\blacksquare$ ), die spezifische Aufnahme von 10  $\mu$ M Thiamin in WT-SLC19A3 MSR-Zellen (-  $\bullet$ - -), sowie die unspezifische Aufnahme von Thiamin in die Kontrollzellen (o) zu den angegebenen Zeitpunkten. Dazu wurden die Zellen mit eiskaltem PBS gewaschen, lysiert und die zellassozierte Radioaktivität mittels Flüssigszintillationszähler bestimmt. Die Werte stellen MW  $\pm$  SD eines repräsentativen Versuchs in Dreifachbestimmung dar.

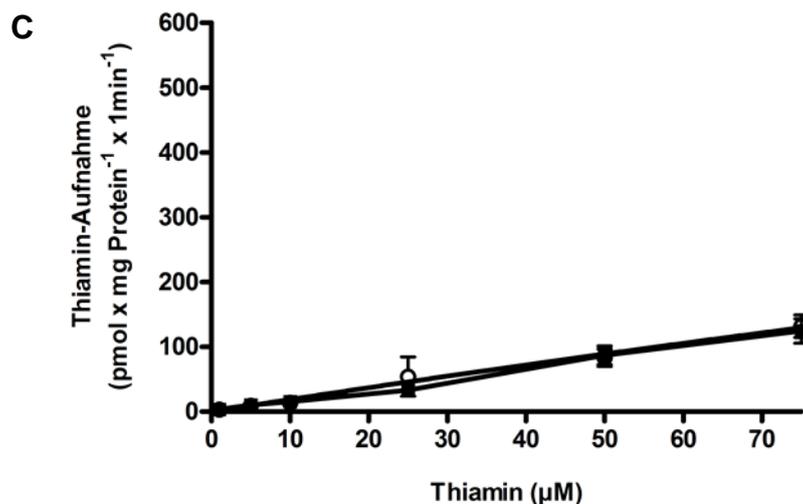
### 4.5.3 Kinetische Bestimmung des SLC19A3-vermittelten Transports

Die Bestimmung der konzentrationsabhängigen Aufnahme (1  $\mu$ M bis 75  $\mu$ M) von Thiamin erfolgte nach transienter Transfektion der jeweiligen Plasmide ohne V5-His-Markierung in GripTite 293 MSR-Zellen bei einer Minute, da sich der zeitabhängige Transport hier noch in der linearen Phase befand.

## Ergebnisse

Beim Auftrag der spezifischen Transportrate des WT-SLC19A3 und des W94R-SLC19A3 gegen die Thiamin-Konzentration zeigte sich ein für eine Michaelis-Menten-Kinetik charakteristischer Sättigungsverlauf.





**Abbildung 18: Konzentrationsabhängige Thiamin-Aufnahme in (A) WT-, (B) W94R- und (C) Q393\*fs-SLC19A3 MSR-Zellen**

Abgebildet ist die nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten. Dargestellt sind die MW  $\pm$  SD von einem repräsentativen Experiment mit jeweils vier Versuchsreihen. Die Inkubation der transient transfizierten MSR-Zellen und Kontrollzellen erfolgte für 1 min mit den angegebenen Konzentrationen [<sup>3</sup>H]Thiamin bei 37°C. Nach Waschen und Lyse der Zellen wurde die zellassoziierte Radioaktivität im Flüssigszintillationszähler bestimmt. Die spezifische Aufnahme (----) wurde durch Subtraktion der unspezifischen Aufnahme der Kontrollzellen von der Aufnahme in die jeweiligen SLC19A3-MSR-Zellen ermittelt. Die Visualisierung der Ergebnisse erfolgte durch das Computerprogramm GraphPad Prism 4.

Die kinetischen Parameter Michaelis-Menten-Konstante ( $K_m$ ) und maximale Aufnahmegeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) wurden aus den spezifischen Aufnahmen mittels nicht-linearer Regression nach Michaelis-Menten berechnet. In Tabelle 3 ist ein Überblick über die berechneten kinetischen Parameter zu finden.

**Tabelle 3:  $K_m$ - und  $V_{max}$ -Werte des WT-, W94R- und Q393\*fs-SLC19A3-vermittelten Transports.** Die kinetischen Parameter  $K_m$  und  $V_{max}$  wurden über eine nicht-lineare Regressionsanalyse mit dem Programm GraphPad Prism 4 berechnet. Die  $K_m$ -Werte sind in  $\mu\text{M}$  und die  $V_{max}$ -Werte in  $\text{pmol}/\text{mg Protein}/\text{min}$  angegeben und beziehen sich auf die spezifische Aufnahme der SLC19A3-Konstrukte.

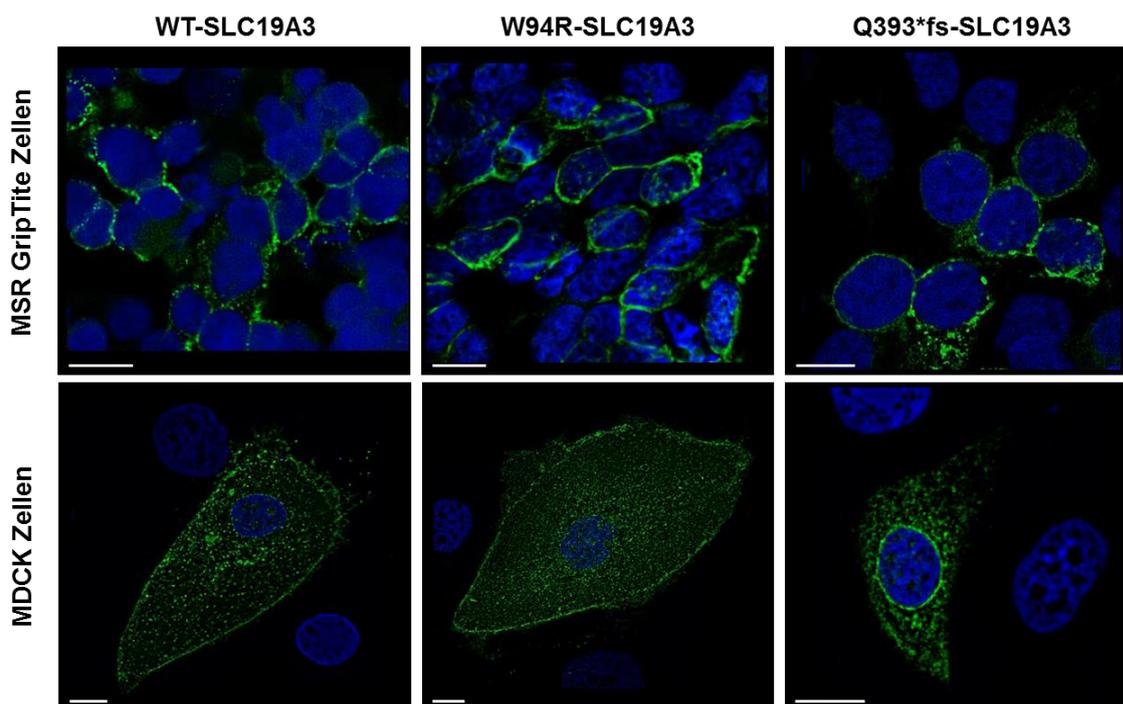
SLC19A3-Konstrukt	nicht-lineare Regression nach Michaelis-Menten	
	$K_m$	$V_{max}$
WT-SLC19A3	$5,0 \pm 1,0$	$310,0 \pm 12,8$
W94R-SLC19A3	$32,9 \pm 7,4$	$393,4 \pm 41,3$
Q393*fs-SLC19A3	Keine spezifische Aufnahme	

Die kinetischen Parameter deckten eine ähnliche Transportkapazität der WT- und W94R-SLC19A3-Proteine auf. Verglichen mit dem WT-SLC19A3 besitzt der W94R-SLC19A3 eine 6,5-fach geringere Thiamin-Affinität ( $K_m = 32,9 \mu\text{M}$ ). Der Q393\*fs-SLC19A3 konnte in den konzentrationsabhängigen Untersuchungen das Ergebnis der Aufnahme-Versuchen über 10 min bestätigen. Der Transporter zeigt auch in diesem Versuch keine Transportleistung im Vergleich zu den Kontrollzellen.

### **4.6 Intrazelluläre Lokalisation der SLC19A3-Konstrukte**

Die Untersuchungen zur Thiamin-Transporter Aktivität deckten eine verminderte Thiamin-Affinität des W94R-SLC19A3 und eine vollständig aufgehobene Transportleistung des Q393\*fs-SLC19A3 im Vergleich zum WT-SLC19A3 auf. Um herauszufinden, ob dem Verlust der Transportaktivität eine gestörte Protein-Sortierung ursächlich zu Grunde liegt, wurden die V5-His-markierten WT-, W94R- und Q393\*fs-Konstrukte in MDCK- und GripTite 293 MSR-Zellen transient transfiziert. Die intrazelluläre Lokalisation der SLC19A3-V5-His Fusionsproteine wurde mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert (siehe Abbildung 19).

Sowohl in 293MSR- als auch in MDCK-Zellen konnte für den WT-SLC19A3 und W94R-SLC19A3 eine Membran-assoziierte sowie intrazelluläre Fluoreszenz detektiert werden. Hingegen konnte der Q393\*fs nur in intrazellulären Bereichen nahe des Nukleus, vermutlich im Endoplasmatischen Retikulum, detektiert werden. Den immunzytochemischen Ergebnissen zufolge wird der Q393\*fs-SLC19A3 also nicht in die Zellmembran eingebaut. Damit unterstützen die Ergebnisse der indirekten Immunfluoreszenz die Hypothese, dass der Verlust der Q393\*fs-SLC19A3 Transportaktivität auf einem gestörten zielgerichteten Membraneinbau beruht.



**Abbildung 19: Nachweis der WT-, W94R- und Q393\*fs-SLC19A3-Proteine mittels indirekter Immunzytochemie**

Abgebildet sind die in GripTite 293MSR- (**obere Reihe**) und MDCK-Zellen (**untere Reihe**) transient transfizierten, V5-His markierten Konstrukte WT-SLC19A3, W94R-SLC19A3 und Q393\*fs-SLC19A3. Das V5-Epitop wurde mit dem monoklonalen Maus Anti-V5 Antikörper (1:5000, Invitrogen) detektiert. Der Primärantikörper wurde über den Alexa Fluor 488-gekoppelten anti-Maus-Antikörper (1:800, grün, Invitrogen) nachgewiesen. Mittels automatischer Z-Fokussierung wurden die Bilder in mehreren Ebenen aufgenommen und mit einem 3D-Deconvolution Programm nachberechnet. Abgebildet ist ein Einzelbild der Z-Fokussierung. Maßstab 10 µm.

## 4.7 Neuropathologische Ergebnisse

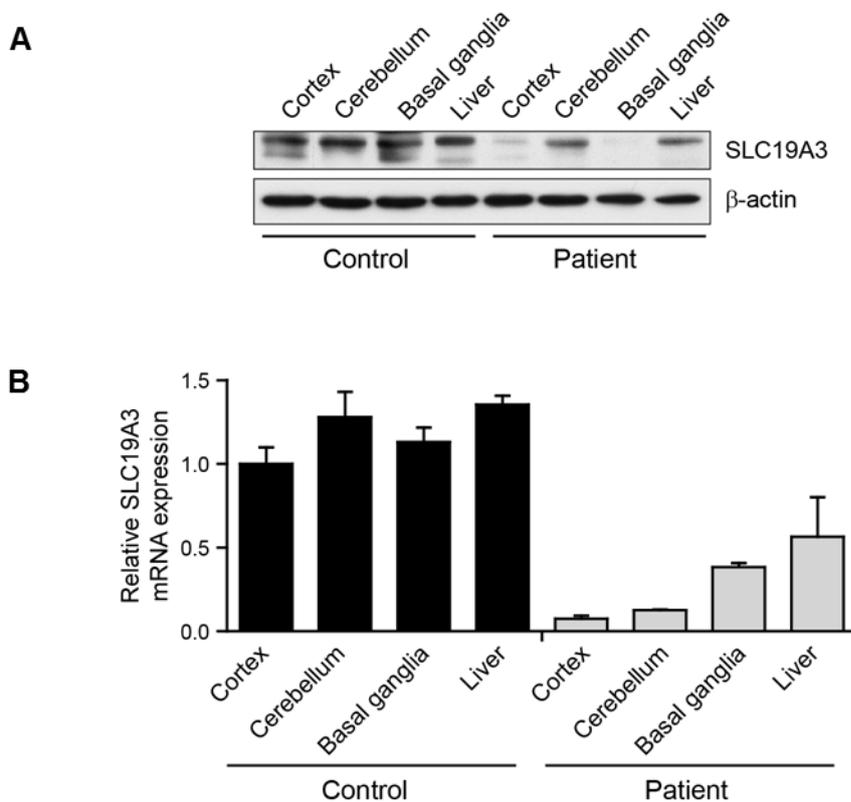
Die folgenden Ergebnisse wurden uns von Prof. Acker, Institut für Neuropathologie, Universitätsklinikum Giessen zur Verfügung gestellt. Alle Versuche wurden im Rahmen eines Fortführungsprojektes am Institut für Neuropathologie durchgeführt.

### 4.7.1 SLC19A3-Expression in unterschiedlichen Hirnregionen

Für diese Untersuchung wurden Proteine aus Leber, Kortex, Basalganglien und Zerebellum des verstorbenen Patienten und eines Kontroll-Patienten desselben Alters extrahiert. Im Westernblot zeigten sich reduzierte Expressionslevel in dem Proteinlysate des Patienten (W94R-SLC19A3, Q393\*fs-SLC19A3) im Vergleich zum Kontroll-Patienten in den Basalganglien und im Kortex. Das Zerebellum war dagegen weniger

## Ergebnisse

betroffen. Die Untersuchung der *SLC19A3*-Expression auf mRNA-Ebene in der quantitativen Realtime-PCR konnte die Westernblot-Ergebnisse bestätigen. Es wurde eine ausgeprägte Herunterregulation von W94R- und Q393\*fs-*SLC19A3* in Kortex, Basalganglien und Zerebellum im Vergleich zum WT-*SLC19A3* aufgedeckt. Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass beide Mutationen Auswirkungen auf die *SLC19A3*-mRNA Transkription bzw. auf die mRNA-Stabilität haben.



