

Eine seltene Erkrankung ist definiert als eine Krankheit, die weniger als 5 von 10.000 Menschen betrifft. Alleine in Deutschland leiden ungefähr 4-5 Millionen Menschen an einer seltenen Erkrankung. Da die Krankheiten eine immense Belastung für Betroffene und die Gesellschaft darstellen, werden dringend Medikamente zur Behandlung dieser insgesamt häufigen Erkrankungen benötigt. Die Entwicklung effektiver therapeutischer Strategien bedarf eines grundlegenden Wissens über involvierte Gene und molekulare Pathomechanismen, um zu verstehen, wie Genetik den Phänotyp verschiedener Subtypen von seltenen Erkrankungen beeinflusst. Es gibt immer noch eine große Anzahl an Individuen, die an einer seltenen Krankheit leiden, mit unkorrekter oder fehlender Diagnose und unbekanntem genetischen Hintergrund. In diesen Fällen ist eine Therapie ineffektiv oder gar nicht verfügbar. Die Erforschung seltener Erkrankungen ist deshalb unerlässlich, um eine Basis zur Verbesserung der Lebenssituation Betroffener und ihrer Familien zu schaffen. Da ungefähr 80% der seltenen Krankheiten eine genetische Grundlage aufweisen, haben wir uns auf unterschiedliche seltene Erkrankungen festgelegt wie verschiedene Formen von autosomal rezessiver Taubheit, Kabuki-Syndrom und otofaziovervikales Syndrom. Wir haben verschiedene Methoden zur Genidentifizierung angewendet und unterschiedliche funktionelle Analysen durchgeführt, um Einblick in die zugrunde liegende Pathogenese seltener autosomal rezessiv vererbter Erkrankungen zu erhalten.

Durch genomweite Kopplungsanalyse waren wir in der Lage, ein neues Gen für autosomal rezessive nicht-syndromale Taubheit namens *TPRN* in zwei verschiedenen Familien aus Marokko und den Niederlanden zu identifizieren, das in menschlicher und muriner Cochlea exprimiert wird. Beide Deletionen, c.42_52del und c.1347delG, führen zu einer Leserasterverschiebung, einem verfrühten Proteinabbruch und höchstwahrscheinlich zu einem Verlust der Proteinfunktion. Im Vorfeld ist es unserer Gruppe gelungen, das erste autosomal rezessive Gen für aminoglykosid-induzierte Taubheit zu identifizieren. *Eps8 knockout* Mäuse sind taub und haben kürzere und zahlreichere Stereozilien. Die Mutation p.L329P in *EPS8*, das eine Schlüsselrolle in der Regulation der Aktindynamik spielt, führt zu verminderter Interaktion mit Whirlin. Vereinbar mit dem klinischen Phänotypen von Patienten einer großen konsanguinen Familie aus der Türkei zeigten primäre Fibroblasten eines betroffenen Familienmitglieds einen konzentrationsabhängigen Anstieg in der Zelltodrate bei Kanamycinbehandlung im Vergleich zu homozygoten Wildtypzellen. Weitere Analysen des Innenohrs verschiedener Mausmodelle führten zu der Hypothese, dass MyoXVa, Whirlin und *Eps8* einen Komplex an der Spitze der Stereozilien bilden, der unerlässlich für die Stereozilienverlängerung ist. Auf dieser Grundlage habe ich verschiedene Experimente durchgeführt und konnte zeigen, dass MyoXVa die verminderte Interaktion zwischen *EPS8*^{L329P} und Whirlin kompensieren kann. Behandlung mit Aminoglykosiden hatte einen zusätzlich destabilisierenden Effekt auf die Komplexinteraktionen, was zur Degradierung des

Tipkomplexes führte und höchstwahrscheinlich die Depolymerisation des stabilisierenden Aktinkerns und die Zerstörung von Stereozilien *in vivo* hervorruft. Darüber hinaus ist es mir gelungen, das zweite autosomal rezessive Gen für aminoglykosid-induzierte Taubheit, *SLC26A5*, zu identifizieren. Die *donor splice site* Mutation c.971+2T>C verursacht *in vitro* den Verlust des Exon 9 von *SLC26A5*, was zu einer Leserasterverschiebung, einem verfrühten Proteinabbruch und höchstwahrscheinlich zu einem Verlust der Proteinfunktion führt.

