

Identifizierung und Charakterisierung eines Kandidatengens für eine Form der monogenen isolierten Hypotrichosen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

der Hohen Medizinischen Fakultät

der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität

Bonn

Stefanie Köpke

aus Dinslaken

2023

Angefertigt mit der Genehmigung
der Medizinischen Fakultät der Universität Bonn

1. Gutachterin: Prof. Dr. med. Regina C. Betz
2. Gutachter: Prof. Dr. med. Andreas Müller

Tag der Mündlichen Prüfung: 14.08.2023

Aus dem Institut für Humangenetik
Direktor: Prof. Dr. med. Markus M. Nöthen

Inhaltsverzeichnis

	Abkürzungsverzeichnis	5
1.	Einleitung	9
1.1	Aufbau der Haut	11
1.2	Aufbau des Haarfollikels und des Haares	12
1.3	Der Haarzyklus	13
1.3.1	Anagen	15
1.3.2	Katagen	16
1.3.3	Telogen	17
1.4	Alopeziden und Hypotrichosen	18
1.5	Monogene isolierte Alopeziden	18
1.5.1	Monilethrix	19
1.5.2	Alopecia universalis congenitalis	19
1.5.3	Hypotrichosis simplex	20
1.5.4	Hypotrichosis Typ Marie Unna	21
1.6	Zielsetzung	22
2.	Material und Methoden	23
2.1	Geräte	23
2.2	Chemikalien, Puffer, Lösungen	24
2.3	Kommerzielle Systeme (Kits)	24
2.4	Oligonukleotide (Primer)	25
2.5	Software und Datenbanken	25
2.6	DNA-Extraktion aus Blut	26
2.7	Polymerasekettenreaktion	26
2.8	Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren	28
2.8.1	Auftrennung der PCR-Produkte	28
2.8.2	Exonuclease-Phosphatase-Verdau	29
2.9	DNA-Sequenzierung	30
2.10	RNA-Extraktion aus Haarfollikeln	32
2.11	cDNA-Synthese aus RNA	32

2.12	Kopplungsanalyse	33
2.13	Whole-Exome-Sequenzierung	35
2.14	Quantitative PCR	36
3.	Ergebnisse	38
3.1	Klinische Vorstellung der untersuchten Familie	38
3.2	Sequenzierung bereits bekannter Genorte	41
3.3	Einengung des Genortes mittels Kopplungsanalyse	42
3.4	Mutationssuche mittels Exomsequenzierung	43
3.5	Expressionsanalyse des CDKL5-Gens	46
4.	Diskussion	47
4.1	Vererbungsmodus und Phänotyp	47
4.2	Methodisches Vorgehen zur Einengung der Kandidatenregion	49
4.2.1	Kopplungsanalyse	49
4.2.2	Exomsequenzierung und Identifizierung der Kandidatengene	51
4.3	Das Kandidatengen CDKL5	52
4.4	Interaktionsprofil des CDKL5-Gens	54
4.5	Plausibilität des Kandidatengens CDKL5	55
4.6	Ausblick	56
5.	Zusammenfassung	58
6.	Abbildungsverzeichnis	60
7.	Tabellenverzeichnis	61
8.	Literaturverzeichnis	62
9.	Anhang	72
10.	Danksagung	74
11.	Lebenslauf	75

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Abb	Abbildung
ACTH	Adrenocorticotropin
APCDD1	Adenomatosis Polyposis Coli Down-Regulated 1 Protein
ATP	Adenosintriphosphat
BDNF	Brain-derived neurotrophic factor
BMP	Bone Morphogenetic Protein
C	Cytosin
C3ORF52	Chromosom 3 Open Reading Frame 52
CDKL5	Cyclin-dependent-kinase-like 5
cDNA	komplementäre DNA
CDSN	Corneodesmosin
CLSTN1	Calsyntenin 1
cM	Centimorgan
CNV	Copy Number Variation
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DSG4	Desmoglein 4

EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalographie
EGF	Epidermal Growth Factor
ExAC	Exome Aggregation Consortium
FGF	Fibroblasten-Wachstumsfaktor
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FOXP1	Forkhead Box G1
G	Guanin
gnomAD	Genome Aggregation Database
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor
HR	Hairless
KCNQ2	Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 2
KRT	Keratin
LIPH	Lipase H
LOD	logarithm of the odds
LPAR6	Lysophosphatidic Acid Receptor 6
MAPK	Mitogen-aktivierte Protein-Kinase
MECP2	Methyl-CpG-Binding-Protein 2
MgCl	Magnesiumchlorid
NaCl	Natriumchlorid
NGS	Next-Generation-Sequencing
OD	optische Dichte

ORF	open reading frame
PCR	Polymerasekettenreaktion
PolyPhen-2	Polymorphism Phenotyping v2
qPCR	quantitative PCR
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPL21	Ribosomal Protein L21
RT	Reverse Transkriptase
RVIS	Residual Variation Intolerance Score
SDS	Natriumdodecylsulfat
SHH	Sonic Hedgehog
SNP	Einzelnukleotid-Polymorphismus
SNRPE	Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide E
STK	Serin/Threonin-Proteinkinase
STXBP1	Syntaxin Binding Protein 1
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE-4	Tris-EDTA
TGF	Transforming Growth Factor
Thr	Threonin
Tyr	Tyrosin
UTR	untranslated region

UV	Ultraviolett
WES	Whole-Exome-Sequencing
WGS	Whole-Genome-Sequencing
Wnt	Wingless Int 1
ZNF185	Zinkfingerprotein 18

1. Einleitung

Dem Haar wurde schon immer in der Geschichte der Menschheit in verschiedenen Kulturen eine besondere Bedeutung beigemessen. Dabei erfüllt das Haar beim Menschen keine lebenswichtige biologische Funktion (Kligman, 1988). Lediglich das Kopfhaar dient als Wärmeschutz (Netter und Technau-Hafsi, 2010). Die psychosoziale Funktion dagegen ist weitaus bedeutender. Haare und aufwändige Frisuren waren immer wieder in der Geschichte ein wichtiges Mittel, um den sozialen Status, den Beruf oder die Religionszugehörigkeit zu unterstreichen. Dazu wurde und wird auch heute noch viel Zeit und Geld in Haarpflege investiert. Volles Haar wird schon immer mit Männlichkeit, Potenz, Kraft, Gesundheit und Attraktivität assoziiert. Das Scheren der Haare wurde in vielen Kulturen als Strafe und Demütigung eingesetzt. Die Römer beispielsweise schnitten Gefangenen, Ehebrecherinnen und Verrätern die Haare ab. Im frühen Christentum wurde den Mönchen der Kopf geschoren, um sie unattraktiver erscheinen zu lassen (Kligman, 1988).

Haare und Frisur sind auch heute noch ein wichtiger Bestandteil der Identität und bieten die Möglichkeit, das eigene Erscheinungsbild und die Wirkung auf andere Menschen individuell zu bestimmen und zu verändern (Passchier, 1998). Haarverlust ist demnach nicht nur ein kosmetisches Problem, sondern hat zudem eine bedeutende psychosoziale Komponente. Haarverlust kann zu einem Gefühl der Verwundbarkeit, zu Veränderungen der Selbstwahrnehmung und zu einer Abnahme des Selbstbewusstseins bis hin zu klinisch manifester Depression führen (Alfonso et al., 2005; Williamson et al., 2001). Daraus ergibt sich eine erhebliche Einschränkung der Lebensqualität. Dass bisher für viele Formen der Haarlosigkeit keine effektive Behandlung existiert, verstärkt diese Folgen (Williamson et al., 2001). Eine erfolgreiche Therapie des Haarverlusts konnte in Studien mit einer Verbesserung der Selbstwahrnehmung assoziiert werden (Alfonso et al., 2005).

Ein pathologischer Haarverlust wird als Effluvium bezeichnet. Man unterscheidet zwischen Hypotrichose (partieller Haarausfall) und Atrichie (totaler Haarausfall). Der Zustand der Haarlosigkeit wird als Alopezie bezeichnet. Die Ursachen können genetisch, multifaktoriell oder exogen sein. In der vorliegenden Arbeit wird genauer auf die rein genetisch bedingten Formen des Haarausfalls eingegangen.

Die Untersuchung von monogenen isolierten Hypotrichosen ist ein wichtiger Ansatz, um die Haarphysiologie und das Haarwachstum genauso wie die Pathophysiologie des Haarausfalls besser zu verstehen. Auf diese Weise können Gene identifiziert werden, die notwendig und spezifisch für die Entwicklung und das Wachstum des Haares sind. Auch das Ziel der vorliegenden Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung eines Gens, das ursächlich für eine monogene Form der Hypotrichosen ist, die phänotypisch der Hypotrichose Typ Marie Unna ähnelt.

Durch verbesserte Methoden und insbesondere die Etablierung von *Next-Generation-Sequencing* (NGS)-Plattformen wurde in den letzten Jahren die Identifizierung von Genen, die ursächlich für verschiedene monogene Formen der Hypotrichosen sind und damit auch eine wichtige Rolle in der Haarphysiologie spielen, deutlich vereinfacht. Dennoch ist die Pathophysiologie der Haarentwicklung und des Haarwachstums bisher nicht vollständig verstanden und es bedarf weiterer Forschung auf diesem Gebiet. Ein besseres Verständnis kann langfristig auch zur Entwicklung neuer Therapieansätze beitragen und damit zu einer Verbesserung der Lebensqualität der Betroffenen führen.