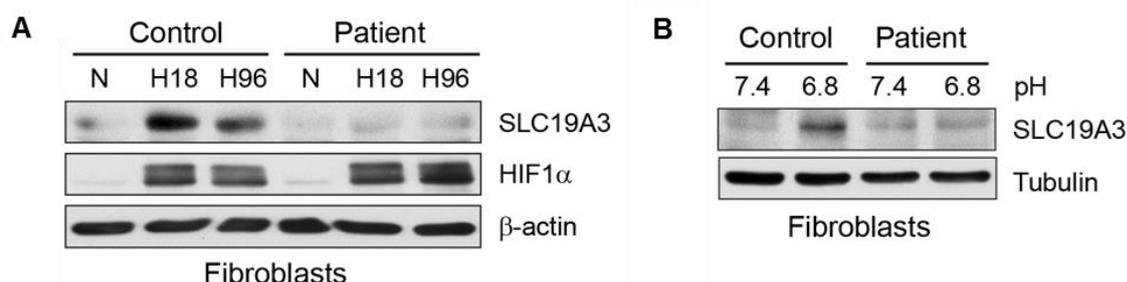
**Abbildung 20: Westernblot (A) und Realtime-PCR (B) der *SLC19A3*-Expression**

In Westernblot und Realtime-PCR zeigte sich eine reduzierte Expression von *SLC19A3* in allen genannten Hirnregionen sowie in der Leber des Patienten. **(A)** Für den Westernblot wurden die Zelllysate auf einem SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt und auf eine Nitrocellulosemembran gebロットet. Als Primärantikörper wurden der polyklonale Kaninchen anti-*SLC19A3* Antikörper (Novus Biological) und für die Ladekontrolle der monoklonale Maus anti- $\beta$ -Actin Antikörper eingesetzt. **(B)** Für die Realtime-PCR wurde RNA aus den angegebenen Geweben isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die Primer der *SLC19A3*-Quantifizierung wurden bereits in der Literatur beschrieben (Said et al. 2004). Die relative Expression wurde nach der  $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet.

#### 4.7.2 SLC19A3-Expression unter Hypoxie- und Azidosebedingungen

Um das Ansprechen von WT-SLC19A3, W94R-SLC19A3 und Q393\*fs-SLC19A3 auf Stresstimuli zu untersuchen, wurden Patienten- und Kontroll-Fibroblasten unter Hypoxie (1% O<sub>2</sub> für 18 bzw. 96 Stunden) sowie unter Azidose (pH 6,8) inkubiert. Hypoxie und Azidose sind zwei Mikroumweltfaktoren, die mit inflammatorischen Prozessen und verändertem Metabolismus in Verbindung gebracht werden (Majmundar et al. 2010; Kominsky et al. 2010).

Im Westernblot konnte unter Hypoxiebedingungen eine Hochregulation von SLC19A3 in Kontrollzellen, jedoch nur einen kleinen regulativen Effekt auf die SLC19A3-Expression in Patienten-Fibroblasten gezeigt werden (siehe Abbildung 21). Die Ergebnisse weisen somit auf eine ineffiziente Reaktion des mutierten SLC19A3 auf reduzierte Sauerstoff-Verhältnisse hin. Ähnliche Ergebnisse konnten nach Inkubation der Zellen unter Azidose-Bedingungen nachgewiesen werden. Hypoxia inducible factor 1α (HIF1α) ist ein Transkriptionsfaktor, der unter Hypoxie vermehrt exprimiert wird, er diente in diesem Versuch als Positiv-Kontrolle. In Kontrollzellen steigerte Azidose die Expression von SLC19A3, in Patienten-Fibroblasten blieb die Expression von W94R- und Q393\*fs-SLC19A3 unverändert (siehe Abbildung 21). Aufgrund von in der Literatur berichteten Besserung der Symptomatik nach hochdosierter Biotin-Therapie bei Patienten mit SLC19A3-Mutationen, wurde die Expression von SLC19A3 nach Inkubation der Fibroblasten mit unterschiedlichen Biotin-Konzentrationen untersucht. Es konnte jedoch keine Steigerung der SLC19A3-Expression nachgewiesen werden (Ergebnisse nicht gezeigt).



**Abbildung 21: Westernblot der SLC19A3-Expression nach Azidose- und Hypoxie-Inkubation von Patienten- und Kontroll-Fibroblasten**

**(A)** Im Westernblot zeigte sich eine Hochregulation von SLC19A3 in Kontrollzellen nach Inkubation mit 1% O<sub>2</sub> für 18 Stunden (H18) und 96 Stunden (H96). In Patienten-Fibroblasten konnte keine gesteigerte Expression von SLC19A3 aufgezeigt werden. Als Positivkontrolle diente HIF1α. B-Aktin wurde als Ladekontrolle eingesetzt. **(B)** Nach Inkubation von Kontroll- und Patienten-Fibroblasten unter Azidose-Bedingungen (pH 6,8) wurde eine stärkere Expression

## Ergebnisse

---

von *SLC19A3* in den Kontroll-Fibroblasten nachgewiesen. In Patienten-Fibroblasten war keine Hochregulation desselben zu verzeichnen. Als Ladekontrolle diente Tubulin.

### 5. Diskussion

Im Folgenden sollen die Ergebnisse der klinischen, neuroradiologischen und genetischen Untersuchungen, sowie die Daten der funktionellen Charakterisierung der im Rahmen dieser Arbeit aufgedeckten Mutationen und der post mortem Analysen bewertet werden.

#### 5.1 Klinisches Spektrum der BBGD

Die BBGD wird in der Literatur als subakute Enzephalopathie beschrieben, die charakteristischerweise durch eine fortschreitende Bewusstseinsminderung, spastisch dystone Bewegungsstörung und epileptische Anfälle gekennzeichnet ist (Ozand et al. 1998; Alfadhel et al. 2013). Neben den bereits beschriebenen neurologischen Symptomen (siehe Kapitel 1.2.2) manifestierten sich bei den in dieser Studie untersuchten Patienten mit molekulargenetisch nachgewiesener BBGD eine *Epilepsia partialis continua* als vorrangige Komplikation und erweitern damit das Spektrum der klinischen Symptomatik.

*SLC19A3*-Mutationen wurden mit der BBGD sowie mit drei weiteren klinischen Erscheinungsformen assoziiert. Es wurde von einem Geschwisterpaar, das sich mit einer Wernicke-ähnlichen Enzephalopathie (WLE) präsentierte, und vier verwandten Patienten mit manifesten atypischen infantilen Spasmen berichtet (Ozand et al. 1998; Yamada et al. 2010; Kono et al. 2009). Außerdem konnten aktuell bei Kindern mit Leigh-Syndrom *SLC19A3*-Mutationen identifiziert werden (Gerards et al. 2013; Pérez-Dueñas et al. 2013). Obwohl die klinischen Ausprägungen grundlegende Gemeinsamkeiten aufweisen, unterscheiden sie sich in Manifestationsalter, der dominierenden neuroradiologischen Befunde und der klinischen Morphologie. Ebenso differieren die Erscheinungsformen sowohl in dem therapeutischen Nutzen von Thiamin und / oder Biotin, als auch im Outcome (siehe Tabelle A1) (Kevelam et al. 2013). Während sich die BBGD zeitlich zwischen Kindheit und Adoleszenz mit vorwiegend epileptischen Anfällen, Verwirrtheit, Dysarthrie und extrapyramidalmotorischen Symptomen manifestiert, tritt die WLE erst in der zweiten Lebensdekade, charakterisiert durch Ophthalmoplegie, Nystagmus, Ataxie und komplex-fokaler Epilepsie, auf (Ozand et al. 1998; Debs et al. 2010; Kono et al. 2009). Wegweisend für Atypische Infantile Spasmen oder ein Leigh-Syndrom kann das Auftreten der Symptomatik einer generalisierten Epilepsie, einer Spastik und einer psychomotorischen Retardierung im Säuglingsalter sein (Yamada et al. 2010; Gerards et al. 2013; Kevelam et al. 2013).

Der Grund für die Heterogenität der klinischen Ausprägungen von *SLC19A3*-Mutationen ist ungeklärt. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass Patienten mit einem milden Phänotyp möglicherweise trotz homozygoter bzw. compound-heterozygoter Mutation über eine Restfunktion des *SLC19A3* verfügen und somit weniger vulnerabel für eine Thiamin-Defizienz sind. Eine weitere Vermutung ist, dass diese Patienten genetische oder epigenetische Faktoren aufweisen, welche die Expression anderer Thiamin-Transporter wie *SLC19A2* oder *RFC1*, ein potentieller Thiaminmonophosphat-Transporter, positiv beeinflussen. Selbst verwandte Patienten mit derselben Mutation zeigen z.T. unterschiedliche Krankheitsverläufe, die zwischen einer normalen Entwicklung bis hin zu schweren Residualsymptomen reichen (Ozand et al. 1998; Kono et al. 2009; Tabarki et al. 2013a). Auch die in dieser Studie untersuchten Brüder zeigten trotz identischer *SLC19A3*-Mutationen teilweise voneinander abweichende Krankheitsverläufe. Patient 33 wurde im Alter von 3 ½ Jahren mit Somnolenz und generalisierter Dystonie in Folge eines febrilen Infekts des oberen Respirationstrakts präsentiert. Im Verlauf waren die Symptome progredient bis hin zu einem komatösen Zustand mit Hypoventilationsstörung. Des Weiteren traten prolongierte multifokale Anfälle und eine *Epilepsia partialis continua* hinzu. Der Allgemeinzustand des Patienten stabilisierte sich über einige Wochen, jedoch behielt Patient 33 eine ausgeprägte Residualsymptomatik mit schwerer Rigidität und dystoner Tetraparese, eine profunde mentale Retardierung sowie eine Medikamenten-resistente Epilepsie zurück. Bei seinem älteren Bruder (Patient 31) manifestierte sich die erste, milde verlaufende Krankheitsperiode erst mit 9 ½ Jahren. Die Episode war gekennzeichnet durch eine faziale Dyskinesie und Dysarthrie mit Besserung der Symptomatik ohne spezifische Therapie innerhalb von zwei Wochen. Die zweite Krankheitsperiode trat im Alter von 13 ½ Jahren auf und verlief rasch progredient von einer anfänglichen Verwirrtheit mit Dyskinesie und Dysarthrie bis hin zu einer generalisierten Dystonie und Rigidität mit Hypoventilation und Dysphagie. Im weiteren Verlauf entwickelte Patient 31, genauso wie sein Bruder eine *Epilepsia partialis continua* und verstarb an einer respiratorischen Insuffizienz infolge einer Aspiration im Status epilepticus.

Die Krankheitsverläufe von Patient 31 und Patient 33 sowie die Verläufe der in der Literatur beschriebenen Patienten lassen bislang keine eindeutige Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu (Ozand et al. 1998; Kono et al. 2009; Tabarki et al. 2013a; Kevelam et al. 2013). Es sollte von anderen Umweltfaktoren, die bei der Entstehung der BBGD von Bedeutung sind, ausgegangen werden.

### 5.2 Neuroradiologisches Spektrum

In der kranialen MRT-Untersuchung zeigten Patienten mit einer BBGD vor allem fokale Läsionen in Nucleus Caudatus und Putamen (Ozand et al. 1998), wohingegen typische Veränderungen einer WLE im medialen Thalamus und des Periaquäduktalen Graus zu finden sind (Kono et al. 2009). Eine ausgeprägte kortikale Atrophie neben Basalganglien-Läsionen ist bei Atypischen Infantilen Spasmen, so wie Yamada et al. die Entität bei bereits im Säuglingsalter erkrankten Kindern nennt, erkennbar (Yamada et al. 2010). Typische Läsionen beim Leigh-Syndrom sind in Basalganglien, Thalamus, Hirnstamm sowie im Zerebellum oder diffus verteilte Signalveränderungen in weißer und grauer Substanz mit kortikaler Atrophie zu verzeichnen (Gerards et al. 2013; Kevelam et al. 2013). Die neuroradiologische Diagnostik konnte bei beiden in dieser Studie untersuchten Patienten mit *SLC19A3*-Mutationen erstmals einen dreiphasigen Krankheitsverlauf aufdecken. Im Initialstadium demonstrierte die T2-gewichtete MRT-Untersuchung symmetrische Signalanhebungen und zystische Veränderungen in Nucleus Caudatus und Putamen, die Hinweise auf das Vorliegen eines zytotoxischen Ödems und neuronaler Nekrose geben. Die Intermediärphase ist gekennzeichnet durch progrediente diffuse kortikale und subkortikale Läsionen in beiden Hirnhemisphären, sowie eine partielle Rückbildung der Befunde des ersten Stadiums. Während der dritten und späten Phase entwickelt sich eine generalisierte kortikale Atrophie mit Erweiterung der äußeren und inneren Liquorräume. Diese Ergebnisse bestätigen teilweise die in der Literatur bereits beschriebenen Befunde der zerebralen Bildgebung (Ozand et al. 1998; Kevelam et al. 2013) und können die Differenzierung zwischen BBGD und anderen Basalganglien-Erkrankungen, wie der differentialdiagnostisch in Betracht zu ziehenden Infantilen bilateralen striatalen Nekrose (Straussberg et al. 2002) unterstützen. Es lässt jedoch darauf schließen, dass die neuroradiologische Bildgebung zwar ein wichtiges diagnostisches Hilfsmittel zu sein scheint, sich aber das mit *SLC19A3*-Mutationen assoziierte neuroradiologische Spektrum variabler gestaltet als ursprünglich vermutet (Ozand et al. 1998).