Zusätzlich habe ich die molekulare Pathogenese des Kabuki-Syndroms aufgeklärt, die durch eine homozygote Mutation im neuen Kabukigen *RAP1A* hervorgerufen wird. *RAP1A* reguliert die konvergente Extension und MAPK-Signalgebung durch Aktivierung von BRAF und Hemmung von RAF1, zwei entgegengesetzte Funktionen, die höchstwahrscheinlich vom gewebe- und zellspezifischen Umfeld abhängen. *Rap1 knockdown* in Zebrafischembryonen führte zu Defekten der konvergenten Extension. Die hypofunktionelle *RAP1A*-Mutation p.R163T führte zu Defekten im MAPK-Signalweg in Patientenfibroblasten, was ich ebenfalls in verschiedenen *KMT2D*-defekten zellulären Systemen feststellte, da Kabuki-Syndrom in vielen Fällen auf Mutationen in *KMT2D* beruht. Weiterhin zeige ich, dass *RAP1* mit *KMT2D* genetisch interagiert und dass die Expression von *RAP1B* in *KMT2D*-defekten Patientenfibroblasten runterreguliert ist, was durch eine verminderte *KMT2D*-abhängige H3K4-Trimethylierung des *RAP1B*-Promotors verursacht wird.

Mithilfe der Durchführung von *whole-exome* Sequenzierung von einer einzigen, gepoolten DNA-Probe, die DNAs von vier Betroffenen beinhaltet, war ich in der Lage, die Variante c.497G>T (p.G166V) in *PAX1* in einer Familie mit otofaziovikalem Syndrom (OFCS) zu identifizieren, das eine andere autosomal rezessive Krankheit darstellt und durch Ohranomalien, vorspringende Schultern, das flügelartige Abstehen des Schulterblattes und milde geistige Behinderung charakterisiert ist. Da die p.G166V-Mutation in der hochkonservierten DNA-Bindedomäne vom Transkriptionsfaktor *PAX1* lokalisiert ist, habe ich einen dualen Luziferasereporterassay durchgeführt und erhielt eine reduzierte Transaktivierung einer regulatorischen Sequenz in der *Nkx3-2*-Promotorregion als direktes Ziel der transkriptionellen Regulierung von murinem *Pax1* *in vitro*. Neben *EYA1* stellt *PAX1* ein neues Krankheitsgen für OFCS dar, was durch seine wichtige Rolle in der Gestaltbildung während der Embryogenese von Vertebraten und der Entwicklung vertebraler Strukturen untermauert wird.

Zusammenfassend ermöglichen meine Ergebnisse neue Einblicke in die Pathophysiologie verschiedener autosomal rezessiv vererbter Erkrankungen und könnten eine Grundlage zur Entwicklung von therapeutischen Strategien zur Behandlung von seltenen Erkrankungen bieten. Die Identifizierung einer homozygoten *EPS8*-Mutation, die zu einer Prädisposition von Ototoxizität infolge von Aminoglykosidgabe führt, verbindet diese pathologische

Medikamentenantwort mit Aktindynamik und könnte bei der Entwicklung von Strategien helfen, um dieser schweren Nebenwirkung von Aminoglykosiden entgegenzuwirken und sie zu verhindern. Weiterhin zeigen meine Daten, dass Defekte in der MEK-ERK-Signalgebung ein allgemeiner molekularer Treiber im Kabuki-Syndrom sind, was die Erkrankung der Krankheitsgruppe von RASopathien zuordnet und eine neue interessante Richtung für die Behandlung von Kabuki-Syndrom bietet.