

Abstract

Autism Spectrum Disorder (ASD) is a complex neurodevelopmental disorder with dysfunction of social interaction and communication. A hitherto unknown complex-genetic principle of origin probably underlies ASD. So far, more than 100 candidate genes were identified in the literature. Patients affected with the monogenic Timothy syndrome show multiorgan dysfunction accompanied with autism. This single gene disorder serves as a model disease for ASD. Here, a point mutation in a highly-conserved region of the pore-forming subunit of the voltage-dependent calcium channel $Ca_v1.2$ gene (CACNA1C) results in incomplete inactivation of the channel. Functionally similar biophysical effects can be induced by structural variation of the auxiliary $\beta1$ - and $\beta2$ -subunits of the voltage-dependent calcium channels (Ca_v). Supported by findings in a meta-analysis of linkage data of ASD, a function-based candidate gene approach was performed to investigate the role of the Ca_v $\beta2$ -subunit gene (CACNB2) with ASD. It is hypothesized that sequence variations in CACNB2, which result in structural alterations of the protein and therefore alter the inactivation behavior of voltage-dependent calcium channels, could phenocopy the Timothy syndrome mutation in CACNA1C.

In a family-based association study of 444 families no association of CACNB2 with ASD could be detected. A sequence analysis for mutation detection was performed by sequencing all exons of CACNB2 and flanking intronic regions in 155 patients with ASD. Three non-synonymous sequence variations were detected in cases, but not in 259 unaffected controls. The mutations were heterozygote and each occurred once. In a cosegregation analysis they showed an incomplete cosegregation and low penetrance. All three mutations are localized at highly-conserved regions of the protein and could possibly result in altered protein function; additionally, one amino acid substitution results highly probable in a post-translational modification by phosphorylation. Since the effect of phosphorylation of the Ca_v . $\beta2$ -subunit could be shown to result in altered channel kinetics in the literature, a phosphorylation-mimicking variant was introduced into the analyses; subsequently it was tested for four sequence variations of functional relevance. In this thesis two mutations and the phosphorylation-mimicking variant were electrophysiologically characterized by whole-cell recordings. All three variants showed a decelerated and incomplete time-dependent inactivation of the co-transfected $Ca_v1.2$ subunit in HEK (Human Embryonic Kidney) – cells. Two mutations showed a significant

increased slope factor of the curves for the voltage-dependent steady-state inactivation. In this thesis mutations in the $\beta 2$ subunit gene of ASD patients are presented, that result in a retardation of inactivation behavior, thus phenocopying the monogenic Timothy syndrome mutations of Cav1.2. Cav $\beta 2$ subunit mutations may influence neuronal function or development in some ASD patients.

Zusammenfassung

Autismus ("Autism Spectrum Disorder" - ASD) ist eine komplexe neuronale Entwicklungsstörung mit Dysfunktion der sozialen Interaktion und Kommunikation. Der Erkrankung liegt ein bislang unbekanntes, vermutlich komplex-genetisches Entstehungsprinzip zugrunde. Bisher wurden in der Literatur mehr als 100 Kandidatengene identifiziert. Als Modellerkrankung für ASD dient unter anderem das monogenetische Timothy-Syndrom dessen Patienten im Rahmen der Multiorganbeteiligung auch autistische Symptome zeigen. Hier verzögert eine Punktmutation in einer hoch-konservierten Region in dem Gen der porenbildenden Untereinheit des spannungsabhängigen Calciumkanals $Ca_v1.2$ (CACNA1C) unter anderem die zeitabhängige Inaktivierung des Kanals. Ähnliche biophysikalische Effekte konnten durch strukturelle Variation der Hilfsuntereinheiten $\beta 1$ und $\beta 2$ der spannungsaktivierten Calciumkanäle (Ca_v) gezeigt werden. Gestützt durch Funde einer Meta-Studie aus Kopplungs-Analysen von ASD-Patienten wurde ein funktions-basierter Kandidatengen-Ansatz verfolgt, der die Rolle des Gens der $Ca_v.\beta 2$ -Untereinheit (CACNB2) mit ASD untersuchte. Die Hypothese ist, dass Sequenzvariationen in CACNB2, die zu strukturellen Veränderungen führen und damit auch das Inaktivierungsverhalten von spannungsabhängigen Calciumkanälen beeinflussen, die Mutation in CACNA1C des Timothy-Syndrom phänokopieren können.

In einer Familien-basierten Assoziations-Studie mit 444 Familien konnte kein Hinweis auf eine Assoziation von CACNB2 mit ASD gezeigt werden. In der Sequenzanalyse zur Detektion von Mutationen wurden die Exone mit flankierenden intronischen Regionen von 155 Patienten mit ASD sequenziert. Drei nicht-synonyme Sequenzvariationen konnten in autistischen Patienten, jedoch nicht in 259 unbetroffenen Kontrollen detektiert werden. Die Mutationen waren heterozygot und traten jeweils einmal auf. In Kosegregations-Analysen segregierten sie unvollständig mit dem Phänotyp und wiesen eine niedrige Penetranz auf. Alle drei Mutationen sind in hoch-konservierten Regionen des Proteins lokalisiert und können möglicherweise zu einer veränderten Proteinfunktion führen; zusätzlich führt eine der Aminosäure-Substitutionen hochwahrscheinlich zu einer post-translationalen Modifikation durch Phosphorylierung. Da in der Literatur bereits gezeigt wurde, dass die Phosphorylierung der $Ca_v \beta 2$ -Untereinheit die Kanalkinetik verändern kann, wurde eine Phosphorylierungs-imitierende Variante in die Untersuchungen mit eingezogen und insgesamt vier funktionsrelevante Sequenzvariationen verfolgt. In der vorliegenden Arbeit konnten zwei der

Mutationen und die Phosphorylierungs-imitierende Variante mittels Ganzzellableitungen elektrophysiologisch charakterisiert werden. Alle drei Varianten zeigten eine verlangsamte und unvollständige zeitabhängige Inaktivierung der kotransfizierten $Ca_v1.2$ Untereinheit in HEK 293- Zellen („Human Embryonic Kidney“). Zwei Mutationen zeigten für die Kurven der spannungsabhängigen „steady-state“ Inaktivierung signifikant erhöhte Steigungsfaktoren.

In der vorliegenden Arbeit werden Mutationen in der $\beta 2$ -Untereinheit präsentiert, die in einer Verzögerung des Inaktivierungsverhaltens resultieren und damit die Mutation des monogenetischen Timothy-Syndroms phänokopieren. Die hier neu präsentierten Mutationen der $\beta 2$ -Untereinheit könnten einen Einfluss auf die neuronale Funktion oder Entwicklung in manchen ASD Patienten haben.