Aus welchem Grund hauptsächlich in der striatalen Hirnregion Schäden in der radiologischen Diagnostik bei den meisten Patienten mit *SLC19A3*-Mutationen nachzuweisen sind, bleibt in der Literatur bislang ungeklärt. Es wurde spekuliert, dass es sich beim Striatum um eine Hirnregion mit hohem Energiebedarf und somit aktivem Glukose-Metabolismus handele. Eine aus Mutationen im *SLC19A3*-Gen resultierende Thiamin-Defizienz hemme den Glukose-Stoffwechsel und bewirke einen Energiemangel der betroffenen Regionen (Pérez-Dueñas et al. 2013). Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine herabgesetzte Transportfunktion der beiden mutierten

*SLC19A3*-Proteine, W94R-*SLC19A3* und Q393\*fs-*SLC19A3*, aufgedeckt. Darüber hinaus konnte eine erheblich verringerte *SLC19A3*-Expression in Kortex und Basalganglien des verstorbenen Patienten im Vergleich zu *SLC19A3*-Expression im Kontroll-Gewebe nachgewiesen werden (Schänzer et al. 2014). Beide Ergebnisse weisen auf eine reduzierte Thiamin-Aufnahme in der grauen Substanz der betroffenen Patienten hin und untermauern somit die Hypothese einer vorherrschenden Thiamin-Defizienz vor allem in den geschädigten striatalen und kortikalen Hirnregionen.

### **5.3 Neuropathologische Befunde der BBGD ähneln denen einer Wernicke-Enzephalopathie**

Die neuroradiologischen Ergebnisse konnten durch makro- und mikroskopische *post mortem* Untersuchungen bestätigt werden. Hier fanden sich zystische, nekrotische sowie hämorrhagische Läsionen sowohl in Putamen und Nucleus Caudatus als auch in kortikalen Hirnregionen. Als Hauptmerkmale zeigten sich histopathologisch ein selektiver Neuronen- sowie ein ausgeprägter Endothelzellverlust mit Hämorrhagie und ein Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke mit betonter Neovaskularisation. Diese Befunde stehen in Übereinstimmung mit den zerebralen Veränderungen, von denen bei zwei Kindern mit *SLC19A3*-Mutationen und Leigh-Phänotyp berichtet wurde (Kevelam et al. 2013). Darüber hinaus ähneln die makro- und mikroskopischen Befunde der im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Patienten den neuropathologischen Erscheinungen bei Patienten mit Wernicke Enzephalopathie (WE), einer neuropsychiatrischen Erkrankung verursacht durch alimentären Thiamin-Mangel (Desjardins und Butterworth 2005; Hazell und Butterworth 2009; Zuccoli et al. 2010). Während bei Erwachsenen mit WE die Läsionen typischerweise auf Corpora mamillaria, Tektum, Periaquäduktalregion und medialen Thalamus beschränkt sind, kann bei pädiatrischen Patienten nicht selten eine zusätzliche Beteiligung von Putamen, Nucleus Caudatus und Kortex beobachtet werden (Zuccoli et al. 2010; Bitsch et al. 1998a; Coe et al. 2001; Kornreich et al. 2005). Dieser Aspekt weist auf eine Parallele zwischen der BBGD und einer frühkindlichen WE hin. Es wurde hypothesisiert, dass die auffällige Störanfälligkeit des Putamens bei Kindern mit WE auf einen erhöhten Thiamin-abhängigen Energiemetabolismus in dieser Altersgruppe zurückzuführen ist (Zuccoli et al. 2010).

### 5.4 Mutationsanalyse

2005 wurden erstmals Mutationen im *SLC19A3*-Gen mit der Erkrankung BBGD assoziiert (Zeng et al. 2005). Seitdem stand die genetische Untersuchung zum Nachweis dieser Entität im Mittelpunkt der Diagnostik. Aufgrund der geringen Anzahl von in der Literatur beschriebenen Fällen einer BBGD und der mangelnden Genotyp-Phänotyp-Korrelation konnten bislang noch keine weiteren Kriterien zur sicheren Diagnosestellung etabliert werden.

Mutationsanalysen im Rahmen der vorgelegten Arbeit deckten bei zwei betroffenen Brüdern zwei pathogene compound-heterozygote Mutationen im *SLC19A3*-Gen auf. Die nicht-konservative Substitution von Tryptophan zu Arginin (W94R) ist in der dritten peripher gelegenen Transmembrandomäne (TMD) des Thiamin-Transporters lokalisiert (siehe Abbildung 13). Welche Auswirkungen Mutationen in peripheren TMD auf die Funktion des Transportproteins haben, ist Gegenstand hypothetischer Überlegungen. Es wird vermutet, dass immer drei nah beieinander liegende TMD interagieren und sich Mutationen in peripher gelegenen Bereichen damit auf die Konformation einer Porenbildenden Helix auswirken können (Subramanian et al. 2006b). Sowohl die Ergebnisse der angewendeten *in silico* Verfahren zur Untersuchung des Grads der evolutionären Konservierung auf Protein- und DNA-Ebene als auch die Ergebnisse der Untersuchung der Proteinfunktion (PolyPhen-2, Alamut 2.0, ConSurf) (siehe Kapitel 4.2.2) ließen eine Auswirkung der Mutation W94R auf die Funktion des Transporters vermuten. Um diese Vermutung experimentell zu verifizieren, sollte die Transportfunktion des W94R-*SLC19A3* mit Hilfe von Transportstudien in transient transfizierten MSR293-Zellen untersucht werden.

Bei der zweiten Mutation handelt es sich um eine 4,175 kb große genomische Deletion (c.1173-3992\_1314+41del4175), die sich über das komplette Exon 5, sowie weite Teile der angrenzenden intronischen Bereiche erstreckt. Dies hat an dieser Stelle weitreichende Folgen. Da das letzte Basentriplett von Exon 4 sich in Exon 5 fortsetzt und letzteres wegfällt, kommt es zu einer Verschiebung des Leserahmens und endet nach drei regelrechten Aminosäuren in einem vorzeitigen Proteinsyntheseabbruch (Q393\*fs). Somit überspannt die Deletion Q393\*fs nicht nur die zentral gelegene zehnte TMD, sondern gleichfalls die zwei letzten transmembranären Helices. Subramanian et al. haben gezeigt, dass es sich bei der elften TMD um einen Porenbildenden Bereich des Proteins handelt, der an der Substratbindung und –translokation beteiligt ist (Subramanian et al. 2006a). Das internet-basierte Computer-Programm ConSurf identifizierte die Deletion Q393\*fs als Bereich des *SLC19A3*, welcher teilweise hoch konservierte Aminosäuren umfasst. Es ist daher naheliegend, dass durch diese

weitreichende Sequenzveränderung die Funktion des Transportproteins deutlich beeinflusst wird. Auch diese Vermutung wurde mit Hilfe von Transportstudien verifiziert (siehe Kapitel 4.5). Die compound-heterozygote Deletion Q393\*fs wurde 2013 von einer weiteren Arbeitsgruppe bei einer  $2\frac{1}{12}$  Jahre alten Patientin kanadischer Herkunft nachgewiesen, die sich mit progressiver Spastik und respiratorischer Insuffizienz präsentierte (Kevelam et al. 2013).

Unsere beiden Patienten mit einbezogen wurde bislang bei mindestens 70 Patienten eine BBGD oder andere *SLC19A3*-assoziierte Erkrankungen diagnostiziert. Bei mindestens 57 Patienten wurde die Diagnose durch genetische Analysen bestätigt, insgesamt konnten ca. 15 verschiedene pathogene Sequenzvarianten identifiziert werden. Bei mehreren Betroffenen wurden identische Mutationen aufgedeckt. So lag bei Patienten aus Saudi-Arabien nahezu ausschließlich die Missense-Mutation c.1264A>G vor (Zeng et al. 2005; Alfadhel et al. 2013; Tabarki et al. 2013a; Tabarki et al. 2013b). Gerards et al. vermuteten aufgrund des gehäuften Auftretens der Mutation p.Ser7Ter in einer nord-marokkanischen Population einen Gründereffekt (Gerards et al. 2013). Interessanterweise prägte sich diese homozygote Missense-Mutation phänotypisch als Leigh-Syndrom aus, eine mitochondriale Erkrankung charakterisiert als subakute nekrotisierende Enzephalomyelopathie mit u.a. psychomotorischer Entwicklungsstörung, muskulärer Hypotonie und respiratorischer Insuffizienz (Leigh 1951; DiMauro 1999; Gerards et al. 2013). Die homozygote Mutation p.E320Q war klinisch mit einem atypischen West-Syndrom assoziiert, während sie bei compound-heterozygotem Auftreten mit der Mutation p.K44E in dem Phänotyp der Wernicke-ähnlichen Enzephalopathie resultierte (Kono et al. 2009; Yamada et al. 2010).

## 5.5 Funktionelle Charakterisierung der *SLC19A3*-Mutationen

### 5.5.1 Abhängigkeit der Transportfunktion von *SLC19A3*-Mutationen

Wie schon erwähnt, sind einige Mutationen in *SLC19A3* bekannt, von denen wenige auf ihre Funktion überprüft wurden. Für die Mutationen p.K44E, p.E320Q, p.G23V, p.T422A und p.S7Ter wurde ein reduzierter oder aufgehobener Thiamin-Transport festgestellt (Kono et al. 2009; Yamada et al. 2010; Subramanian et al. 2006a; Gerards et al. 2013). Allerdings erfolgte keine kinetische Bewertung. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die in dieser Studie identifizierten Mutationen im *SLC19A3*-Gen erstmals im Hinblick auf die kinetischen Parameter Michaelis-Menten-Konstante und maximale Aufnahmegeschwindigkeit hin untersucht.

Zur Verifizierung der Pathogenität der identifizierten Mutationen und deren Auswirkungen auf Transportfunktion und Proteinsorting wurden die Konstrukte WT-SLC19A3, W94R-SLC19A3 und Q393\*fs-SLC19A3 für Transport-kinetische Untersuchungen transient in MSR293- und MDCK-Zellen transfiziert.

Im Rahmen der Thiamin-Transportstudien konnte gezeigt werden, dass beide Mutationen W94R und Q393\*fs zu einer funktionellen Änderung des SLC19A3-Proteins führen. Das W94R-SLC19A3 Protein verfügt über eine 6,5-fach geringere Affinität zu Thiamin im Vergleich zum WT-SLC19A3 Protein. Dies ergibt sich aus den ermittelten  $K_m$ -Werten von 32,9  $\mu\text{M}$  für den W94R-SLC19A3 und 5,0  $\mu\text{M}$  für den WT-SLC19A3. Diese Ergebnisse resultierten in einer eingeschränkten Thiamin-Transportfunktion des W94R-SLC19A3 bei Thiamin-Konzentrationen im niedrigen  $\mu\text{M}$ -Bereich. Hingegen zeigten beide Proteine eine ähnliche Transportkapazität ( $V_{\text{max}}$  von 310,0 pmol/mg Protein/min (WT-SLC19A3) und 393,4 pmol/mg Protein/min (W94R-SLC19A3)). Die Ergebnisse der kinetischen Untersuchung des WT-SLC19A3 konnten die bereits in der Literatur beschriebenen Werte, die in nativen HEK293-Zellen gewonnen wurden, bestätigen ( $K_m = 2,66 \mu\text{M}$ ). Da in dieser Studie mit nativen Zellen gearbeitet wurde, weicht der  $V_{\text{max}}$ -Wert von 25,4  $\pm$  0,5 pmol/mg Protein/ 7 Minuten deutlich von den in dieser Arbeit gewonnenen Ergebnissen der  $V_{\text{max}}$ -Bestimmung ab und ist daher nicht vergleichbar (Ashokkumar et al. 2006).

Im Gegensatz zu W94R-SLC19A3 konnte keine spezifische Thiamin-Akkumulation des Q393\*fs-SLC19A3 über eine Konzentrationsspanne von 0 – 75  $\mu\text{M}$  Thiamin nachgewiesen werden. Zur Klärung der Frage, ob dem Verlust der Transportaktivität eine gestörte Proteinfunktion oder ein gestörtes Protein-Sorting zu Grunde liegen, wurde die intrazelluläre Lokalisation von SLC19A3-V5-His Fusionsproteine mittels indirekter Immunfluoreszenz analysiert (siehe Kapitel 5.5.2).

Interessanterweise wurde der erste Thiamin-Transporter, SLC19A2, als hoch-affiner Transporter mit geringer Transportkapazität charakterisiert ( $K_m = 70,0 \text{ nM}$ ;  $V_{\text{max}} = 1370 \text{ fmol/mg Protein/7 min}$ ), wohingegen der SLC19A3-vermittelte Transport mit geringer Affinität und hoher Kapazität abläuft (Fleming et al. 2001; Ashokkumar et al. 2006). Diese Tatsache lässt die Vermutung zu, dass der SLC19A2-Transporter eine SLC19A3-Dysfunktion nicht auszugleichen vermag, Funktionsverlust-Mutationen des SLC19A2 jedoch von einem SLC19A3-vermittelten Thiamin-Transport teilweise kompensiert werden können. Diese Hypothese wird von der berichteten ausbleibenden Thiamin-Defizienz im Plasma bei Patienten mit SLC19A2-Mutationen (Thiamin-responsive megaloblastäre Anämie) und herabgesetzter Thiamin-Konzentration in Liquor und Fibroblasten bei Patienten mit SLC19A3-Mutationen unterstützt (Neufeld et al. 2001; Ortigoza-Escobar et al. 2015).