1.1 Aufbau der Haut

Die Haut (Kutis) bedeckt beim Menschen eine Fläche von durchschnittlich zwei Quadratmetern und ist für den Körper lebenswichtig. Sie schützt vor Wasserverlust oder Umweltschäden. Spezielle Mechanorezeptoren ermöglichen die Wahrnehmung von Umweltreizen. Des Weiteren dienen Schweißdrüsen und das Blutgefäßsystem der Haut der Thermoregulation (Lüllmann-Rauch, 2009).

Es kann zwischen Felder- und Leistenhaut unterschieden werden. In der Felderhaut finden sich Haare, Schweiß- und Talgdrüsen, in der Leistenhaut nur Schweißdrüsen. Mit Leistenhaut sind nur die Palmar- und Plantarflächen bedeckt (Lüllmann-Rauch, 2009).

Die Kutis lässt sich in zwei Schichten unterteilen, Epidermis und Dermis, und bildet gemeinsam mit der darunter liegenden Subkutis die Hautdecke (Integumentum commune). Die Epidermis besteht hauptsächlich aus verhorntem Plattenepithel, das durch Keratinozyten gebildet wird, enthält aber auch Melanozyten, Mechanorezeptoren (Merkel-Zellen) und Zellen des Immunsystems (Langerhans-Zellen). Mit den Keratinozyten erfüllt die Epidermis eine mechanische und chemische Schutzfunktion nach außen. Außerdem bildet sie eine Diffusionsbarriere, die den Austritt von Wasser verhindert und zu gewissen Teilen auch das Eindringen von Schadstoffen wie beispielsweise Säuren erschwert. Epidermis und Dermis sind durch Papillen und Reteleisten fest miteinander verankert. Die Dermis lässt sich in einen papillären und einen retikulären Anteil unterteilen. Die papilläre Dermis enthält lockeres Bindegewebe aus Kollagen I und III, Zellen des Immunsystems, freie Nervenendigungen und Meißner-Tastkörperchen, die das Wahrnehmen von Sinnesreizen ermöglichen. Durch die aus straffem Bindegewebe bestehende retikuläre Dermis erhält die Haut ihre mechanische Widerstandsfähigkeit und Reißfestigkeit. Im Gegensatz dazu besteht die Subkutis aus lockerem Bindegewebe und Fettgewebe, in dem Hautnerven und Blutgefäße verlaufen. Durch die Subkutis wird die Haut mit den tiefer liegenden Strukturen fest verbunden, sie dient aber auch als Druckpolster, Schutz vor Wärmeverlust und Energiespeicher (Lüllmann-Rauch, 2009).

1.2 Aufbau des Haarfollikels und des Haares

Als Haarfollikel bezeichnet man Einstülpungen der Epidermis in die Dermis oder Subkutis, in denen sich das Haar entwickelt. Die Zahl der Haarfollikel ändert sich nach der Geburt nicht mehr und das Wachstum der einzelnen Haare unterliegt einem periodischen Haarzyklus (Lüllmann-Rauch, 2009). Unter bestimmten Umständen, beispielsweise im Zusammenhang mit der Wundheilung, können allerdings auch postnatal neue Haarfollikel gebildet werden (Gay et al., 2013; Stenn und Paus, 2001).

Ein Haarfollikel tritt immer zusammen mit einer Talgdrüse und einem Musculus arrector pili als Haar-Talgdrüsen-Einheit auf. Man unterscheidet zwischen dünnen, kaum pigmentierten Vellushaaren, die den gesamten Körper bedecken, und dicken, pigmentierten Terminalhaaren, die in Haupthaar, Wimpern, Brauen, Schamhaaren und Achselhaaren zu finden sind. Am tiefsten Punkt der Epidermiseinstülpung, dem Haarbulbus, befinden sich Matrixzellen. Diese teilen sich, steigen auf und differenzieren in der keratogenen Zone zu Hornzellen des Haarschafts. Zwischen den Matrixzellen liegen Melanozyten, die Pigment produzieren. In den Haarbulbus ragt die Haarpapille. Sie ist ein bindegewebiger Fortsatz der Dermis, der mithilfe einer Kapillarschlinge den Bulbus versorgt und durch Fibroblasten das Teilungsverhalten der Matrixzellen steuert (Lüllmann-Rauch, 2009; Paus & Cotsarelis, 1999).

Der Haarschaft besteht größtenteils aus einer Rinde dicht gepackter Hornzellen mit Melanosomen. Umhüllt wird diese Rinde von der Cuticula. Diese besteht aus platten, zur Haarspitze ausgerichteten Hornzellen. Der Haarschaft wird von zwei epithelialen Wurzelscheiden umgeben. Durch eine frühe Verhornung und Ausrichtung der Hornzellen entgegen denen der Cuticula des Haarschafts festigt die innere Wurzelscheide, die den Haarschaft auch außerhalb der Dermis umgibt, das Haar im Follikel und bildet so die endgültige Form des Haares (Lüllmann-Rauch, 2009; Paus und Cotsarelis, 1999).

Die innere Wurzelscheide besteht aus drei Schichten. Dies sind von innen nach außen die Cuticula, die Huxley-Schicht und die Henle-Schicht. Die äußere Wurzelscheide enthält am Infundibulum, der Mündung des Haarfollikels zur Hautoberfläche, einen Wulst (Lüllmann-Rauch, 2009; Paus und Cotsarelis, 1999). Dieser Wulst enthält multipotente Stammzellen, die der Regeneration des Follikels dienen (Cotsarelis et al., 1990). Diese Stammzellen stellen gleichzeitig auch einen Vorrat für epidermale Zellen und Basalzellen der Talgdrüsen dar. Bei Verletzungen der umgebenden Epidermis gehen sie als

mitotisch aktive Zellen aus dem Haarfollikel in die Haut über. Gemeinsam mit Melanozyten, Langerhans-Zellen und Merkel-Zellen aus der äußeren Haarwurzelscheide können sie so bei Verletzung der Haut zu deren Regeneration beitragen (Lüllmann-Rauch, 2009; Paus und Cotsarelis, 1999).

1.3 Der Haarzyklus

Alle Haare unterliegen einem periodisch verlaufenden Haarzyklus, der eine Wachstumsphase (Anagen), eine Regressionsphase (Katagen) und eine Ruhephase (Telogen) umfasst. Die Ausfallphase des Haarschafts findet unabhängig von diesem Zyklus statt und wird als Exogen bezeichnet (siehe Abbildung 1). Genau wie die Erneuerung der Haut ist der Haarzyklus ein gemeinsames Charakteristikum aller behaarten Organismen. Er könnte aufgrund verschiedener Anforderungen an den Organismus entstanden sein (Stenn und Paus, 2001). Er erlaubt das Wachstum der Haare, die Kontrolle der Haarlänge an unterschiedlichen Körperstellen, die periodische Erneuerung des Haares zur Reinigung der Körperoberfläche und ermöglicht die Anpassung an sich verändernde Umweltbedingungen (Stenn und Paus, 2001). Ein Beispiel für diese Anpassung ist der saisonale Fellwechsel bei Tieren, die einen synchronisierten Haarzyklus haben. Der Haarzyklus des Menschen ist im Gegensatz dazu asynchron. Das heißt, jeder einzelne Haarfollikel hat seinen eigenen Rhythmus und es werden nicht alle Haare gleichzeitig erneuert (Chase, 1954). Somit wird eine gleichmäßige Behaarung der Haut ermöglicht. Außerdem kann sich die Dauer des gesamten Haarzyklus sowie der einzelnen Phasen je nach Körperstelle stark voneinander unterscheiden, wodurch unterschiedliche Haarlängen entstehen. Der Haarzyklus des menschlichen Kopfhaares ist besonders, da er eine sehr lange Zyklusdauer von zwei bis sechs Jahren haben kann und unabhängig von äußeren Einflüssen wie Licht oder Temperaturveränderungen ist. Hingegen spielen andere Faktoren wie Ernährung, Schwangerschaft, Medikamenteneinnahme oder Krankheiten eine Rolle. Wo der Taktgeber für den Haarzyklus sitzt und aus welchen Zellen dieser besteht, ist noch unklar (Stenn und Paus, 2001).