### 5.5.2 Einfluss von *SLC19A3*-Mutationen auf die Proteinlokalisierung

Zur Klärung der Lokalisation des WT-, W94R- und Q393\*fs-*SLC19A3* wurde die Expression der *SLC19A3*-Proteine nach transienter Transfektion der V5-His-markierten Konstrukte in GripTite MSR293- und MDCK-Zellen mittels indirekter Immunfluoreszenz untersucht. WT- und W94R-*SLC19A3* zeigten sowohl in GripTite MSR293- als auch in MDCK-Zellen eine vergleichbare Membran-assoziierte Expression und intrazelluläre Lokalisation der Proteine, was in Übereinstimmung mit der vergleichbaren Transportkapazität steht. In MDCK-Zellen wurde die Membran-assoziierte Fluoreszenz hauptsächlich in der basolateralen Zellmembran nachgewiesen, obwohl in Studien aus der Arbeitsgruppe um Subramanian eine apikale Expression in MDCK-Zellen bereits gezeigt wurde (Boulware et al. 2003; Subramanian et al. 2006a). Bisher konnte für dieses Phänomen noch keine Erklärung gefunden werden. Allerdings wies das trunkierte Transportprotein Q393\*fs-*SLC19A3* ein davon eindeutig abweichendes Fluoreszenzmuster auf, das auf ein beeinträchtigtes Membrantargeting und eine intrazelluläre Lokalisation hindeutete. Dieses Ergebnis findet Übereinstimmung mit der Studie von Subramanian et al., welche eine Retention des am C-Terminus um 50 Aminosäuren trunkierten humanen *SLC19A3*-Transporters im Endoplasmatischen Reticulum (ER) nachweisen konnte (Subramanian et al. 2006a). Daher ist ebenfalls von einer verhinderten Translokation des Q393\*fs-*SLC19A3* aus dem ER in die Plasmamembran auszugehen. Ein gleichzeitiger Nachweis von ER-spezifischem Protein und *SLC19A3*-Protein mittels immunhistochemischer Methoden wäre denkbar gewesen. Trotz allem lässt sich schlussfolgern, dass nicht eine gestörte Proteinfunktion, sondern vielmehr ein fehlerhaftes Proteinsorting der Grund für den Verlust der Transporteigenschaften des Q393\*fs-*SLC19A3* ist. Subramanian et al., zeigten, dass - im Gegensatz zu anderen Transportproteinen - der Carboxy-Terminus des *SLC19A3* nicht für das Membrantargeting per se von Bedeutung ist. Vielmehr scheint die Membranexpression von der Integrität der transmembranären Proteinstruktur abhängig zu sein. Vor allem Deletionen der peripher gelegenen TMD des N- und C-Terminus scheinen ein korrektes Membrantargeting zu verhindern (Subramanian et al. 2006b).

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass der in dieser Untersuchung beleuchtete Patient ein funktionsloses *SLC19A3*-Protein sowie ein bei niedrigen Thiamin-Konzentrationen eingeschränktes Transportprotein besitzt, die beide zu einer reduzierten Thiamin-Versorgung führen.

### 5.6 Stresstimuli als Triggerfaktoren der BBGD

Wiederholt wurde in der Literatur vom Auftreten der BBGD bei zuvor gesunden Kindern in Folge eines febrilen Infekts oder einer katabolen Stoffwechsellage berichtet (Ozand et al. 1998; Debs et al. 2010; Kevelam et al. 2013; Pérez-Dueñas et al. 2013; Tabarki et al. 2013a). Eine mögliche Erklärung für diesen Zusammenhang ist, dass Stresstimuli die Aktivität/Expression des WT-*SLC19A3* modulieren, um den erhöhten Thiamin-Bedarf auszugleichen und damit eine normale Hirnfunktion und Homöostase aufrechtzuerhalten. Mutierte Transporter hingegen können weniger sensibel auf Stress-Faktoren reagieren. Bemerkenswerterweise konnte in Brustkrebszellen, die einer chronischen Hypoxie ausgesetzt wurden, eine 40-fache Steigerung der *SLC19A3*-Expression ohne Veränderung der *SLC19A2*-Expression beobachtet werden. Konsistente Ergebnisse erbrachte auch die Exposition von Neuroblastom-Zellen mit Thiamin-Defizienz. Aus diesen Ergebnissen wurde geschlossen, dass eine veränderte *SLC19A3*-Expression eine wichtige Adaptation von Tumorzellen darstellt, um die Nährstoffaufnahme zur Aufrechterhaltung des Energiemetabolismus während zellulärer Hypoxie zu gewährleisten (Sweet et al. 2010; Sweet und Zastre 2013). Im Rahmen des Fortführungsprojektes dieser Studie konnte eine Hypoxie- und Azidose-induzierte Hochregulierung der *SLC19A3*-Expression in humanen nicht-neoplastischen Zellen, Fibroblasten, nachgewiesen werden. Hypoxie sowie Azidose sind, ebenso wie eine Thiamin-Defizienz, zelluläre Stresstimuli, die mit inflammatorischen Prozessen und metabolischen Veränderungen in Verbindung stehen (Pannunzio et al. 2000; Desjardins und Butterworth 2005; Kominsky et al. 2010; Majmundar et al. 2010).

In Patienten-Fibroblasten wurde keine gesteigerte Expression der in dieser Studie identifizierten mutierten *SLC19A3*-Proteine weder unter Hypoxie- noch unter Azidose-Bedingungen aufgedeckt. Gemeinsam mit der Tatsache, dass *SLC19A3* in Neuronen exprimiert wird (Subramanian et al. 2006a), bekräftigt dies die Hypothese, dass zelluläre Stress-Faktoren keine gesteigerte Expression zumindest dieser mutierten *SLC19A3*-Proteine in neuronalen Zellen induzieren können. Eine verstärkte Expression von *SLC19A3* unter Hypoxie und Azidose weist auf einen erhöhten zellulären Thiamin-Bedarf aufgrund von oxidativem Stress hin. Ist eine *SLC19A3*-defiziente Zelle nicht in der Lage mit einer *SLC19A3*-Überexpression angemessen auf Stressfaktoren zu reagieren, resultiert daraus ein relativer Energie-Mangel mit konsekutiver Beeinträchtigung des Energiemetabolismus (Hazell und Butterworth 2009). Eine Thiamin-Defizienz aufgrund einer fehlenden *SLC19A3*-Expressionssteigerung kann

daher als pathophysiologische Grundlage der BBGD hypothetisch angenommen werden.

### **5.7 Auswirkungen einer Thiamin-Defizienz auf den zellulären Metabolismus**

Der Thiaminphosphorsäureester Thiamindiphosphat (TDP), die biologisch aktive Form des Thiamins, agiert in Nervenzellen als Koenzym von Pyruvat-Dehydrogenase und  $\alpha$ -Ketoglutarat-Dehydrogenase ( $\alpha$ KGDH). Die TDP-abhängige  $\alpha$ KGDH ist das schrittlimitierende Enzym des Tricarbonsäurezyklus (Zitratzyklus). Eine Aktivitätsminderung der  $\alpha$ KGDH stellt daher den ersten metabolischen Effekt einer zellulären Thiamin-Defizienz dar (Pannunzio et al. 2000; Desjardins und Butterworth 2005). Der reduzierte Fluss des Zitratzyklus aufgrund einer herabgesetzten  $\alpha$ KGDH-Aktivität resultiert in einer mitochondrialen Dysfunktion mit Laktatazidose, zerebraler Energiestörung und neuronalem Zellverlust (Héroux et al. 1996; Desjardins und Butterworth 2005). Der neuronale Zelltod ist möglicherweise die Folge einer oxidativen Degradation der Membranlipide aufgrund von oxidativem Stress und Inflammation in den Zellen (Pannunzio et al. 2000; Desjardins und Butterworth 2005; Hazell und Butterworth 2009). Eine Verlangsamung des Zitratzyklus infolge eines Thiamin-Mangels kann daher als möglicher Grund für Läsionen im zerebralen Gewebe angesehen werden (Bettendorff et al. 1995). In Tierversuchen waren die biochemischen Veränderungen reversibel, wenn das Thiamin-Level zeitnah wieder aufgefüllt wurde (Desjardins und Butterworth 2005).

Bei Kindern mit *SLC19A3*-Mutationen und Leigh-Phänotyp wurde von einer reduzierten Aktivität einiger Enzyme der zerebralen Glukose-Utilisation (z.B. Pyruvat-Dehydrogenase), Laktatazidose und herabgesetzte Thiamin-Konzentration in Liquor und Fibroblasten berichtet (Gerards et al. 2013; Kevelam et al. 2013; Ortigoza-Escobar et al. 2015). Diese Tatsache lässt eine Assoziation der *SLC19A3*-Mutationen mit eingeschränkter Thiamin-Transportkapazität und einer mitochondrialen Dysfunktion zu.

### **5.8 Therapie mit Biotin und Thiamin**

Die Behandlung von *SLC19A3*-defizienten Patienten mit Biotin oder Thiamin führte bereits zu divergenten Ergebnissen (Debs et al. 2010). Während einige Patienten gut auf Biotin, jedoch nicht auf Thiamin ansprachen, kam es nur zu einer Besserung der Symptomatik nach einer kombinierten Gabe von Biotin und Thiamin. Darüber hinaus reagierten manche Patienten weder auf Thiamin noch auf Biotin, wohingegen andere wiederum mit einer alleinigen Gabe von Thiamin oder Biotin erfolgreich behandelt

wurden (Ozand et al. 1998; Debs et al. 2010; Kono et al. 2009; Yamada et al. 2010; Serrano et al. 2012; Tabarki et al. 2013b; Alfadhel et al. 2013). Ein signifikanter Unterschied zwischen einer kombinierten Therapie mit Biotin und Thiamin oder einer alleinigen Biotin-Gabe wurde nicht nachgewiesen (Tabarki et al. 2015). Aus welchem Grund Biotin bei der Behandlung einer Thiamin-Transporter-Defizienz einen Benefit für die Patienten erbringt, obwohl Biotin kein Substrat des *SLC19A3* ist (Subramanian et al. 2006a), bleibt bislang unklar (Debs et al. 2010). Biotin spielt eine wichtige Rolle als prosthetische Gruppe mehrerer Carboxylasen, wie zum Beispiel der Pyruvat-Carboxylase, ein Schlüsselenzym der Gluconeogenese (Rodriguez-Melendez und Zempleni 2003). Ein Zusammenhang zwischen Biotin- und Thiamin-Stoffwechsel konnte nicht nachgewiesen werden. Jedoch wurde gezeigt, dass Biotin die Genexpression durch Histon-Biotinylierung beeinflusst und eine Biotin-Defizienz in einer substantiellen Reduktion der *SLC19A3*-Expression resultiert (Vlasova et al. 2005; Kothapalli et al. 2005). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Gabe von hochdosiertem Biotin durch eine Erhöhung der *SLC19A3*-Genexpression die Thiamin-Transportfunktion verstärken kann (Debs et al. 2010). Aus diesem Grund wurden Patienten und Wildtyp-Fibroblasten während der Exposition von Hypoxie und Azidose mit verschiedenen Biotin-Konzentrationen inkubiert. Es konnte jedoch in diesem Experiment keine Steigerung der *SLC19A3*-Genexpression weder in Patienten noch in Wildtyp-Zellen nachgewiesen werden. Die aufgestellte Hypothese kann dadurch jedoch noch nicht vollständig ausgeschlossen werden, da mögliche kleinere Genexpressions-Effekte in der angewandten Westernblot-Methode nicht registriert werden konnten.

Die Rolle einer Thiamin-Therapie bei der Behandlung einer *SLC19A3*-Defizienz wurde innerhalb dieser Arbeit beleuchtet. So lassen die Ergebnisse der kinetischen Untersuchungen der mutierten *SLC19A3*-Transporter vermuten, dass der Erfolg der Thiamin-Therapie von der jeweiligen *SLC19A3*-Mutation abhängt. Während die Gabe von Thiamin bei Patienten mit vollständiger Transporter-Dysfunktion keinen substantiellen Benefit bringt, könnte bei reduzierter Thiamin-Transportfunktion bzw. Transport-Affinität im physiologischen Bereich die Behandlung von großem Nutzen für die Patienten sein. Innerhalb dieser Arbeit konnte eine ähnliche Transportkapazität des W94R-*SLC19A3* und WT-*SLC19A3*, jedoch eine verminderte Thiamin-Affinität des W94R-*SLC19A3* nachgewiesen werden. Diese erstmals erbrachten Ergebnisse lassen auf einen Erklärungsansatz für das Ansprechen der Patienten auf eine hochdosierte Thiamin-Therapie zu. Patienten mit *SLC19A3*-Mutation brauchen eine höhere Thiamin-Konzentration im Blut als gesunde Patienten, da der mutierte Transporter auf Grund seiner niedrigen Affinität ein größeres Thiamin-Angebot benötigt, um die gleiche Menge Thiamin in die Zellen zu transportieren. Daher sollten alle Patienten mit

vermuteter *SLC19A3*-Dysfunktion simultan mit hohen Dosen von Biotin und Thiamin behandelt werden.

Weitere Erklärungsansätze gehen aus der Literatur hervor. Zum einen konnte eine Transstimulation des *SLC19A3* durch Thiamin in Transportstudien beobachtet werden (Ashokkumar et al. 2006). Dies spricht für eine Verbesserung der residualen Transporterfunktion durch Thiamin-Gaben oberhalb der physiologischen Konzentrationen. Zum anderen wurde belegt, dass physiologische Thiamin-Konzentrationen (0,1 – 2,0  $\mu\text{M}$ ) Transporter-vermittelt in die Zellen gelangen. Liegen höhere Konzentrationen vor, kann ein Teil des hydrophilen Thiamins die Zellmembran über Diffusion passieren (Depeint et al. 2006), wobei diese Passage aufgrund des hydrophilen Charakters von Thiamin eingeschränkt zu sehen ist. Aus diesem Grund sollte über einen Ersatz des therapeutisch angewandten hydrophilen Thiaminsalzes durch das Thiaminderivat Benfotiamin nachgedacht werden. In Cis-Hemmungen konnte eine Hemmwirkung von Benfotiamin auf den *SLC19A3*-Transport gezeigt werden (Ashokkumar et al. 2006). Jedoch ist bislang noch nicht geklärt, ob *SLC19A3* Benfotiamin transportiert. Das amphotere Benfotiamin wird im Gegensatz zu den wasserlöslichen Thiaminsalzen nahezu proportional zur Dosis in die Zellen aufgenommen und wesentlich schneller als Thiamin in das biologisch aktive TDP dephosphoryliert. Benfotiamin kann aufgrund seiner lipophilen Eigenschaft mittels passiver Diffusion in die Zielzellen gelangen und sich so im neuronalen Gewebe anreichern (Bitsch et al. 1991; Geyer et al. 2000). Es konnte bereits ein positiver Effekt des lipophilen Vitamin B1 in der Form des Prodrugs Benfotiamin auf funktionelle Parameter, wie der Nervenleitgeschwindigkeit, bei Ratten mit experimentell induziertem Diabetes im Vergleich zu wasserlöslichen Thiaminderivaten beobachtet werden. Die Verbesserung der Nervenleitgeschwindigkeit nach Benfotiamin-Behandlung wurde auf die bessere Bioverfügbarkeit des lipophilen Vitamin B1 zurückgeführt (Stracke et al. 2001). Des Weiteren konnten Bitsch et al. einen präventiven Effekt von Benfotiamin auf Ethanol-geschädigte Ratten-Nervenzellen aufzeigen, wohingegen kein positiver Effekt durch äquimolare Dosen hydrophiler Thiaminnitrate erzielt wurde (Bitsch et al. 1998b). Aufgrund der besseren Bioverfügbarkeit von Benfotiamin gegenüber hydrophilen Thiaminsalzen stellt das Prodrug Benfotiamin eine Therapieoption für Patienten mit komplettem Verlust der *SLC19A3*-Funktion dar.