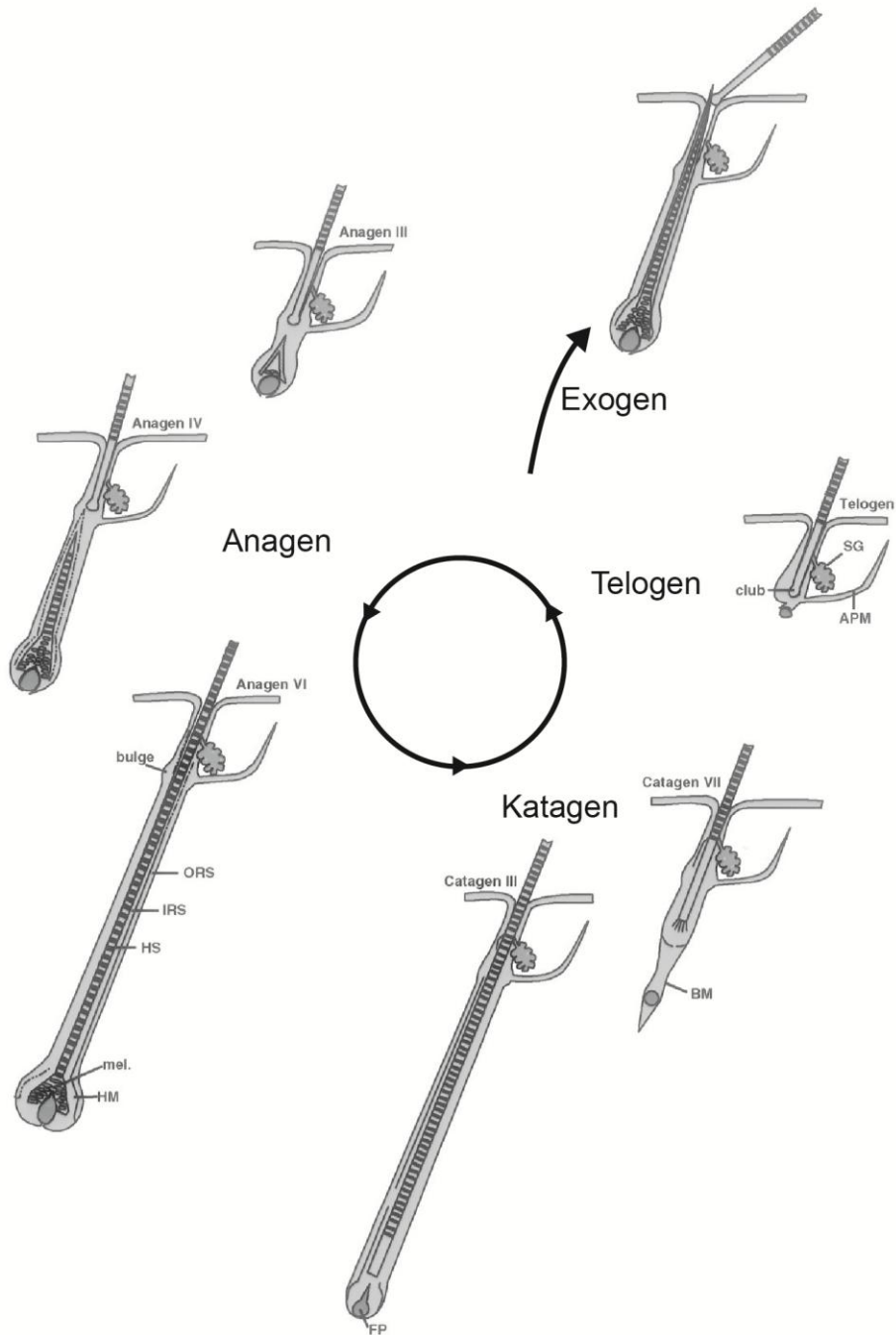


Abb. 1: Vereinfachte Darstellung der einzelnen Phasen des Haarzyklus. Das Exogen findet unabhängig von Anagen, Katagen und Telogen statt. APM: Musculus arrector pili, BM: Basalmembran, FP: dermale (follikuläre) Papille, HS: Haarschaft, IRS: innere Wurzelscheide, mel: Melanin, ORS: äußere Wurzelscheide, SG: Talgdrüse. Modifiziert nach Stenn und Paus, 2001.

1.3.1 Anagen

Als Anagen wird die Wachstumsphase des Haarfollikels bezeichnet. In dieser Phase wird eine neue Haarwurzel gebildet. Es stellt mit einer Dauer von drei bis sechs Jahren, manchmal sogar mehr, die längste Phase des Haarzyklus dar. Die genaue Dauer bestimmt die maximale Haarlänge und ist erblich vorgegeben. Normalerweise befinden sich über 80 % der Kopfbehaarung in dieser Phase (Wolff, 2005). Das Anagen kann in sechs einzelne Phasen unterteilt werden (Chase et al., 1951). Der Ablauf ähnelt dem der Haarfollikel-Entwicklung. Beide beginnen mit der Proliferation von Stammzellen in der Wulstregion, dem permanenten Abschnitt des Haarfollikels, der während des gesamten Haarzyklus erhalten bleibt (Paus und Cotsarelis, 1999). Normalerweise geht das Anagen spontan aus dem Telogen hervor. Es sind abgesehen davon inzwischen auch einige innere und äußere Einflüsse bekannt, durch die das Anagen, und damit das Haarwachstum, ausgelöst werden kann. Der genaue Wirkmechanismus ist jedoch meist unbekannt. Dazu gehören Verletzungen der Haut und des Haarfollikels, Chemikalien, Medikamente wie beispielsweise Minoxidil und verschiedene endogene Neurotransmitter (Chase, 1954; Li et al., 1999; Messenger et al., 2004; Stenn und Paus, 2001).

In der ersten Phase des Anagens (Anagen I) kommt es zu einer starken Proliferation der Stammzellen in der Wulstregion (Cotsarelis et al., 1990). Diese Zellen wandern entlang der dermalen Papille in die Epidermis ein (Anagen II). Sobald sie die maximale Tiefe erreicht haben, ändern die Zellen ihre Wachstumsrichtung nach außen. So werden innere Wurzelscheide und Haarschaft geformt (Anagen III) (Chase et al., 1951). Diese Proliferation geht von undifferenzierten Zellen aus, die sich im unteren Teil des Haarfollikels unterhalb der von Auber als "critical level" bezeichneten breitesten Stelle der Haarpapille befinden (Auber, 1952). Im Anschluss wird das Haar geformt. Es wird noch von der inneren Wurzelscheide umschlossen, die jetzt bis an die Ebene der Talgdrüse heranreicht (Anagen IV). Haarschaft und Haarwurzelscheide trennen sich voneinander und das neue Haar wächst in Richtung Epidermis (Anagen V) und über die Hautoberfläche hinaus (Anagen VI).

In den Phasen Anagen I bis V wird demnach der Haarfollikel neu gebildet. In Anagen VI, der Phase, die in Haarfollikeln verschiedener Körperregionen unterschiedlich lang ist, findet das Wachstum des Haares statt (Chase et al., 1951; Stenn und Paus, 2001). Die Haarwachstumsgeschwindigkeit beträgt dabei ungefähr einen Zentimeter pro Monat

(Wolff, 2005). Es sind einige molekulare Marker und Faktoren bekannt, die das Anagen steuern, wobei die Funktion der einzelnen in dem komplexen Zusammenspiel noch weitestgehend unklar ist (Stenn und Paus, 2001). An der Initiierung und Aufrechterhaltung des Anagens sind unter anderem Wingless Int 1 (*Wnt*)/ β -catenin, Sonic Hedgehog (*SHH*), Hepatozyten-Wachstumsfaktor (*HGF*) und einige Fibroblastenwachstumsfaktoren (*FGFs*) beteiligt (Danilenko et al., 1996; Jindo et al., 1998; Lin et al., 2015; Millar et al., 1999; Sato et al., 1999). Auch beim Übergang vom Anagen zum Katagen spielen Neurotransmitter wie Epidermal Growth Factor (*EGF*), Transforming Growth Factor (*TGF*)- β 1 und Neurotrophine wie Brain-derived neurotrophic factor (*BDNF*) eine Rolle (Botchkarev et al., 2004; Foitzik et al., 2000; Hansen et al., 1997).

1.3.2 Katagen

Nach Beendigung des Anagens geht der Haarfollikel in das Katagen über. Dieses dauert ungefähr zwei Wochen und stellt eine Umbauphase dar, in der eine starke morphologische Regression des Haarfollikels auf etwa ein Drittel seiner Länge stattfindet (Wolff, 2005).

Das Katagen ist in acht Phasen unterteilt (Müller-Röver et al., 2001). Zunächst bilden sich Zellausläufer der Papille zurück, sodass diese den Kontakt zu der Basallamina verliert. Durch Kondensation der Zellen und Neubildung von Fibrillen schrumpft die Haarpapille (De Weert, 1982). Die Melanin-Produktion nimmt ab und es kommt zu einer Umstrukturierung des Zytoskeletts (Commo und Bernard, 1997; Tobin, 2011). Die Expression von Trichohyalin, Transglutaminase I und Desmoglein nimmt ab, was auf eine Rückbildung der inneren Wurzelscheide schließen lässt (Commo und Bernard, 1997). Es treten synchronisierte Apoptosen in verschiedenen Teilen des Haarfollikels auf und der Haarfollikel wandert nach distal in Richtung Hautoberfläche (Commo und Bernard, 1997; Lindner et al., 1997). Am unteren Pol entsteht eine verhornte Verdickung aus Keratin-14 exprimierenden Zellen, die Kolben genannt wird (Commo und Bernard, 1997).

Genau wie das Anagen unterliegt auch das Katagen verschiedenen endogenen und exogenen Einflussfaktoren, wobei die genauen Mechanismen meist noch unbekannt sind. Ausgelöst werden kann es zum Beispiel durch starken Stress, Cyclosporin A, Dexamethason, Adrenocorticotropin (*ACTH*) und 17β -Estradiol (Kligman, 1959; Paus

et al., 1994; Stenn und Paus, 2001). Auch *FGF5* scheint eine wichtige Rolle bei der Induktion des Katagen zu spielen, denn in Abwesenheit von *FGF5* tritt dieses verzögert ein (Hébert et al., 1994).

1.3.3 Telogen

Die Ruhephase des Haarzyklus, die sich an das Katagen anschließt, wird als Telogen bezeichnet und dauert ungefähr zwei bis vier Monate. Matrix, Wurzelscheiden und Kutikula, die für das wachsende Haar typisch sind, fehlen in dieser Phase des Haarzyklus (Wolff, 2005). Der Telogen-Haarfollikel weist nahezu keine Stoffwechselaktivität auf. Er besteht nur noch aus dem keratinisierten Kolbenhaar, dessen Zellen weiterhin Keratin-14 exprimieren (Bowden et al., 1998; Wolff, 2005). Durch erhöhte Expression von *FGF18* und Bone Morphogenetic Protein (*BMP6*) im Kolbenhaar wird das Wachstum von Keratinozyten unterbunden (Blanpain et al., 2004). Dem Kolbenhaar entstammende Stammzellen bilden einen sekundären Haarkeim (Greco et al., 2009; Lowry et al., 2005). Die Stammzellen verbleiben den größten Teil des Telogens in einer Ruhephase. Diese Ruhephase und der Übergang zum Anagen werden unter anderem durch *BMP* und den *Wnt*-Signalweg über die Stabilisierung und Aktivierung von β -Catenin reguliert (Horsley et al., 2008). Obgleich die Stammzellen des sekundären Haarkeims dem Kolbenhaar entstammen, reagieren sie schneller auf die Aktivierung der Mediatoren oben genannter Signalwege und es kommt dementsprechend zunächst im Bereich des sekundären Haarkeims, später im Bereich des Kolbenhaars zur Zellproliferation und Bildung der Matrixzellen, aus denen ein neuer Anagen-Haarfollikel gebildet wird (Greco et al., 2009; Lowry et al., 2005; Plikus et al., 2011). Die Aktivierung des *Wnt*-Signalwegs erfolgt spontan, wobei simultane Aktivierung im Bereich von mehreren dermalen Papillen notwendig ist, um den Übergang vom Telogen zum Anagen zu initiieren (Plikus et al., 2011).

1.3.4 Exogen

Als Exogen wird die Ausfallphase des Haarschafts bezeichnet. Diese Phase findet nicht zwingend zwischen, sondern unabhängig von Telogen und Anagen statt. In einem Haarschaft kann ein neues Haar wachsen, bevor das alte ausgefallen ist. Dieser Ablauf erlaubt die permanente Aufrechterhaltung der Schutzfunktion des Haares (Stenn und Paus, 2001).

1.4 Alopezien und Hypotrichosen

Wie oben beschrieben wirken beim Haarwachstum viele unterschiedliche Faktoren zusammen. Eine Beeinträchtigung dieser Faktoren kann zu Störungen im Haarzyklus oder der Haarmorphologie führen, was sich als Haarausfall äußern kann. Im Allgemeinen spricht man ab einem Haarverlust von 100 Haaren pro Tag von Haarausfall, auch als Effluvium bezeichnet. Als Alopezie wird der Zustand der Haarlosigkeit beschrieben. Die Ursachen für Alopezien sind vielfältig und beinhalten sowohl genetische Faktoren als auch Umwelteinflüsse, wie beispielsweise Medikamente. Alopezien können im Rahmen von Syndromen oder anderen Erkrankungen, aber auch isoliert auftreten. Sie können angeboren oder erworben sein. Bei den angeborenen Formen wird zwischen partiellem (Hypotrichosen) und totalem (Atrichien) Haarausfall unterschieden (Fritsch, 2009).

Im Folgenden soll detaillierter auf die monogenen isolierten Hypotrichosen eingegangen werden, da bei der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Familie eine monogene Form der Hypotrichosen vermutet wurde.

1.5 Monogene isolierte Alopezien

Zur Gruppe der monogen vererbten isolierten Alopezien gehören mehrere klinisch und genetisch heterogene Formen von Haarlosigkeit. Sie lassen sich durch das Alter der Patienten bei Erkrankungsbeginn, die betroffenen Regionen und die Struktur des Haarschafts unterscheiden. Die Auswirkungen können von minimalem Haarverlust bis hin zu kompletter Haarlosigkeit reichen. Monogene Alopezien resultieren aus einem Defekt in einem einzigen Gen. Im Folgenden wird die Klinik der verschiedenen Formen monogener isolierter Alopezien dargestellt.

1.5.1 Monilethrix

Die Monilethrix ist charakterisiert durch dünne, spindelige Haare, die brüchig, glanzlos und trocken sind. Am häufigsten ist das Kopfhaar betroffen, meist am Nacken und in der Okzipitalregion, seltener die Augenbrauen, Wimpern, Axillen- oder Pubeshaare. Häufig leiden die Betroffenen zusätzlich an Keratosis follicularis, einer Verhornungsstörung der Haut mit Ausbildung hautfarbener, stecknadelkopfgroßer Keratosen, die an die Follikel gebunden sind und vor allem an den Streckseiten der Extremitäten auftreten (Salamon, 1962, Wolff, 2005). Auch Nagelveränderungen können auftreten. Beide Geschlechter sind gleich häufig betroffen und der typische Phänotyp zeigt sich schon in den ersten Lebensmonaten. Die Monilethrix bessert sich oft mit dem Alter, kann aber auch lebenslang bestehen. Mikroskopisch zeigt sich eine spindelartig veränderte Haarstruktur, die durch abwechselnd auftretende Verdickungen und Einschnürungen des Haarschafts charakterisiert ist (Salamon, 1962). Es sind sowohl dominante als auch rezessive Erbgänge bekannt. Für die autosomal-dominante Form sind Gene aus dem Typ-2-Gencluster der basischen Keratine auf Chromosom 12q13 verantwortlich. Bekannt sind Mutationen im Keratin (*KRT*)-Gen *KRT81*, *KRT83* und *KRT86* (Van Steensel et al., 2005; Winter et al., 1997; Winter et al., 1998). Für die autosomal-rezessive Form konnten Mutationen im Desmoglein 4 (*DSG4*)-Gen auf Chromosom 18q12 identifiziert werden, das auch für die Hypotrichosis simplex bekannt ist (Kljuic et al., 2003; Zlotogorski et al., 2006).

1.5.2 Alopecia universalis congenitalis

Die Alopecia universalis congenitalis ist charakterisiert durch totalen Haarausfall der Kopf- und Körperbehaarung. Bei Geburt haben die Betroffenen noch eine spärliche oder sogar normale Kopfbehaarung, die innerhalb der ersten Wochen ausfällt und nicht mehr nachwächst. Haut und Nägel sind nicht betroffen. In Hautbiopsien wurden keine Auffälligkeiten der Dermis und Epidermis gefunden, allerdings wurde eine verminderte Anzahl Haarfollikel beschrieben, in denen keine Haare wuchsen. Die Alopecia universalis congenitalis wird autosomal-rezessiv vererbt. Verantwortliche Mutationen konnten im Hairless (*HR*)-Gen auf Chromosom 8p21-8p22 identifiziert werden (Ahmad, 1998;

Nöthen et al., 1998). In einzelnen Familien wurde auch ein autosomal-dominanter und X-chromosomaler Erbgang beschrieben (Anzai et al., 1996; Nöthen et al., 1998).

1.5.3 Hypotrichosis simplex

Als Hypotrichosis simplex wird eine spärliche oder fehlende Behaarung des Kopfes ohne ektodermale oder systemische Auffälligkeiten bezeichnet. Typischerweise sind keine strukturellen Defekte am Haarschaft zu erkennen. Licht- und elektronenmikroskopisch konnten nur bei Patienten mit fortgeschrittener Hypotrichose eine verminderte Anzahl an Haarfollikeln und einzelne Areale, in denen die Struktur der Cuticula beschädigt war, nachgewiesen werden (Toribio et Quiñones, 1974). Die hereditären Formen können sowohl autosomal-dominant als auch autosomal-rezessiv vererbt werden und zeigen eine vollständige Penetranz (Betz, 2014; Toribio et Quiñones, 1974). Sie betreffen Männer und Frauen gleich häufig und ausgeprägt (Toribio et Quiñones, 1974). Der Phänotyp kann sehr variabel sein. In der Regel ist das Haar bei Geburt und in den ersten Lebensjahren normal entwickelt. Ein gradueller Haarausfall beginnt in der Mitte der ersten und ist dann bis zum Ende der zweiten Lebensdekade progressiv. Er kann bis zum Verlust der kompletten Kopfbehaarung führen. Die restliche Körperbehaarung kann je nach Form normal entwickelt oder betroffen sein. Es ist eine nur auf die Kopfhaut begrenzte, als *Hypotrichosis simplex of the scalp* bezeichnete autosomal-dominante Form bekannt, für die Corneodesmosin (*CDSN*) auf Chromosom 6p21.3 als verantwortliches Gen identifiziert werden konnte (Betz, 2014; Levy-Nissenbaum et al., 2003).