### 6. Konklusion

Im Rahmen dieser Arbeit konnten zwei bis dahin neuartige compound-heterozygote *SLC19A3*-Mutationen identifiziert werden. Diese zeigten eine verminderte Affinität zum Thiamin (W94R) bzw. einen Komplettverlust des Thiamintransports, gekoppelt mit beeinträchtigtem Membrantargeting. Eine Exposition von Patienten-Fibroblasten gegenüber zellulären Stressfaktoren Hypoxie und Azidose konnte eine eingeschränkte Expressionssteigerung des mutierten *SLC19A3*-Transporter aufdecken, wohingegen Wildtyp-Zellen eine adäquate Reaktion im Sinne einer verstärkten *SLC19A3*-Expression zeigten. Diese eingeschränkte Reaktion kann als möglicher Auslöser erster enzephalopathischer Episoden betrachtet werden. Die Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass Mutationen im *SLC19A3*-Gen die Aktivität, die Lokalisation sowie die Induzierbarkeit von *SLC19A3* maßgeblich verändern.

Zusammenfassend lassen die Ergebnisse dieses Projektes vermuten, dass die BBGD als phänotypische Ausprägung der Verknüpfung einer herabgesetzten Thiamin-Transportfunktion und eingeschränkter Induzierbarkeit der *SLC19A3*-Expression unter zellulärem Stress zu betrachten ist. Konsekutiv resultieren *SLC19A3*-Mutationen in einer zellulären Thiamin-Defizienz, die als hauptsächlich zugrunde liegenden Pathomechanismus der BBGD anzusehen ist.

### 7. Zusammenfassung

Die BBGD gehört zur Gruppe der progredienten vitaminabhängigen Enzephalopathien. Sie ist gekennzeichnet durch subakute Episoden fortschreitender Bewusstseinsminderung, spastisch dystoner Bewegungsstörung und epileptischer Anfälle. Die neurologischen Symptome können infolge eines febrilen Infekts oder bei kataboler Stoffwechsellage auftreten und manifestieren sich überwiegend erstmals im frühen Kindesalter. Es ist bekannt, dass autosomal-rezessiv vererbte Mutationen im *SLC19A3*-Gen, das einen zerebralen Thiamin-Transporter kodiert, der BBGD zugrunde liegen. Mit einer Biotin- und/oder Thiamin-Therapie ist die Erkrankung meist dauerhaft behandelbar, jedoch in ihrer Wirkqualität uneinheitlich. Dies lässt die Hypothese zu, dass die Aktivität des *SLC19A3* durch verschiedene Mutationen in unterschiedlicher Weise beeinflusst wird. In der vorgelegten Arbeit wurde erstmals ein Zusammenhang zwischen dem genetischen Profil des *SLC19A3*-Gens und der *SLC19A3*-Aktivität sowie der *SLC19A3*-Expression in Fibroblasten unter Hypoxie- und Azidosebedingungen hergestellt. Bei einem Kollektiv von zehn Patienten mit dem klinischen Bild einer progredienten Enzephalopathie wurden DNA-Sequenzanalysen u.a. des *SLC19A3*-Gens durchgeführt. Hierbei wurden bei zwei betroffenen Brüdern zwei compound-heterozygote Mutationen nachgewiesen. Es handelte sich um die Missense-Mutation p.W94R und die Deletion p.Q393\*fs. In transient transfizierter humaner embryonaler Nierenzellkultur (MSR293) zeigten kinetische Transportmessungen der p.W94R-Mutante eine 6,5-fach niedrigere Affinität zu Thiamin als der Wildtyp. Die Q393\*fs-Variante führte zum vollständigen Funktionsverlust. Mittels indirekter Immunfluoreszenz wurde die Lokalisation von Wildtyp- und W94R-Protein in kaniner Nierenzellkultur (MDCK) an der Zelloberfläche und in intrazellulären Kompartimenten nachgewiesen. Im Gegensatz dazu zeigte sich keine Integration des p.Q393\*fs-Proteins in die Zellmembran. Pathoanatomisch zeigten sich ältere und neuere nekrotisch-hämorrhagische Läsionen im postmortalen Hirngewebe des verstorbenen Patienten und eine erheblich verringerte Expression von *SLC19A3* in Basalganglien und Kortex in Real-Time PCR und Western-Blot. *In vitro* fand sich unter Azidose- und Hypoxiebedingungen eine Hochregulation von *SLC19A3* in Kontroll-Fibroblasten, jedoch keine Steigerung der *SLC19A3*-Aktivität in Patienten-Fibroblasten. Aus diesen Ergebnissen lässt sich schlussfolgern, dass die Lokalisation, die Aktivität wie auch die Induzierbarkeit von *SLC19A3* abhängig von Mutationen im *SLC19A3*-Gen sind. Außerdem lassen die Ergebnisse vermuten, dass die BBGD die phänotypische Ausprägung einer Kombination von herabgesetzter Thiamin-Transportkapazität und fehlender Induzierbarkeit der *SLC19A3*-Expression unter zellulärem Stress darstellt.

### 8. Summary

BBGD depends to progredient vitamine-dependant encephalopathies. This disorder is characterized by subacute episodes of confusion, dystonia and epileptic seizures. Manifestation of neurological symptoms may be preceded by a febrile illness or occur during catabolic state and manifest predominantly in early childhood. BBGD ist caused by recessively inherited mutations in the *SLC19A3* gene coding a second human thiamine transporter. Administration of biotine, thiamine or both may reverse or ameliorate neurological dysfunction, although response to treatment has been inconsistent. It could be hypothesized, that the *SLC19A3* activity is influenced in a different manner by any number of mutations. A correlation between genetic profile of *SLC19A3* gene and *SLC19A3* protein activity as well as *SLC19A3* expression in fibroblasts under hypoxic and acidic conditions could be illustrated for the first time in this research study. In a collective of ten patients with progredient encephalopathy genetic analysis of a.o. *SLC19A3* gene were performed. *SLCA19A3* sequencing revealed two compound heterocygote mutations in two brothers, a missense mutation p.W94R and a deletion of exon five p.Q393\*fs. Kinetic transport measurements revealed a decreased affinity of p.W94R- compared with wildtype-*SLC19A3* in transient transfected human embryonic kidney cellculture (MSR293). The p.Q393\*fs mutation entirely abolished thiamine transport. Immunofluorescence demonstrated a localization of wildtype- and W94R-protein in canine kidney cellculture (MDCK) on the cell surface and in intracellular compartments. In contrast no integration of p.Q393\*fs-protein in cell membrane was observed. Neuropathological findings diclosed old and newer necrotic and hemorrhagic lesions in postmortal brain tissue of the deceased patient as well as greatly decreased expression of *SLC19A3* in basal ganglia and cortex in real-time PCR and Western-Blot. Under conditions of hypoxia or acidosis an upregulation of *SLC19A3* in control fibroblasts, but no increasing effect of *SLC19A3* acitivity in patients fibroblasts could be disclosed *in vitro*. Considering these results localization, activity and inducibility of *SLC19A3* depends on mutation in *SLC19A3* gene. Furthermore this trial provided evidence that BBGD phenotype ist the result of a reduced thiamine transport acitivity and impaired stress-mediated induction of *SLC19A3* expression.

## 9. Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
αKGDH	α-Ketoglutarat-Dehydrogenase
3D	3-dimensional
μ	Mikro
ABL1	Abelson murine leukemia viral oncogene homolog 1
AIS	Atypische Infantile Spasmen
ANE	akute nekrotisierende Enzephalopatie
BBGD	Biotin-abhängige Basalganglien Erkrankung
Bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
ca.	circa
Caco-2	humanen epithelialen kolorektalen Adenokarzinomzellen
cDNA	komplementäre DNS
CNV	Copy number variation
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
ddH <sub>2</sub> O	bidestilliertes Wasser
ddNTPs	Didesoxynukleosid-triphosphate
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
E.coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ER	Endoplasmatischen Reticulum
et al.	et alteri (und andere)
FAM	6-carboxyflourescein
G	Gramm
gDNA	genomische DNS
h	Stunde
HEK293-Zellen	Human Embryonic Kidney Zellen
HIF1α	hypoxia-inducible-factor 1α
HuTu-80	humanen duodenalen Adonokarzinomzellen
H1RNA-Gen	Ribonuclease P RNA Komponente H1-Gen
ISBN	Infantile bilaterale striatale Nekrose
Kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

## Abkürzungsverzeichnis

---

l	.....Liter
m	..... milli
M	.....Molar (Mol pro Liter)
MDCK-Zellen	..... Madin-Darby canine kidney Zellen
MF	..... Multiplikationsfaktor
Min	.....Minute
Mol	..... Mole (6,023 x 10 <sup>23</sup> Teilchen)
mRNA	..... messenger RNA
MW	..... Mittelwert
NeuN	..... Neuronal Nuclei
nm	..... Nanometer
MRT	..... Magnetresonanz-Tomographie
MSR-Zelle	..... GripTite™ 293 macrophage scavenger receptor Zelle
Nup62-Gen	..... Nucleoporin 62-Gen
PBS	..... Phosphate buffered saline
PCR	..... Polymerase-Kettenreaktion
PDH	..... Pyruvat-Dehydrogenase
pH	..... potentia Hydrogenii
RFC-1	..... Folat-Transporter-1
Rpm	..... Umdrehungen pro Minute (Revolutions per minute)
RT	..... Raumtemperatur
SD	..... Standardabweichung
SDS	..... Natriumdodecylsulfat (sodium dodecyl sulfalte)
Sec	..... Sekunde
SLC	..... solute carrier
SP	..... stimulating protein
TAE	..... Tris EDTA Acetat
ThTr-2	..... Thiamin-Transporter-2
TMD	..... Transmembrandomäne
Tris	..... Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TRMA	..... Thiamin-responsive megaloblastäre Anämie
UV	..... ultraviolett
VIC	..... Farbstoff, keine Angaben, Patent von ABI
WE	..... Wernicke Enzephalopathie
WLE	..... Wernicke-ähnliche Enzephalopathie
z.B.	..... zum Beispiel
[3H]Thiamin	..... radioaktiv-markiertem Thiamin hydrochlorid

## 10. Abbildungsverzeichnis

<b>Abbildung 1:</b> Charakteristischer zerebraler MRT-Befund in T2-Wichtung einer BBGD (Alfadhel et al. 2013).....	3
<b>Abbildung 2:</b> Schematische Darstellung der potenziellen Konsequenzen einer Thiamin-Defizienz (nach Desjardins und Butterworth 2005).....	9
<b>Abbildung 3:</b> Schematischer Überblick über den Transporter <i>SLC19A3</i> .....	12
<b>Abbildung 4:</b> Prinzip der TaqMan® Copy Number Quantifizierungsreaktion .....	43
<b>Abbildung 5:</b> Befunde der seriellen MRT-Diagnostik.....	52
<b>Abbildung 6:</b> Mikroskopische und makroskopische Veränderungen in verschiedenen Hirnregionen.....	54
<b>Abbildung 7:</b> Mutation c.T280C, Exon 3 - genomische DNA.....	58
<b>Abbildung 8:</b> Kopienzahlvariationsuntersuchung von Exon 5 mittels TaqMan® Copy Number Assay (Assay ID: Hs02860606_cn).....	59
<b>Abbildung 9:</b> Auftrennung des Longrange-PCR-Produkts in der Agarose-Gelelektrophorese .....	60
<b>Abbildung 10:</b> Mutation c.1173-3992_1314+41del4175, Exon 5 - genomische DNA	61
<b>Abbildung 11:</b> Mutation p.Q393*fs, Exon 5 - cDNA.....	62
<b>Abbildung 12:</b> Auswirkungen der Exon 5-Deletion .....	63
<b>Abbildung 13:</b> Familienstammbaum und topologische Darstellung von <i>SLC19A3</i> mit eingezeichneten Mutationen .....	64
<b>Abbildung 14:</b> Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte zum Nachweis der <i>SLC19A3</i> -Expression in Leukozyten.....	65
<b>Abbildung 15:</b> Agarose-Gelelektrophorese der PCR-Produkte zum Nachweis der <i>SLC19A3</i> -Expression in Fibroblasten .....	66
<b>Abbildung 16:</b> Aufnahme von Thiamin in WT- <i>SLC19A3</i> -, W94R- <i>SLC19A3</i> - und Q393*fs- <i>SLC19A3</i> -exprimierende Zellen .....	68
<b>Abbildung 17:</b> Zeitabhängiger Transport von Thiamin in WT- <i>SLC19A3</i> MSR-Zellen	69
<b>Abbildung 18:</b> Konzentrationsabhängige Thiamin-Aufnahme in WT-, W94R- und Q393*fs- <i>SLC19A3</i> MSR-Zellen .....	71
<b>Abbildung 19:</b> Nachweis der WT-, W94R- und Q393*fs- <i>SLC19A3</i> -Proteine mittels indirekter Immunzytochemie .....	73
<b>Abbildung 20:</b> Westernblot (A) und Realtime-PCR (B) der <i>SLC19A3</i> -Expression.....	74
<b>Abbildung 21:</b> Westernblot der <i>SLC19A3</i> -Expression nach Azidose- und Hypoxie-Inkubation von Patienten- und Kontroll-Fibroblasten.....	75

## 11. Tabellenverzeichnis

<b>Tabelle 1:</b> Exon/Intron-Organisation des humanen <i>SLC19A3</i> -Gens .....	55
<b>Tabelle 2:</b> Auflistung aller im Rahmen der vorgelegten Arbeit aufgedeckten Sequenzabweichungen .....	56
<b>Tabelle 3:</b> $K_m$ - und $V_{max}$ -Werte des WT-, W94R- und Q393*fs- <i>SLC19A3</i> -vermittelten Transports.. .....	71

## 12. Literaturverzeichnis

Azhubei, Ivan A.; Schmidt, Steffen; Peshkin, Leonid; Ramensky, Vasily E.; Gerasimova, Anna; Bork, Peer et al. (2010): A method and server for predicting damaging missense mutations. In: *Nat. Methods* 7 (4), S. 248–249. DOI: 10.1038/nmeth0410-248.