Für die autosomal-dominante Hypotrichosis simplex konnten drei Gene identifiziert werden: Adenomatosis Polyposis Coli Down-Regulated 1 Protein (*APCDD1*) auf Chromosom 18p11, Small Nuclear Ribonucleoprotein Polypeptide E (*SNRPE*) auf Chromosom 2p25-2p23 und Ribosomal Protein L21 (*RPL21*) auf Chromosom 13q12.12-13q12.3 (Pasternack et al., 2013; Shimomura et al., 2010; Zhou et al., 2011). Für die autosomal-rezessiven Formen sind bisher Mutationen in *DSG4* auf Chromosom 18q12, im Chromosom 3 Open Reading Frame 52 (*C3ORF52*) auf Chromosom 3q13.2, in Lipase H (*LIPH*) auf Chromosom 3q27 und im Lysophosphatidic Acid Receptor 6 (*LPAR6*) auf Chromosom 13q14-13q21 bekannt, wovon die letzteren beiden auch für den Phänotyp der Wollhaare identifiziert werden konnten (Kazantseva et al, 2006; Khan et al., 2011; Malki et al., 2020; Pasternack et al, 2008; Zlotogorski et al., 2006).

1.5.4 Hypotrichosis Typ Marie Unna

Die Hypotrichosis Typ Marie Unna wurde erstmals 1925 von der Dermatologin Dr. Marie Unna beschrieben. Sie untersuchte eine sieben Generationen umfassende Familie aus Nordeutschland mit einer autosomal-dominanten Form der Alopezie. Die von ihr beschriebene Form der Hypotrichose zeichnet sich durch eine charakteristische Veränderung der Haarstruktur im Laufe des Lebens aus. Die Betroffenen zeigen bei Geburt nur spärliche oder keine Kopfbehaarung. In der Kindheit entwickeln sie dann drahtige, dicke und glanzlose Haare, die ab der Pubertät progredient ausfallen. Das Muster des Haarverlustes ähnelt dem der androgenetischen Alopezie. Das Ausmaß des Haarverlustes kann stark variieren. Körper-, Axillen- und Schambehaarung ist ebenfalls spärlich oder fehlt (Redler et al., 2011). Histologisch lässt sich eine verminderte Anzahl an Haarfollikeln nachweisen. Im fortgeschrittenen Stadium erscheinen die Haarfollikel verkleinert mit Knickbildungen und Epithelproliferationen in der inneren Wurzelscheide. Licht- und Elektronenmikroskopisch zeigt sich eine abnorme Haarstruktur mit Abflachungen und Drehungen in unregelmäßigen Abständen (Solomon et al., 1971). Als molekulare Ursache für die Hypotrichosis Typ Marie Unna konnten *loss-of-function* Mutationen in *U2HR* auf Chromosom 8p21 identifiziert werden. Dabei handelt es sich um einen inhibitorischen *open reading frame* (ORF) in der *5'-untranslated region* (UTR) des *HR*-Gens. Loss-of-function Mutationen im *HR*-Gen selbst führen zu dem Phänotyp der Alopecia universalis congenitalis (siehe Abschnitt 1.5.2), der charakterisiert ist durch totalen Haarausfall bereits wenige Wochen nach Geburt. Mutationen in *U2HR* dagegen führen zu einer gesteigerten Translation des *HR*-Gens und dem oben beschriebenen Phänotyp der Hypotrichosis Typ Marie Unna (Wen et al., 2009). Eine weitere bisher identifizierte Mutation ist eine *missense*-Mutation in *EPS8L3* auf Chromosom 1p13. Gene der *EPS8*-Genfamilie sind Teil des *Epidermal Growth Factor* (*EGF*)-Rezeptor-Signalwegs, der sowohl im Haarzyklus als auch in der Haarfollikelentwicklung eine wichtige Rolle spielt (Zhang et al., 2012).

1.6. Zielsetzung

Haarverlust betrifft viele Menschen und kann zu einem hohen psychischen Leidensdruck führen. Die bisher vorhandenen Therapien sind unbefriedigend, da die Physiologie des Haarwachstums und damit auch die Pathophysiologie des Haarverlustes noch nicht ausreichend bekannt sind. Ein wichtiger Ansatz zum besseren Verständnis ist die Identifizierung von Mutationen, die zu isolierten Alopezien führen. Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Identifizierung und die Charakterisierung einer Genmutation, die in einer Familie chinesischen Ursprungs für eine dominant vererbte, isolierte Form der Hypotrichose ursächlich ist.

Zunächst sollten mittels genomweiter Kopplungsanalyse Kandidatengenregionen ermittelt werden. Für die vorliegende Arbeit lagen nur Proben von insgesamt neun Familienmitgliedern vor. Aufgrund der kleinen Anzahl an zur Verfügung stehenden Proben wurden bei der Kopplungsanalyse mehrere chromosomale Bereiche, die mit *logarithm of the odds* (LOD)- Scores von maximal 1,8 gekoppelt sind, erwartet.

Die in den ermittelten Bereichen liegenden Gene sollten im nächsten Schritt mit den Daten des *Whole-Exome-Sequencing* (WES) der Indexpatientin (III:9) verglichen werden, um plausible Kandidatengene herauszufiltern und diese weiter zu analysieren. Dazu sollten die Kandidatengene mithilfe der Plattform *varbank* anhand von Scores für die Wahrscheinlichkeit der Pathogenität der Varianten, Anzahl der bereits bekannten Mutationen in dem Gen und bereits bekannter funktioneller Zusammenhänge ausgewertet werden. Eine zweite Herangehensweise war der Vergleich der Exomdaten von vier betroffenen Individuen, um gemeinsame Varianten herauszufiltern und genauer zu analysieren. Die Kosegregation der identifizierten Mutationen in der Familie sollte mittels Sanger-Sequenzierung untersucht werden.

Zusätzlich sollte die Expression der Kandidatengene in Haut und Haarfollikeln gesunder Individuen ermittelt werden, da davon ausgegangen wurde, dass die pathogene Mutation in diesen Geweben exprimiert sein müsste.

Dieses Vorhaben wurde von der Ethikkommission mit der laufenden Nummer 007/10-A (Vorläuferstudie Nummer 102/97) befürwortet.

2. Material und Methoden

Die im Folgenden aufgeführten Methoden wurden mit Ausnahme des WES (Kapitel 2.13) von mir durchgeführt. Das WES wurde vom Cologne Center for Genomics an der Universität zu Köln kommerziell durchgeführt. Die Auswertung der Ergebnisse und das Filtern der Varianten mit Hilfe der Plattform *varbank* wurde wiederum von mir vorgenommen. Vor Beginn der vorliegenden Arbeit wurde eine SNP-Genotypisierung der zu untersuchenden Familie durch die Arbeitsgruppe Betz durchgeführt, sodass die Daten zur Verwendung in der von mir durchgeführten Linkage-Analyse bereits vorlagen. Hierfür wurde der Infinium[®]PsychArray-24 v1.1 BeadChip von Illumina mit 588.628 Markern verwendet.

2.1 Geräte

- Applied Biosystems[®] 3130xl Genetic Analyzer, Life Technologies Corporation
- C1000[™] Thermal Cycler, BioRad Laboratories GmbH
- DNA Engine[®] Thermal Cycler, BioRad Laboratories GmbH
- Eppendorf Research[®] (0,1-2,5µl; 0,5-10µl; 2-20µl; 10-100µl; 20-200µl; 100-1000µl), Eppendorf GmbH
- GelDoc[™] XR System, BioRad Laboratories GmbH
- HiSeq[™] 2000, Illumina
- Light Cycler[®] 480 II, Roche
- MJ Research PTC-200 Thermal Cycler, MJ Research Inc.
- NanoDrop[™]- Spektrophotometer, Thermo Fisher Scientific
- NeoLab[®]-Mini-Zentrifuge Spectrafuge, neoLab[®]
- Powerpac[™] Power Supply, BioRad Laboratories GmbH
- Sub-Cell[®] Model 96, BioRad Laboratories GmbH
- ThermoMixer[®] comfort, Eppendorf AG
- Vortex Genie[®] 2, Scientific Industries Inc.
- Wide Mini-Sub Cell[®], BioRad Laboratories GmbH
- Zentrifuge 5430, Eppendorf

2.2 Chemikalien, Puffer, Lösungen

- AccuPrime™ GC-Rich DNA Polymerase, Thermo Fisher Scientific Inc.
- Agarose low EEO (Agarose Standard), AppliChem GmbH
- BioTherm™ Taq DNA Polymerase, GeneCraft
- Bromphenolblau, Sigma-Aldrich
- Desoxyribonukleosidtriphosphate (dNTPs) (10 mM), Labomedic GmbH
- DNA-Längenstandards 100 bp und 1 kb, GeneCraft
- Ethanol absolut (EtOH, 100 %), AppliChem GmbH
- Ethidiumbromid-Lösung (1 %), Merck KGaA
- Ethylendiamintetraacetat (EDTA), Merck KGaA
- Exonuklease I, Thermo Fisher Scientific Inc.
- FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase, Thermo Fisher Scientific Inc.
- HPLC-Wasser, Merck KGaA
- Isopropanol, AppliChem GmbH
- Natriumdodecylsulfat (SDS), Sigma-Aldrich
- Polymerasekettenreaktion (PCR)-Puffer (10x) mit MgCl₂ (15 mM), Qiagen GmbH
- Proteinase K, Qiagen GmbH
- QIAzol Lysis Reagent, Qiagen GmbH
- RNAlater®, Qiagen GmbH
- Tris-EDTA (TE⁻⁴)-Puffer, AppliChem
- Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer (10x), AppliChem