Alfadhel, Majid; Almontashri, Makki; Jadah, Raafat H.; Bashiri, Fahad A.; Al Rifai, Muhammad Talal; Al Shalaan, Hisham et al. (2013): Biotin-responsive basal ganglia disease should be renamed biotin-thiamine-responsive basal ganglia disease: a retrospective review of the clinical, radiological and molecular findings of 18 new cases. In: *Orphanet J Rare Dis* 8, S. 83. DOI: 10.1186/1750-1172-8-83.

Ariaey-Nejad, M. R.; Balaghi, M.; Baker, E. M.; Sauberlich, H. E. (1970): Thiamin metabolism in man. In: *Am. J. Clin. Nutr.* 23 (6), S. 764–778.

Ashkenazy, Haim; Erez, Elana; Martz, Eric; Pupko, Tal; Ben-Tal, Nir (2010): ConSurf 2010: calculating evolutionary conservation in sequence and structure of proteins and nucleic acids. In: *Nucleic Acids Res.* 38 (Web Server issue), S. W529-33. DOI: 10.1093/nar/gkq399.

Ashokkumar, Balasubramaniam; Kumar, Jeyan S.; Hecht, Gail A.; Said, Hamid M. (2009): Enteropathogenic *Escherichia coli* inhibits intestinal vitamin B1 (thiamin) uptake: studies with human-derived intestinal epithelial Caco-2 cells. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 297 (4), S. G825-33. DOI: 10.1152/ajpgi.00250.2009.

Ashokkumar, Balasubramaniam; Vaziri, Nosratola D.; Said, Hamid M. (2006): Thiamin uptake by the human-derived renal epithelial (HEK-293) cells: cellular and molecular mechanisms. In: *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 291 (4), S. F796-805. DOI: 10.1152/ajprenal.00078.2006.

Baertling, Fabian; Rodenburg, Richard J.; Schaper, Jörg; Smeitink, Jan A.; Koopman, Werner J H; Mayatepek, Ertan et al. (2013): A guide to diagnosis and treatment of Leigh syndrome. In: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* DOI: 10.1136/jnnp-2012-304426.

Basel-Vanagaite, Lina; Muncher, Liora; Straussberg, Rachel; Pasmanik-Chor, Metsada; Yahav, Michal; Rainshtein, Limor et al. (2006): Mutated nup62 causes autosomal recessive infantile bilateral striatal necrosis. In: *Ann. Neurol.* 60 (2), S. 214–222. DOI: 10.1002/ana.20902.

Bekiesinska-Figatowska, Monika; Mierzewska, Hanna; Jurkiewicz, Elżbieta (2013): Basal ganglia lesions in children and adults. In: *Eur J Radiol* 82 (5), S. 837–849. DOI: 10.1016/j.ejrad.2012.12.006.

Bettendorff, L.; Mastrogiacomo, F.; Kish, S. J.; Grisar, T. (1996): Thiamine, thiamine phosphates, and their metabolizing enzymes in human brain. In: *J. Neurochem.* 66 (1), S. 250–258.

Bettendorff, L.; Sluse, F.; Goessens, G.; Wins, P.; Grisar, T. (1995): Thiamine deficiency--induced partial necrosis and mitochondrial uncoupling in neuroblastoma cells are rapidly reversed by addition of thiamine. In: *J. Neurochem.* 65 (5), S. 2178–2184.

Bindu, P. S.; Noone, M. L.; Nalini, A.; Muthane, Uday B.; Kovoov, Jerry M E (2009): Biotin-responsive basal ganglia disease: a treatable and reversible neurological disorder of childhood. In: *J. Child Neurol.* 24 (6), S. 750–752. DOI: 10.1177/0883073808329525.

Bitsch, A.; Seipelt, M.; Rustenbeck, H. H.; Haug, B.; Nau, R. (1998a): MRT-Befunde bei der Wernicke-Enzephalopathie. In: *Nervenarzt* 69 (8), S. 707–711.

Bitsch, J.; Netzel, M.; Ziems M.; Wenisch S. (1998b): Untersuchungen zur neuroprotektiven Wirkung von Benfotiamin. In: *Int. Sympos. Stuttgart.* Thieme Verlag, S. 35–39.

Bitsch, R.; Wolf, M.; Möller, J.; Heuzeroth, L.; Grünekle, D. (1991): Bioavailability assessment of the lipophilic benfotiamine as compared to a water-soluble thiamin derivative. In: *Ann. Nutr. Metab.* 35 (5), S. 292–296.

Boulware, Michael J.; Subramanian, Veedamali S.; Said, Hamid M.; Marchant, Jonathan S. (2003): Polarized expression of members of the solute carrier SLC19A gene family of water-soluble multivitamin transporters: implications for physiological function. In: *Biochem. J.* 376 (Pt 1), S. 43–48. DOI: 10.1042/BJ20031220.

Butterworth, R. F. (1989): Effects of thiamine deficiency on brain metabolism: implications for the pathogenesis of the Wernicke-Korsakoff syndrome. In: *Alcohol Alcohol.* 24 (4), S. 271–279.

Butterworth, R. F.; Kril, J. J.; Harper, C. G. (1993): Thiamine-dependent enzyme changes in the brains of alcoholics: relationship to the Wernicke-Korsakoff syndrome. In: *Alcohol. Clin. Exp. Res.* 17 (5), S. 1084–1088.

Carl Wernicke (1881): *Lehrbuch der Gehirnkrankheiten für Aerzte und Studierende.* Kassel: Theodor Fischer (Vol. 2).

Chiossi, Giuseppe; Neri, Isabella; Cavazzuti, Milena; Basso, Gianpaolo; Facchinetti, Fabio (2006): Hyperemesis gravidarum complicated by Wernicke encephalopathy: background, case report, and review of the literature. In: *Obstet Gynecol Surv* 61 (4), S. 255–268. DOI: 10.1097/01.ogx.0000206336.08794.65.

Coe, M.; Carfagnini, F.; Tani, G.; Ambrosetto, P. (2001): Wernicke's encephalopathy in a child: case report and MR findings. In: *Pediatr Radiol* 31 (3), S. 167–168.

D'Aprile, P.; Tarantino, A.; Santoro, N.; Carella, A. (2000): Wernicke's encephalopathy induced by total parenteral nutrition in patient with acute leukaemia: unusual

involvement of caudate nuclei and cerebral cortex on MRI. In: *Neuroradiology* 42 (10), S. 781–783.

Debs, Rabab; Depienne, Christel; Rastetter, Agnès; Bellanger, Agnès; Degos, Bertrand; Galanaud, Damien et al. (2010): Biotin-responsive basal ganglia disease in ethnic Europeans with novel SLC19A3 mutations. In: *Arch. Neurol.* 67 (1), S. 126–130. DOI: 10.1001/archneurol.2009.293.

Depeint, Flore; Bruce, W. Robert; Shangari, Nandita; Mehta, Rhea; O'Brien, Peter J. (2006): Mitochondrial function and toxicity: role of the B vitamin family on mitochondrial energy metabolism. In: *Chem. Biol. Interact.* 163 (1-2), S. 94–112. DOI: 10.1016/j.cbi.2006.04.014.

Desjardins, Paul; Butterworth, Roger F. (2005): Role of mitochondrial dysfunction and oxidative stress in the pathogenesis of selective neuronal loss in Wernicke's encephalopathy. In: *Mol. Neurobiol.* 31 (1-3), S. 17–25. DOI: 10.1385/MN:31:1-3:017.

Diaz, G. A.; Banikazemi, M.; Oishi, K.; Desnick, R. J.; Gelb, B. D. (1999): Mutations in a new gene encoding a thiamine transporter cause thiamine-responsive megaloblastic anaemia syndrome. In: *Nat. Genet.* 22 (3), S. 309–312. DOI: 10.1038/10385.

DiMauro, S. (1999): Mitochondrial encephalomyopathies: back to Mendelian genetics. In: *Ann. Neurol.* 45 (6), S. 693–694.

Distelmaier, Felix; Huppke, Peter; Pieperhoff, Peter; Amunts, Katrin; Schaper, Jörg; Morava, Eva et al. (2014): Biotin-responsive Basal Ganglia disease: a treatable differential diagnosis of Leigh syndrome. In: *JIMD reports* 13, S. 53–57. DOI: 10.1007/8904\_2013\_271.

Dixon, K. H.; Lanpher, B. C.; Chiu, J.; Kelley, K.; Cowan, K. H. (1994): A novel cDNA restores reduced folate carrier activity and methotrexate sensitivity to transport deficient cells. In: *J. Biol. Chem.* 269 (1), S. 17–20.

Dutta, B.; Huang, W.; Molero, M.; Kekuda, R.; Leibach, F. H.; Devoe, L. D. et al. (1999): Cloning of the human thiamine transporter, a member of the folate transporter family. In: *J. Biol. Chem.* 274 (45), S. 31925–31929.

El-Hajj, T. I.; Karam, P. E.; Mikati, M. A. (2008): Biotin-responsive basal ganglia disease: case report and review of the literature. In: *Neuropediatrics* 39 (5), S. 268–271. DOI: 10.1055/s-0028-1128152.

Eudy, J. D.; Spiegelstein, O.; Barber, R. C.; Wlodarczyk, B. J.; Talbot, J.; Finnell, R. H. (2000): Identification and characterization of the human and mouse SLC19A3 gene: a novel member of the reduced folate family of micronutrient transporter genes. In: *Mol. Genet. Metab.* 71 (4), S. 581–590. DOI: 10.1006/mgme.2000.3112.

Fassone, Elisa; Wedatilake, Yehani; DeVile, Catherine J.; Chong, W. Kling; Carr, Lucinda J.; Rahman, Shamima (2013): Treatable Leigh-like encephalopathy presenting in adolescence. In: *BMJ case reports* 2013, S. 200838.

Fleming, J. C.; Steinkamp, M. P.; Kawatsuji, R.; Tartaglino, E.; Pinkus, J. L.; Pinkus, G. S. et al. (2001): Characterization of a murine high-affinity thiamine transporter, Slc19a2. In: *Mol. Genet. Metab.* 74 (1-2), S. 273–280. DOI: 10.1006/mgme.2001.3241.

Fleming, J. C.; Tartaglino, E.; Steinkamp, M. P.; Schorderet, D. F.; Cohen, N.; Neufeld, E. J. (1999): The gene mutated in thiamine-responsive anaemia with diabetes and deafness (TRMA) encodes a functional thiamine transporter. In: *Nat. Genet.* 22 (3), S. 305–308. DOI: 10.1038/10379.

Ganapathy, Vadivel; Smith, Sylvia B.; Prasad, Puttur D. (2004): SLC19: the folate/thiamine transporter family. In: *Pflugers Arch.* 447 (5), S. 641–646. DOI: 10.1007/s00424-003-1068-1.

Gerards, Mike; Kamps, Rick; van Oevelen, Jo; Boesten, Iris; Jongen, Eveline; Koning, Bart de et al. (2013): Exome sequencing reveals a novel Moroccan founder mutation in SLC19A3 as a new cause of early-childhood fatal Leigh syndrome. In: *Brain* 136 (Pt 3), S. 882–890. DOI: 10.1093/brain/awt013.

Geyer, J.; Netzel, M.; Bitsch, I.; Frank, T.; Bitsch, R.; Krämer, K.; Hoppe, P. P. (2000): Bioavailability of water- and lipid-soluble thiamin compounds in broiler chickens. In: *Int J Vitam Nutr Res* 70 (6), S. 311–316.

Hanefeld, F. (1990): Progrediente Enzephalopathie-Syndrom, Multiple Sklerose, HIV-Infektion, Benigne fokale Epilepsien. [15. Jahrestagung der Gesellschaft für Neuropädiatrie in Göttingen 1989]. Berlin [u.a.]: Springer (Aktuelle Neuropädiatrie., 1989).

Harper, C. G.; Giles, M.; Finlay-Jones, R. (1986): Clinical signs in the Wernicke-Korsakoff complex: a retrospective analysis of 131 cases diagnosed at necropsy. In: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 49 (4), S. 341–345.

Hazell, Alan S.; Butterworth, Roger F. (2009): Update of cell damage mechanisms in thiamine deficiency: focus on oxidative stress, excitotoxicity and inflammation. In: *Alcohol Alcohol.* 44 (2), S. 141–147. DOI: 10.1093/alcalc/agn120.

Hediger, Matthias A.; Clémenton, Benjamin; Burrier, Robert E.; Bruford, Elspeth A. (2013): The ABCs of membrane transporters in health and disease (SLC series): introduction. In: *Mol. Aspects Med.* 34 (2-3), S. 95–107. DOI: 10.1016/j.mam.2012.12.009.

Hediger, Matthias A.; Romero, Michael F.; Peng, Ji-Bin; Rolfs, Andreas; Takanaga, Hitomi; Bruford, Elspeth A. (2004): The ABCs of solute carriers: physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport

proteinsIntroduction. In: Pflugers Arch. 447 (5), S. 465–468. DOI: 10.1007/s00424-003-1192-y.

Heid, C. A.; Stevens, J.; Livak, K. J.; Williams, P. M. (1996): Real time quantitative PCR. In: Genome Res. 6 (10), S. 986–994.

Henderson, G. B.; Zevely, E. M. (1983): Structural requirements for anion substrates of the methotrexate transport system in L1210 cells. In: Arch. Biochem. Biophys. 221 (2), S. 438–446.

Héroux, M.; Raghavendra Rao, V L; Lavoie, J.; Richardson, J. S.; Butterworth, R. F. (1996): Alterations of thiamine phosphorylation and of thiamine-dependent enzymes in Alzheimer's disease. In: Metab Brain Dis 11 (1), S. 81–88.

Höglund, Pär J.; Nordström, Karl J V; Schiöth, Helgi B.; Fredriksson, Robert (2011): The solute carrier families have a remarkably long evolutionary history with the majority of the human families present before divergence of Bilaterian species. In: Mol. Biol. Evol. 28 (4), S. 1531–1541. DOI: 10.1093/molbev/msq350.

Houdayer, Claude (2011): In silico prediction of splice-affecting nucleotide variants. In: Methods Mol. Biol. 760, S. 269–281. DOI: 10.1007/978-1-61779-176-5\_17.

Karki, Roshan; Pandya, Deep; Elston, Robert C.; Ferlini, Cristiano (2015): Defining "mutation" and "polymorphism" in the era of personal genomics. In: BMC medical genomics 8, S. 37. DOI: 10.1186/s12920-015-0115-z.

Kevelam, Sietske H.; Bugiani, Marianna; Salomons, Gajja S.; Feigenbaum, Annette; Blaser, Susan; Prasad, Chitra et al. (2013): Exome sequencing reveals mutated SLC19A3 in patients with an early-infantile, lethal encephalopathy. In: Brain 136 (Pt 5), S. 1534–1543. DOI: 10.1093/brain/awt054.

Kohrogi, Kensaku; Imagawa, Eri; Muto, Yuichiro; Hirai, Katsuki; Migita, Masahiro; Mitsubuchi, Hiroshi et al. (2015): Biotin-responsive basal ganglia disease: a case diagnosed by whole exome sequencing. In: Journal of human genetics 60 (7), S. 381–385. DOI: 10.1038/jhg.2015.35.

Kominsky, Douglas J.; Campbell, Eric L.; Colgan, Sean P. (2010): Metabolic shifts in immunity and inflammation. In: J. Immunol. 184 (8), S. 4062–4068. DOI: 10.4049/jimmunol.0903002.

Kono, Satoshi; Miyajima, Hiroaki; Yoshida, Kenichi; Togawa, Akashi; Shirakawa, Kentaro; Suzuki, Hitoshi (2009): Mutations in a thiamine-transporter gene and Wernicke's-like encephalopathy. In: N. Engl. J. Med. 360 (17), S. 1792–1794. DOI: 10.1056/NEJMc0809100.

Kornreich, Liora; Bron-Harlev, Efrat; Hoffmann, Chen; Schwarz, Michael; Konen, Osnat; Schoenfeld, Tommy et al. (2005): Thiamine deficiency in infants: MR findings in the brain. In: AJNR Am J Neuroradiol 26 (7), S. 1668–1674.

Kothapalli, Nagarama; Camporeale, Gabriela; Kueh, Alice; Chew, Yap C.; Oommen, Anna M.; Griffin, Jacob B.; Zemleni, Janos (2005): Biological functions of biotinylated histones. In: *J. Nutr. Biochem.* 16 (7), S. 446–448. DOI: 10.1016/j.jnutbio.2005.03.025.

Kril, J. J. (1996): Neuropathology of thiamine deficiency disorders. In: *Metab Brain Dis* 11 (1), S. 9–17.

Labay, V.; Raz, T.; Baron, D.; Mandel, H.; Williams, H.; Barrett, T. et al. (1999): Mutations in SLC19A2 cause thiamine-responsive megaloblastic anaemia associated with diabetes mellitus and deafness. In: *Nat. Genet.* 22 (3), S. 300–304. DOI: 10.1038/10372.

Lal, Dennis; Becker, Kerstin; Motameny, Susanne; Altmüller, Janine; Thiele, Holger; Nürnberg, Peter et al. (2013): Homozygous missense mutation of NDUFV1 as the cause of infantile bilateral striatal necrosis. In: *Neurogenetics* 14 (1), S. 85–87. DOI: 10.1007/s10048-013-0355-z.

Leevy, C. M. (1982): Thiamin deficiency and alcoholism. In: *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 378, S. 316–326.

LEIGH, D. (1951): Subacute necrotizing encephalomyelopathy in an infant. In: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 14 (3), S. 216–221.

Lonsdale, Derrick (2006): A review of the biochemistry, metabolism and clinical benefits of thiamin(e) and its derivatives. In: *Evid Based Complement Alternat Med* 3 (1), S. 49–59. DOI: 10.1093/ecam/nek009.

LOWRY, O. H.; ROSEBROUGH, N. J.; FARR, A. L.; RANDALL, R. J. (1951): Protein measurement with the Folin phenol reagent. In: *J. Biol. Chem.* 193 (1), S. 265–275.

Majmundar, Amar J.; Wong, Waihay J.; Simon, M. Celeste (2010): Hypoxia-inducible factors and the response to hypoxic stress. In: *Mol. Cell* 40 (2), S. 294–309. DOI: 10.1016/j.molcel.2010.09.022.

Marco, Elysa J.; Anderson, Jane E.; Neilson, Derek E.; Strober, Jonathan B. (2010): Acute necrotizing encephalopathy in 3 brothers. In: *Pediatrics* 125 (3), S. e693-8. DOI: 10.1542/peds.2009-1984.

Mayo, Ping; Hartshorne, Toinette; Li, Kelly; McMunn-Gibson, Chara; Spencer, Kylee; Schnetz-Boutaud, Nathalie (2010): CNV analysis using TaqMan copy number assays. In: *Curr Protoc Hum Genet* Chapter 2, S. Unit2.13. DOI: 10.1002/0471142905.hg0213s67.

Mullen, R. J.; Buck, C. R.; Smith, A. M. (1992): NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. In: *Development* 116 (1), S. 201–211.

Müller-Esterl, Werner (2004): Biochemie. Eine Einführung für Mediziner und Naturwissenschaftler. 1. Aufl. München, Heidelberg: Elsevier, Spektrum, Akad. Verl.

Nabokina, Svetlana M.; Said, Hamid M. (2004): Characterization of the 5'-regulatory region of the human thiamin transporter SLC19A3: in vitro and in vivo studies. In: Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol. 287 (4), S. G822-9. DOI: 10.1152/ajpgi.00234.2004.

Neilson, Derek E.; Adams, Mark D.; Orr, Caitlin M D; Schelling, Deborah K.; Eiben, Robert M.; Kerr, Douglas S. et al. (2009): Infection-triggered familial or recurrent cases of acute necrotizing encephalopathy caused by mutations in a component of the nuclear pore, RANBP2. In: Am. J. Hum. Genet. 84 (1), S. 44–51. DOI: 10.1016/j.ajhg.2008.12.009.

Neufeld, E. J.; Fleming, J. C.; Tartaglino, E.; Steinkamp, M. P. (2001): Thiamine-responsive megaloblastic anemia syndrome: a disorder of high-affinity thiamine transport. In: Blood Cells Mol. Dis. 27 (1), S. 135–138. DOI: 10.1006/bcmd.2000.0356.

Okumura, Akihisa; Mizuguchi, Masashi; Kidokoro, Hiroyuki; Tanaka, Manabu; Abe, Sinpei; Hosoya, Mitsuaki et al. (2009): Outcome of acute necrotizing encephalopathy in relation to treatment with corticosteroids and gammaglobulin. In: Brain Dev. 31 (3), S. 221–227. DOI: 10.1016/j.braindev.2008.03.005.

Ortigoza-Escobar, Juan Darío; Molero-Luis, Marta; Arias, Angela; Oyarzabal, Alfonso; Darín, Niklas; Serrano, Mercedes et al. (2015): Free-thiamine is a potential biomarker of thiamine transporter-2 deficiency: a treatable cause of Leigh syndrome. In: Brain : a journal of neurology. DOI: 10.1093/brain/awv342.

Ortigoza-Escobar, Juan Darío; Serrano, Mercedes; Molero, Marta; Oyarzabal, Alfonso; Rebollo, Mónica; Muchart, Jordi et al. (2014): Thiamine transporter-2 deficiency: outcome and treatment monitoring. In: Orphanet journal of rare diseases 9, S. 92. DOI: 10.1186/1750-1172-9-92.

Ozand, P. T.; Gascon, G. G.; Al Essa, M.; Joshi, S.; Al Jishi, E.; Bakheet, S. et al. (1998): Biotin-responsive basal ganglia disease: a novel entity. In: Brain 121 (Pt 7), S. 1267–1279.

Pannunzio, P.; Hazell, A. S.; Pannunzio, M.; Rao, K. V.; Butterworth, R. F. (2000): Thiamine deficiency results in metabolic acidosis and energy failure in cerebellar granule cells: an in vitro model for the study of cell death mechanisms in Wernicke's encephalopathy. In: J. Neurosci. Res. 62 (2), S. 286–292.

Pérez-Dueñas, Belén; Serrano, Mercedes; Rebollo, Mónica; Muchart, Jordi; Gargallo, Eva; Dupuits, Celine; Artuch, Rafael (2013): Reversible lactic acidosis in a newborn with thiamine transporter-2 deficiency. In: Pediatrics 131 (5), S. e1670-5. DOI: 10.1542/peds.2012-2988.

Porter, F. S.; Rogers, L. E.; Sidbury, J. B. (1969): Thiamine-responsive megaloblastic anemia. In: *J. Pediatr.* 74 (4), S. 494–504.

Rajgopal, A.; Edmondson, A.; Goldman, I. D.; Zhao, R. (2001): SLC19A3 encodes a second thiamine transporter ThTr2. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1537 (3), S. 175–178. DOI: 10.1016/S0925-4439(01)00073-4.

Raz, T.; Labay, V.; Baron, D.; Szargel, R.; Anbinder, Y.; Barrett, T. et al. (2000): The spectrum of mutations, including four novel ones, in the thiamine-responsive megaloblastic anemia gene SLC19A2 of eight families. In: *Hum. Mutat.* 16 (1), S. 37–42. DOI: 10.1002/1098-1004(200007)16:1<37::AID-HUMU7>3.0.CO;2-9.

Reidling, Jack C.; Lambrecht, Nils; Kassir, Mohammad; Said, Hamid M. (2010): Impaired intestinal vitamin B1 (thiamin) uptake in thiamin transporter-2-deficient mice. In: *Gastroenterology* 138 (5), S. 1802–1809. DOI: 10.1053/j.gastro.2009.10.042.

Reidling, Jack C.; Nabokina, Svetlana M.; Balamurugan, Krishnaswamy; Said, Hamid M. (2006): Developmental maturation of intestinal and renal thiamin uptake: studies in wild-type and transgenic mice carrying human THTR-1 and 2 promoters. In: *J. Cell. Physiol.* 206 (2), S. 371–377. DOI: 10.1002/jcp.20492.

Reidling, Jack C.; Said, Hamid M. (2005): Adaptive regulation of intestinal thiamin uptake: molecular mechanism using wild-type and transgenic mice carrying hTHTR-1 and -2 promoters. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288 (6), S. G1127-34. DOI: 10.1152/ajpgi.00539.2004.

Rodriguez-Melendez, Rocio; Zemleni, Janos (2003): Regulation of gene expression by biotin (review). In: *J. Nutr. Biochem.* 14 (12), S. 680–690.

Said, H. M.; Ortiz, A.; Kumar, C. K.; Chatterjee, N.; Dudeja, P. K.; Rubin, S. (1999): Transport of thiamine in human intestine: mechanism and regulation in intestinal epithelial cell model Caco-2. In: *Am. J. Physiol.* 277 (4 Pt 1), S. C645-51.

Said, Hamid M. (2011): Intestinal absorption of water-soluble vitamins in health and disease. In: *Biochem. J.* 437 (3), S. 357–372. DOI: 10.1042/BJ20110326.

Said, Hamid M.; Balamurugan, Krishnaswamy; Subramanian, Veendamali S.; Marchant, Jonathan S. (2004): Expression and functional contribution of hTHTR-2 in thiamin absorption in human intestine. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 286 (3), S. G491-8. DOI: 10.1152/ajpgi.00361.2003.

Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12), S. 5463–5467.

Schänzer, Anne; Döring, Barbara; Ondruschek, Michelle; Goos, Sarah; Garvalov, Boyan K.; Geyer, Joachim et al. (2014): Stress-induced upregulation of SLC19A3 is impaired in biotin-thiamine-responsive basal ganglia disease. In: *Brain pathology (Zurich, Switzerland)* 24 (3), S. 270–279. DOI: 10.1111/bpa.12117.

Serrano, Mercedes; Rebollo, Mónica; Depienne, Christel; Rastetter, Agnès; Fernández-Álvarez, Emilio; Muchart, Jordi et al. (2012): Reversible generalized dystonia and encephalopathy from thiamine transporter 2 deficiency. In: *Mov. Disord.* 27 (10), S. 1295–1298. DOI: 10.1002/mds.25008.

Sriram, Krishnan; Manzanares, William; Joseph, Kimberly (2012): Thiamine in nutrition therapy. In: *Nutr Clin Pract* 27 (1), S. 41–50. DOI: 10.1177/0884533611426149.

Stracke, H.; Hammes, H. P.; Werkmann, D.; Mavrakis, K.; Bitsch, I.; Netzel, M. et al. (2001): Efficacy of benfotiamine versus thiamine on function and glycation products of peripheral nerves in diabetic rats. In: *Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes* 109 (6), S. 330–336. DOI: 10.1055/s-2001-17399.

Straussberg, R.; Shorer, Z.; Weitz, R.; Basel, L.; Kornreich, L.; Corie, C. I. et al. (2002): Familial infantile bilateral striatal necrosis: clinical features and response to biotin treatment. In: *Neurology* 59 (7), S. 983–989.

Stromme, Petter; Kanavin, Oivind Juris; Abdelnoor, Michael; Woldseth, Berit; Rootwelt, Terje; Diderichsen, Jorgen et al. (2007): Incidence rates of progressive childhood encephalopathy in Oslo, Norway: a population based study. In: *BMC Pediatr* 7, S. 25. DOI: 10.1186/1471-2431-7-25.