2.3 Kommerzielle Systeme (Kits)

- Agencourt® CleanSEQ®- Kit, Beckman-Coulter GmbH
- BigDye™ Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit, Thermo Fisher Scientific GmbH
- EvaGreen-qPCR-Mix II®, Roche
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit, Life Technologies GmbH
- Infinium® PsychArray-24 v1.1 BeadChip, Illumina
- miRNeasy® Mini Kit, Qiagen GmbH
- QIAamp® DNA Blood Maxi Kit, Qiagen GmbH

2.4 Oligonukleotide (Primer)

Die für diese Arbeit verwendeten Primer wurden alle von der Firma Metabion in einer Konzentration von 100 pmol/l bezogen und in Aqua bidest zu einer Endkonzentration von 10 pmol/l gelöst. Die Sequenzen der verwendeten Oligonukleotide sind in Tabelle 12 des Anhangs aufgeführt.

2.5 Software und Datenbanken

- Chromas Version 2.6.6, Technelysium Pty Ltd.
- EasyLINKAGE, Lindner und Hoffmann (<https://www.uniklinikum-leipzig.de/einrichtungen/medizinische-klinik-3/Seiten/easylinkage-download.aspx>)
- Ensembl genome browser (<https://www.ensembl.org/index.html>)
- GeneCards (<https://www.genecards.org/>)
- Genexpressionsdatenbank des Linnarsson Lab (<http://linnarssonlab.org/epidermis/>)
- Genome Aggregation Database (<https://gnomad.broadinstitute.org/>)
- NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)
- SeqMan™ II, DNASTAR
- STRING database (<https://string-db.org/>)
- UCSC (<https://genome.ucsc.edu/>)
- Varbank (<https://varbank.ccg.uni-koeln.de/>)

2.6 DNA-Extraktion aus Blut

Die Isolierung der Desoxyribonukleinsäure (DNA) erfolgte aus humanem Vollblut. Hierzu erfolgte zunächst die Zugabe von 35 ml Lysispuffer, um die vollständige Lyse der Erythrozyten zu erreichen. Nach Zentrifugation wurden 320 µl 10%iges SDS und 160 µl Proteinase K hinzugefügt und über Nacht im Wasserbad bei 37 °C inkubiert. Im Anschluss erfolgte die Zugabe von 1,6 ml Natriumchlorid (NaCl). Nach erneuter Zentrifugation wurde der Überstand mit 2,5 ml Isopropanol gemischt, bis die DNA sichtbar wurde. Die gewonnene DNA wurde abschließend in 70%igem Ethanol gereinigt. Die DNA-Stocklösung wurde mit TE⁴-Puffer bis zu einer Konzentration von 100 ng/ml verdünnt und bei -20 °C gelagert.

2.7 Polymerasekettenreaktion

Die PCR wurde 1986 von Kary B. Mullis eingeführt und ermöglicht die Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen (Mullis et al., 1986). Als Template für eine PCR können genomische DNA, Plasmid-DNA oder komplementäre DNA (cDNA) dienen. Das typische PCR-Programm besteht aus der zyklischen Abfolge von drei Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation. Die Denaturierung bei 94 °C dient der Trennung des DNA-Doppelstranges. Im Anschluss wird die Temperatur auf 55-65 °C gesenkt, um die Hybridisierung der Oligonukleotidprimer, die den zu amplifizierenden Abschnitt einrahmen, an das einzelsträngige DNA-Template zu ermöglichen. Die Temperatur richtet sich nach der individuellen Annealing-Temperatur, die sich abhängig von den Primer-Sequenzen berechnen lässt. Ausgehend von der Energie, die zum Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen aufgebracht werden muss, werden Adenin (A) und Thymin (T) mit 2 °C und Cytosin (C) und Guanin (G) mit 4 °C berechnet:

$$T = 2\text{ °C} * (\text{Anzahl A und T}) + 4\text{ °C} * (\text{Anzahl C und G}).$$

Die Annealing-Temperatur sollte 5 °C niedriger als der errechnete Wert gewählt werden, um sicherzugehen, dass die Primer hybridisieren (Arnemann, 2019). Im letzten Schritt, der Elongation, setzt die hinzugegebene DNA-Polymerase an den 3'-OH-Enden der Primer an und synthetisiert die komplementären Sequenzen aus dNTPs. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des Templates. Diese Abfolge wird 30-35 Mal wie-

derholt, sodass der DNA-Abschnitt exponentiell vervielfältigt wird. Der Erfolg der Amplifikation wird durch Auftrennung der PCR-Produkte mittels Gelelektrophorese überprüft. Tabelle 3 zeigt das für die vorliegende Arbeit verwendete Standardprogramm für die PCR. In Tabelle 1 und 2 sind die Reaktionsansätze für die Taq-Polymerase (siehe Tabelle 1) und die AccuPrime™ GC-Rich DNA Polymerase (siehe Tabelle 2) aufgeführt. Die für die vorliegende Arbeit verwendeten Primersequenzen sind in Tabelle 12 im Anhang aufgelistet.

Tab. 1: Reaktionsansatz mit Taq-Polymerase

PCR-Reagenzien	Mengenangabe [µl]
10x MgCl Puffer	2,5
2 mM dNTPs	2,0
Primer F (10 pmol)	1,0
Primer R (10 pmol)	1,0
Taq-Polymerase (5 U/µl)	0,1
DNA (20 ng/µl)	2,0
H ₂ O	16,4
Gesamtvolumen	25,0

Tab. 2: Reaktionsansatz mit AccuPrime™ GC-Rich DNA Polymerase

PCR-Reagenzien	Mengenangabe [µl]
5x AccuPrime GC-Rich Puffer	5,0
Primer F (10 pmol)	1,0
Primer R (10 pmol)	1,0
AccuPrime GC-Rich DNA Polymerase (2U/µl)	0,5
DNA (20 ng/µl)	2,0
H ₂ O	15,5
Gesamtvolumen	25,0

Tab. 3: Allgemeines PCR-Programm

Zyklen	Temperatur	Zeit	Prozess
1	95 °C	5 min	Initiale Denaturierung
30-35	95 °C	30 s	Denaturierung
	x (abhängig von dem verwendeten Primer)	30 s	Hybridisierung
	72 °C	1 min/1 kb	Elongation
1	72 °C	10 min	Finale Elongation
1	4 °C	unendlich	Abkühlung

2.8 Konzentrations- und Qualitätsbestimmung von Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Konzentration einer Nukleinsäure-Lösung wurde die optische Dichte (OD) photometrisch mittels Nanodrop-Spektrophotometer (Thermo Fisher Scientific) gemessen. Das Absorptionsmaximum von Nukleinsäuren liegt bei 260 nm. Wird bei einer Wellenlänge von 260 nm eine OD von 1 gemessen, entspricht dies einer Konzentration von 50 µg/ml doppelsträngiger DNA, 40 µg/ml einzelsträngiger DNA und 33 µg/ml einzelsträngiger RNA. Das Absorptionsmaximum von Proteinen liegt bei 280 nm. Deshalb kann durch Bildung des Quotienten OD_{260}/OD_{280} die Reinheit einer Nukleinsäure-Lösung bestimmt werden. Eine reine DNA-Lösung weist einen Quotienten von 1,8 auf und eine reine RNA-Lösung einen Quotienten von 2,0. Ein kleinerer Wert von OD_{260}/OD_{280} ist ein Indikator für eine Verunreinigung (Lottspeich und Engels, 2012).

2.8.1 Auftrennung der PCR-Produkte

Zur Auftrennung der PCR-Produkte wurde die Agarose-Gelelektrophorese verwendet. Hierbei gebraucht man ein elektrisches Feld in Kombination mit dem Molekularsiebefekt. Dieser entsteht durch Bildung von Poren in der Agarose beim Erstarren, durch die Nukleinsäuren zu den jeweiligen Polen im elektrischen Feld wandern. Die DNA ist durch ihre Phosphatgruppen negativ geladen und wandert somit zu der Anode. Die Wandergeschwindigkeit linearer DNA ist dabei abhängig von der Größe der Fragmente, der angelegten Spannung und der Porengröße, die sich durch die Agarose-

Konzentration regulieren lässt. In der vorliegenden Arbeit lag die angelegte Spannung bei 120 V. Kurze DNA-Fragmente wandern dabei schneller als lange.

Da die DNA-Fragmente nativ nicht sichtbar sind, müssen sie mit Ethidiumbromid angefärbt werden. Dies erzeugt unter Ultraviolett (UV)-Licht sichtbare Banden. Zur Herstellung eines 1,5%igen Agarose-Gels wurden 1,5 g Agarose in 100 ml 1x TBE-Puffer vollständig gelöst und 7,5 µl 1%iges Ethidiumbromid hinzugefügt. Die Lösung wurde in einen Gelträger gefüllt und bis zum Erstarren gelagert. Das fertige Gel wurde anschließend in eine mit 1x TBE-Puffer gefüllte Elektrophorese-Kammer gelegt. 5 µl der aufzutrennenden PCR-Probe wurden zusammen mit Bromphenolblau auf das Gel aufgetragen. Die Länge der aufgetragenen Fragmente wurde nach 30 Minuten unter UV-Licht im Vergleich zu separat aufgetragenen DNA-Leitern als Längenstandard abgelesen.

2.8.2 Exonuclease-Phosphatase-Verdau

Nach der PCR-Reaktion mussten überschüssige Mengen Primer und Nukleotide entfernt werden, die im weiteren Verlauf bei der Sequenzierung stören könnten. Dies erfolgte in der vorliegenden Arbeit mittels Exol/FastAP-Verdau, wobei die Exonuclease I überschüssige Primer verdaut und die alkalische Phosphatase verbliebene dNTPs hydrolysiert. Beide Enzyme wurden durch die Inkubation bei 85 °C über 10 Minuten inaktiviert, sodass ein Entfernen aus dem Reaktionsansatz später nicht erforderlich war. Für den Exol/FastAP-Verdau wurden folgender Reaktionsansatz und PCR-Programm gewählt:

Tab. 4: Reaktionsansatz für Exol/FastAP-Verdau

PCR-Reagenzien	Mengenangabe [µl]
FastAP Puffer	1,2
FastAP Enzym	2,0
Exol	0,2
PCR-Produkt	4,0
H ₂ O	4,6
Gesamtvolumen	12,0

Tab. 5: PCR-Programm Verdau

Zyklen	Temperatur	Zeit
1	37 °C	30 min
1	85 °C	10 min
1	4 °C	unendlich

2.9 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierung ermöglicht die Bestimmung der Nukleotid-Abfolge in einem DNA-Molekül. In der vorliegenden Arbeit wurde die nicht-radioaktive Sequenzierung nach Sanger in Kombination mit einem automatischen Sequenziergerät angewendet. Hierbei wurden dem Reaktionsansatz zusätzlich fluoreszenzmarkierte Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) hinzugefügt, die keine 3'-Hydroxygruppe besitzen, welche für die Kondensation mit dem Phosphat des nächsten dNTPs benötigt wird. Dies führt somit zu einem zufälligen Abbruch der Synthese entsprechend der passenden Base an einer spezifischen Stelle. Es resultieren mehrere Produkte unterschiedlicher Größe aus den Kettenabbruchreaktionen (Sanger et al., 1977). Diese können durch Elektrophorese wie oben beschrieben nach Größe aufgetrennt werden. Die Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe mit einem Laser ermöglicht die Differenzierung zwischen den vier Basen, sodass die genaue Reihenfolge der Nukleotide bestimmt werden kann. Die Sequenzierreaktion wurde mit einem automatischen DNA-Sequenzierautomaten (3130xl Genetic Analyzer, Life Technologies Corporation) durchgeführt. Folgender Reaktionsansatz und PCR-Programm wurden bei der vorliegenden Arbeit für die Sequenzierreaktionen verwendet:

Tab. 6: Reaktionsansatz für Sequenzierreaktion

PCR-Reagenzien	Mengenangabe [μ l]
5x Big Dye Puffer	2,0
Big Dye Terminator	0,5
Oligonukleotid-Primer (10 pmol/ μ l)	0,3
PCR-Produkt aus Verdau	2,5
H ₂ O	4,7
Gesamtvolumen	10,0

Tab. 7: PCR-Programm Sequenzierreaktion

Zyklen	Temperatur	Zeit	Prozess
1	96 °C	1 min	Initiale Denaturierung
24	96 °C	10 s	Denaturierung
	50 °C	5 s	Primer-Hybridisierung
	60 °C	2 min	Elongation mit Abbrüchen
1	12 °C	unendlich	Abkühlung

Nach der Sequenzierreaktion wurden die Proben aufgereinigt, um Kontaminanten zu verhindern und die Signalintensität in der nachfolgenden Analyse zu verstärken. In der vorliegenden Arbeit wurde das Agencourt® CleanSEQ®- Kit (Beckman Coulter) zur Aufreinigung verwendet. Hierbei wurden magnetische Beads und 85%iges Ethanol hinzugegeben und auf einer Magnetplatte inkubiert. Nach mehrmaligem Entfernen und erneutem Hinzugeben von Ethanol wurde es schließlich vollständig entfernt. Die Proben wurden dann mit HPLC-Wasser verdünnt auf eine 96-Well-Sequenzierplatte pipettiert und in den Sequenzierautomaten gegeben. Anschließend wurden die Ergebnisse im Vergleich zu Referenzsequenzen mit den Programmen Chromas und SeqMan II ausgewertet.

2.10 RNA-Extraktion aus Haarfollikeln

Ribonukleinsäure (RNA) ist weniger stabil als DNA. Aufgrund der hohen Stabilität der Ribonuklease (RNase) besteht die Gefahr des enzymatischen Abbaus und der Hydrolyse der Phosphodiesterbindungen in der RNA. Deshalb sollte bei der Arbeit mit RNA besonders vorsichtig und sorgfältig umgegangen werden und ein möglichst RNase-freier Arbeitsplatz gewählt werden.

Arbeitsplatz und Pipetten wurden mit 70%igem Ethanol gereinigt und für die Pipettierarbeiten wurden RNase-freie Filter-Pipettenspitzen und RNase-freies Wasser genutzt. Außerdem sollte immer auf Eis gearbeitet werden, um die RNase Aktivität zu hemmen. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die RNA-Extraktion aus Haarfollikeln mit Hilfe des miRNeasy[®]Mini Kit von Qiagen durchgeführt. Hierzu wurden 15-20 Kopfhare entnommen und die Haarfollikel nach dem Abschneiden der distalen Haarschäfte in mit RNAlater[®]- Lösung gefüllte Precellys Ceramic Kit-Tubes überführt. Die Lösung stabilisiert RNA und ermöglicht die Lagerung der Proben bei 4 °C über mehrere Tage bis zur weiteren Verarbeitung. Das Prinzip des Verfahrens ist die Bindung der RNA an eine Silica-Membran. Die Extraktion erfolgte nach dem vom Hersteller empfohlenen Schema. Nach Zentrifugation wurden die Haarfollikel mit 700 µl QIAzol[®] Lyse lysiert. Nach Zugabe von 140 µl Chloroform und Zentrifugation über 15 Minuten wurde die obere wässrige Phase in ein neues Reaktionsgefäß übertragen und 100%iges Ethanol hinzugefügt. Die Probe wurde dann auf eine RNeasy[®]Mini column Membran pipettiert und zentrifugiert. Im Anschluss wurden RWT- und RPE-Puffer hinzugefügt. Jeweils nach Zentrifugation wurde der Durchlauf entfernt. Im Anschluss wurde RNase-freies Wasser hinzugegeben und abschließend zur Elution der RNA zentrifugiert. Die gewonnene RNA wurde bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

2.11 cDNA-Synthese aus RNA

Damit RNA-Moleküle als Template in einer PCR eingesetzt werden können, müssen sie zunächst mit Hilfe der reversen Transkriptase (RT)-PCR in cDNA umgewandelt werden. Die RNA ist im Gegensatz zur ursprünglichen DNA einzelsträngig und enthält, nachdem sie den Splicing-Prozess durchlaufen hat, keine Introns.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde die cDNA-Synthese mit Hilfe des *High-*

Capacity cDNA Reverse Transkription-Kits von Life Technologies GmbH durchgeführt. Hierzu wurden zu 300 ng RNA zunächst MultiScribe[®] Reverse Transkriptase (1 µl), RNase Inhibitor (1 µl), 10x RT Random Primer (2 µl), 25x dNTP Mix (11 mM; 0,8 µl), 10x RT Buffer (2 µl) hinzugefügt und mit RNase-freiem Wasser auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Ansatz wurde im ersten Schritt 10 Minuten bei 25 °C inkubiert, danach 120 Minuten bei 37 °C inkubiert und im letzten Schritt, zum Beenden der Reaktion, 5 Minuten auf 85 °C erhitzt.

Die entstandene cDNA lag in einer Konzentration von 50 ng/µl vor und wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20 °C gelagert. Sie kann in anschließenden PCRs amplifiziert werden.

2.12 Kopplungsanalyse

Die Linkage-Analyse oder auch Kopplungsanalyse ist eine Methode zur Identifikation und Lokalisation krankheitsverursachender Allele. Dabei wird geprüft, ob bestimmte Allele oder Marker eines Polymorphismus mit einem Phänotyp kosegregieren.