Subramanian, V. S.; Marchant, J. S.; Said, H. M.; Subramanian, Veedamali S.; Marchant, Jonathan S.; Said, Hamid M. (2006a): Biotin-responsive basal ganglia disease-linked mutations inhibit thiamine transport via hTHTR2: biotin is not a substrate for hTHTR2. In: *AJP: Cell Physiology* 291 (5), S. C851–C859 // C851-9. DOI: 10.1152/ajpcell.00105.2006.

Subramanian, Veedamali S.; Marchant, Jonathan S.; Said, Hamid M. (2006b): Targeting and trafficking of the human thiamine transporter-2 in epithelial cells. In: *J. Biol. Chem.* 281 (8), S. 5233–5245. DOI: 10.1074/jbc.M512765200.

Subramanian, Veedamali S.; Subramanya, Sandeep B.; Said, Hamid M. (2012): Relative contribution of THTR-1 and THTR-2 in thiamin uptake by pancreatic acinar cells: studies utilizing Slc19a2 and Slc19a3 knockout mouse models. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 302 (5), S. G572-8. DOI: 10.1152/ajpgi.00484.2011.

Subramanya, Sandeep B.; Subramanian, Veedamali S.; Said, Hamid M. (2010): Chronic alcohol consumption and intestinal thiamin absorption: effects on physiological and molecular parameters of the uptake process. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 299 (1), S. G23-31. DOI: 10.1152/ajpgi.00132.2010.

Sweet, Rebecca; Paul, Amber; Zastre, Jason (2010): Hypoxia induced upregulation and function of the thiamine transporter, SLC19A3 in a breast cancer cell line. In: *Cancer Biol. Ther.* 10 (11), S. 1101–1111. DOI: 10.4161/cbt.10.11.13444.

Sweet, Rebecca L.; Zastre, Jason A. (2013): HIF1- $\alpha$ -mediated gene expression induced by vitamin B1 deficiency. In: International journal for vitamin and nutrition research. Internationale Zeitschrift für Vitamin- und Ernährungsforschung. Journal international de vitaminologie et de nutrition 83 (3), S. 188–197.

Tabarki, Brahim; Alfadhel, Majid; AlShahwan, Saad; Hundallah, Khaled; AlShafi, Shatha; AlHashem, Amel (2015): Treatment of biotin-responsive basal ganglia disease: Open comparative study between the combination of biotin plus thiamine versus thiamine alone. In: European journal of paediatric neurology : EJPN : official journal of the European Paediatric Neurology Society 19 (5), S. 547–552. DOI: 10.1016/j.ejpn.2015.05.008.

Tabarki, Brahim; Al-Shafi, Shatha; Al-Shahwan, Saad; Azmat, Zeeshan; Al-Hashem, Amel; Al-Adwani, Nawal et al. (2013a): Biotin-responsive basal ganglia disease revisited: clinical, radiologic, and genetic findings. In: Neurology 80 (3), S. 261–267. DOI: 10.1212/WNL.0b013e31827deb4c.

Tabarki, Brahim; Al-Sheikh, Fahad; Al-Shahwan, Saad; Zuccoli, Guilio (2013b): Bilateral external ophthalmoplegia in biotin-responsive basal ganglia disease. In: J. Pediatr. 162 (6), S. 1291–1292. DOI: 10.1016/j.jpeds.2012.12.069.

Thomson, Allan D.; Cook, Christopher C H; Touquet, Robin; Henry, John A. (2002): The Royal College of Physicians report on alcohol: guidelines for managing Wernicke's encephalopathy in the accident and Emergency Department. In: Alcohol Alcohol. 37 (6), S. 513–521.

Vlasova, Tatyana I.; Stratton, Shawna L.; Wells, Amanda M.; Mock, Nell I.; Mock, Donald M. (2005): Biotin deficiency reduces expression of SLC19A3, a potential biotin transporter, in leukocytes from human blood. In: J. Nutr. 135 (1), S. 42–47.

Yamada, Kenichiro; Miura, Kiyokuni; Hara, Kenju; Suzuki, Motomasa; Nakanishi, Keiko; Kumagai, Toshiyuki et al. (2010): A wide spectrum of clinical and brain MRI findings in patients with SLC19A3 mutations. In: BMC Med. Genet. 11, S. 171. DOI: 10.1186/1471-2350-11-171.

Zeng, Wen-Qi; Al-Yamani, Eiman; Acierno, James S.; Slaugenhaupt, Susan; Gillis, Tammy; MacDonald, Marcy E. et al. (2005): Biotin-responsive basal ganglia disease maps to 2q36.3 and is due to mutations in SLC19A3. In: Am. J. Hum. Genet. 77 (1), S. 16–26. DOI: 10.1086/431216.

Zhao, R.; Gao, F.; Wang, Y.; Diaz, G. A.; Gelb, B. D.; Goldman, I. D. (2001): Impact of the reduced folate carrier on the accumulation of active thiamin metabolites in murine leukemia cells. In: J. Biol. Chem. 276 (2), S. 1114–1118. DOI: 10.1074/jbc.M007919200.

Zhao, Rongbao; Goldman, I. David (2003): Resistance to antifolates. In: Oncogene 22 (47), S. 7431–7457. DOI: 10.1038/sj.onc.1206946.

Zhao, Rongbao; Goldman, I. David (2013): Folate and thiamine transporters mediated by facilitative carriers (SLC19A1-3 and SLC46A1) and folate receptors. In: *Mol. Aspects Med.* 34 (2-3), S. 373–385. DOI: 10.1016/j.mam.2012.07.006.

Zuccoli, Giulio; Siddiqui, Nasir; Bailey, Ariel; Bartoletti, Stefano C. (2010): Neuroimaging findings in pediatric Wernicke encephalopathy: a review. In: *Neuroradiology* 52 (6), S. 523–529. DOI: 10.1007/s00234-009-0604-x.

## 13. Anhang

Tabelle A1: Unterschiede zwischen den klinischen Unterformen bei *SLC19A3*-Mutationen

	BBGD	WLE	AIS	Leigh-Syndrom
<b>Klinik</b>				
Ophisthotonus	-	-	+	+
Ophthalmoplegie, Ptosis, Nystagmus	-	+	-	+
Ataxie	-	+	-	-
Epilepsie	+	+	+	+
Dysarthrie, Dysphagie	+	-	+	-
Extrapyramidalm otorische Symptome	+	-	-	-
Pyramidenbahn- zeichen	-	-	+	+
Psycho- motorische Retardierung und Verwirrtheit	+	+	+	+
Respiratorische Insuffizienz	-	-	-	+
<b>Neuro- radiologische Auffälligkeiten</b>				
Basalganglien	+	-	+	+
Thalamus	-	+	-	+
Hirnstamm	-	-	-	+
Kortikale Atrophie	+	-	+	+
Zerebellum	-	-	-	+
diffus	-	-	-	+
<b>Therapie – gute Wirksamkeit von:</b>			keine therapeutische Gabe von Biotin oder Thiamin	
Thiamin alleine	-	+		-

## Anhang

Biotin und Thiamin	+	Keine kombinierte Gabe erfolgt	erfolgt	-
<b>Outcome</b>				
Normale Entwicklung, gesund	+	+	-	-
Milde Retardierung und Dystonie	+	-	-	-
Schwere Retardierung und Dystonie	-	-	+	-
Tod	-	-	+	+
<b>Manifestationsalter</b>				
Säuglingsalter	+	-	+	+
Kindheit	+	-	-	-
Adeoleszenz	+	+	-	-
<b>Laktat im Blut</b>	Normal	Normal	Normal	Normal – 8,6mmol/l
<b>Mutation</b>	c.1264A>G c.68G>T c.980-14 A>G c.74dupT	c.218A>G c.958G>C	c.958G>C	c.20C>A c.68G>T c.68G>T r.1173_1314del c.895-_925del c.541T>C c.1154T>G c.527C>A c.507C>G c.1332C>G

BBGD = Biotin-responsive Basalganglien Erkrankung; WLE = Wernicke-ähnliche Enzephalopathie; AIS = Atypische Infantile Spasmen  
(Ozand et al. 1998; Debs et al. 2010; Kono et al. 2009; Yamada et al. 2010; Gerards et al. 2013; Kevelam et al. 2013)

**Tabelle A2: Primerkombinationen, die zum Nachweis der Expression von *SLC19A3* in Leukozyten und Fibroblasten eingesetzt wurden**

<b>Vorwärts-Primer</b>	<b>Rückwärts-Primer</b>	<b>Länge des PCR-Produkts</b>
3b-F-cDNA	6-R-cDNA	~890 Bp
3b-F-cDNA	Gr-R-cDNA	~750 Bp
P-F-cDNA	6-R-cDNA	~760 Bp
P-F-cDNA	Gr-R-cDNA	~610 Bp
5-F-cDNA	6-R-cDNA	~250 Bp
5-F-cDNA	Gr-R-cDNA	~150 Bp
ABL-F	ABL-R	~235 Bp

## 14. Publikationsverzeichnis

Schänzer A, Döring B, Ondrouschek M, Goos S, Garvalov BK, Geyer J, Acker T, Neubauer B, Hahn A (2014) Stress-induced upregulation of SLC19A3 is impaired in biotin-thiamine-responsive basal ganglia disease. Brain pathol. 24(3):270-279

Ondrouschek M, Hahn A, Neubauer BA (2012) Zerebrale Thiamin-Transporter-Defizienz (SLC19A3) als seltene behandelbare Ursache einer akuten nekrotisierenden Enzephalopathie. Neuropediatrics 43(2):82 – Kongressbeitrag zur Jahrestagung der GNP 2012

Ondrouschek M, Hahn A, Neubauer BA (2012) Zerebrale Thiamin-Transporter-Defizienz (SLC19A3) als seltene behandelbare Ursache einer akuten nekrotisierenden Enzephalopathie. Kongressbeitrag zur Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen

Hahn A, Schänzer A, Garvalov B, Ondrouschek M, Goos S, Döring B, Geyer J, Acker T, Neubauer BA (2014) Auslösung enzephalopathischer Krisen bei Biotin-Thiamin-responsiver Basalganglienerkrankung durch verminderte Stress-induzierte Hochregulation von SLC19A3, Kongressbeitrag zur Jahrestagung der Arbeitsgemeinschaft für Pädiatrische Stoffwechselstörungen

Schänzer A, Döring B, Ondrouschek M, Goos S, Garvalov B, Geyer J, Acker T, Neubauer BA, Hahn A (2013) SLC19A3 expression and function is altered in Wernicke-like encephalopathy - Kongressbeitrag zur Jahrestagung der DGNN 2013

## 15. Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

---

Ort, Datum

---

Unterschrift

### 16. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die die Entstehung dieser Arbeit möglich gemacht haben.

Prof. Dr. Bernd A. Neubauer gilt mein besonderer Dank zum einen für die Überlassung des Themas und zum anderen für die engagierte Betreuung und Lehre. Prof. Dr. Neubauer konnte mit seiner Wissensvermittlung mein Interesse an dem Fachgebiet der Neuropädiatrie fördern.

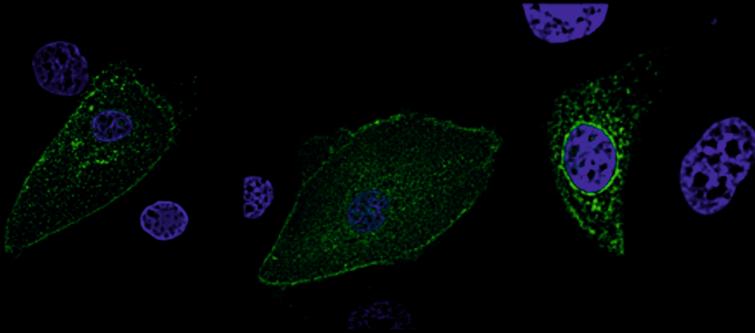
Dem Leiter des Instituts für Pharmakologie und Toxikologie der Universität Giessen, Prof. Dr. Joachim Geyer danke ich für die großzügige Erlaubnis, einen großen Teil meiner Arbeit in den Laborräumen seines Instituts durchzuführen. Zusätzlich danke ich ihm für die nette und unkomplizierte Zusammenarbeit. Mein Dank gilt auch Anita Neubauer und Regina Leidolf für die Einführung in die molekularbiologischen Labortechniken.

Ebenso möchte ich mich bei Prof. Dr. Till Acker, Frau Dr. Anne Schänzer und Herr Dr. Boyan Garvalov aus dem Institut für Neuropathologie der Univeristätsklinik Giessen für die Zusammenarbeit bedanken. Ich danke auch für die von ihnen zur Verfügung gestellten neuropathologischen Forschungsergebnisse.

Zutiefst danke ich Frau Dr. Barbara Döring, die mich nicht nur in die Labortechniken einführte, sondern mir stets mit Kompetenz und Geduld bei allen Fragen und Problemen zur Seite stand und mich bei der Versuchsdurchführung unterstützte. Ich danke ihr nebst der wissenschaftlichen Unterstützung auch für die freundschaftliche Beziehung, die in der gemeinsamen Zeit im Labor entstand. Ich wünsche ihr für ihre wissenschaftliche und private Zukunft Glück und Freude.

Ich danke ebenfalls Frau Stefanie Garkisch für die Einarbeitung in die molekulargenetischen Techniken.

Mit größter Dankbarkeit und Liebe wende ich mich abschließend an meinen Ehemann David und meine Eltern, die mich bei allem begleiten, die mich unterstützen, mich verstehen, mir Einhalt gebieten, mich auffangen und aufmuntern, die mich lieben. Danke.



*édition scientifique*  
**VVB LAUFERSWEILER VERLAG**

VVB LAUFERSWEILER VERLAG  
STAUFENBERGRING 15  
D-35396 GIESSEN

Tel: 0641-5599888 Fax: -5599890  
redaktion@doktorverlag.de  
www.doktorverlag.de

ISBN: 978-3-8359-6486-0



9 783835 196486 0