Die Vererbung von Merkmalen nach Mendels Uniformitätsregel wurde 1906 von Bateson et al. und später von Morgan widerlegt, indem sie zeigten, dass Allele verschiedener Gene nicht zwingend unabhängig voneinander, sondern auch miteinander gekoppelt vererbt werden können (Bateson et al., 1906; Morgan, 1917). Gene, die auf einem Chromosom nah beieinander liegen, werden überzufällig häufig gemeinsam vererbt und nicht durch Rekombinationsereignisse in der Meiose getrennt. Das mit dem Phänotyp kosegregierende Allel muss dementsprechend nicht das krankheitsverursachende sein, sondern kann auch ein Marker sein, der mit ebendiesem Gen gekoppelt vererbt wird. Solche Marker, die für eine Kopplungsanalyse verwendet werden können, müssen polymorph und ihr Ort im Genom bekannt sein.

Die Wahrscheinlichkeit, dass zwei Loci, ein Marker und ein krankheitsrelevanter Genort, gekoppelt vererbt werden, wird als Rekombinationshäufigkeit θ bezeichnet. Bei jedem Crossing-over während der Meiose werden immer nur zwei der vier Chromatiden gekreuzt, weshalb der maximale Anteil an Rekombinanten pro Meiose nur 50 % beträgt. Zwei Loci, die unabhängig voneinander vererbt werden und nicht gekoppelt sind, weisen dementsprechend eine Rekombinationshäufigkeit von 50 % ($\theta=0,5$) auf. Man spricht von freier Rekombination. Die Einheit der Rekombinationshäufigkeit ist ein Centimorgan

(cM), das einem physikalischen Abstand von einer Millionen Basenpaaren und einer Wahrscheinlichkeit der Rekombination von 1 % pro Meiose entspricht (Strachan und Read, 2005).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine parametrische Zweipunktanalyse mit der Software easyLINKAGE[®] und dem Programm SuperLink v1.6 durchgeführt (Lindner und Hoffmann, 2005). Hierbei müssen vorab Angaben zum Erbgang, der angenommenen Frequenz des krankheitsverursachenden Allels und der Penetranz gemacht werden. Aufgrund des Stammbaums wurde von einer dominanten Vererbung des krankheitsverursachenden Gens ausgegangen.

Als Maß zur Quantifizierung der Wahrscheinlichkeit einer Kopplung wird der LOD-Score verwendet:

$$LOD - Score = \lg \frac{\text{Rekombinationshäufigkeit } \theta, \text{ bei der zwei Loci gekoppelt sind}}{\text{Rekombinationshäufigkeit bei freier Rekombination } (\theta = 0,5)}$$

Nimmt dieser LOD-Score einen Wert ≥ 3 an, ist die Wahrscheinlichkeit, dass Kopplung besteht, gegenüber freier Rekombination dementsprechend 1000:1. Es kann von einer Kopplung ausgegangen werden. Ist der LOD-Score < -2 kann eine Kopplung hingegen ausgeschlossen werden (Pulst, 1999).

Loci auf den Gonosomen stellen eine Besonderheit dar. Hier kann nur Rekombination stattfinden, wenn zwei X-Chromosomen vorhanden sind. Hiervon ausgenommen sind kleine pseudoautosomale Regionen an den Telomeren des X- und Y-Chromosoms (Bickeböller und Fischer, 2007). Dadurch steigt die a priori Wahrscheinlichkeit für Kopplung. Bei X-chromosomaler Vererbung wird Kopplung dementsprechend schon bei LOD-Scores ≥ 2 beziehungsweise $\geq 2,3$ angenommen (Bickeböller und Fischer, 2007; Strachan und Read, 2005).

Für die vorliegende Arbeit wurden Einzelnukleotid-Polymorphismen (SNPs) als Marker verwendet. Häufig kommen auch Restriktionsfragment-Längenpolymorphismen, Minisatelliten oder Mikrosatelliten zur Anwendung (Strachan und Read, 2005).

Die SNP-Genotypisierung der zu untersuchenden Familie wurde im Vorfeld mit dem Infinium[®]PsychArray-24 v1.1 BeadChip von Illumina mit 588.628 Markern durchgeführt. Diese Marker (SNPs), deren Positionen bekannt sind, dienen zur Erstellung einer Markerrahmenkarte, die dann zusammen mit den Ergebnissen der SNP-

Genotypisierung und dem Stammbaum der Familie für die Analyse verwendet wird. Marker, die nahe am Krankheitsgen liegen, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit mit diesem gekoppelt sein und dementsprechend in der Linkage-Analyse durch einen hohen LOD-Score auffallen. Durch genaue Untersuchung der Loci mit hohen LOD-Scores kann das Krankheitsgen identifiziert werden (Strachan und Read, 2005). Dies geschah in der vorliegenden Arbeit durch den Vergleich der entsprechenden Regionen mit den Ergebnissen des WES.

2.13 Whole-Exome-Sequenzierung

In der vorliegenden Arbeit wurden die Exome von vier Individuen (III:7, III:8, III:9 und III:11) mittels NGS sequenziert. Die Technologie des NGS bietet die Möglichkeit, mehrere Tausend Sequenzierreaktionen parallel und automatisiert ablaufen zu lassen. Es können zwei Methoden unterschieden werden: einerseits *Whole-Genome-Sequencing* (WGS), wobei das gesamte Genom sequenziert wird, und andererseits *Whole-Exome-Sequencing* (WES), das die gesonderte Sequenzierung der Proteinkodierenden Bereiche ermöglicht, also nur weniger als zwei Prozent des menschlichen Genoms (Strachan und Read, 2005).

Für die vorliegende Arbeit wurde die Sequenzierung vom Cologne Center for Genomics an der Universität zu Köln mit dem Illumina HiSeq™ 2000 nach dem Prinzip *Sequencing by synthesis* durchgeführt.

Zunächst wird die genomische DNA zufällig in einzelne Fragmente geschnitten, aus denen eine Sequenzierbibliothek erstellt wird. Die Enden der Fragmente werden mit Oligonukleotid-Adaptoren verknüpft. Im zweiten Schritt, der sogenannten *Cluster* Generation, werden die mit Adaptoren verknüpften Fragmente auf eine *flow cell*-Oberfläche gegeben. Auf dieser *flow cell*-Oberfläche sind zwei unterschiedliche Formen von Oligonukleotiden fixiert, die komplementär zu den Adaptoren an den Enden der Fragmente sind. Dies ermöglicht eine Hybridisierung der Fragmente an die *flow cell*-Oberfläche. Durch Bindung beider Enden entstehen Brücken, an denen entlang Polymerasen die Fragmente amplifizieren. Im Anschluss können die auf der *flow cell*-Oberfläche fixierten amplifizierten Fragmente parallel sequenziert werden. Hierzu werden fluoreszenzmarkierte Nukleotide verwendet, durch deren Emission die Basen identifiziert werden können. Durch Abgleich mit Referenzgenomen werden die einzelnen

sequenzierten Fragmente geordnet (Illumina, 2017). Der Vergleich mit Referenzgenomen ermöglicht ebenso die Identifizierung von Einzelbasen-Sequenzvarianten. Hierzu wurde in dieser Arbeit das vom *Genome Reference Consortium* veröffentlichte Referenzgenom *GRCh37* verwendet. Durchschnittlich können ca. 20.000-24.000 Varianten gefunden werden, wovon mehr als 95 % bereits bekannte, nicht krankheitsverursachende Polymorphismen sind (Bamshad et al., 2011). Deshalb erfolgte im Anschluss eine Analyse der Sequenzvarianten über die Plattform *varbank*, die 2012 am Cologne Center for Genomics an der Universität zu Köln entwickelt wurde. Diese Plattform ermöglicht das Filtern der Varianten nach bestimmten Parametern, aber auch, wie in der vorliegenden Arbeit, den Vergleich von Daten der Exom-Sequenzierung verschiedener Individuen, um gemeinsame Varianten herauszufiltern. Die entsprechenden Varianten wurden im Anschluss mittels Sanger-Sequenzierung validiert.

2.14 Quantitative PCR

Zur Beantwortung der Frage, ob und wie viel des Zielgens im Haarfollikel exprimiert wird, wurde die quantitative PCR (qPCR) angewendet.

Das Prinzip ähnelt dem einer PCR, jedoch erfolgt die Zugabe von EvaGreen-qPCR-Mix II[®] von Roche. Eva Green[®] ist ein fluoreszierender asymmetrischer Farbstoff, der an doppelsträngige DNA bindet. Die Fluoreszenzintensität durch die Interaktion von cDNA und Eva Green[®] kann nach jedem Reaktionszyklus detektiert und gemessen werden. So können Rückschlüsse auf die Höhe der Expression eines Gens in einem Zielgewebe gemacht werden. Zur absoluten Quantifizierung erfolgt zunächst die Generierung einer Verdünnungsreihe als Standardreihe. Im Anschluss kann durch Vergleich der C_T-Werte der Standards und der Probe auf die absolute Quantität der Probe geschlossen werden. Der C_T-Wert beschreibt den Anfang des exponentiellen Wachstums der Amplifikationskurve (Jansohn und Rothhämel, 2012).

In der vorliegenden Arbeit erfolgte die Durchführung und Analyse der qPCR mit dem LightCycler[®] 480 II von Roche. Der für diese Arbeit verwendete qPCR-Reaktionsansatz ist in Tabelle 8 aufgeführt. Tabelle 9 zeigt das verwendete qPCR-Programm im LightCycler[®] 480 II.

Tab. 8: Reaktionsansatz für qPCR

PCR-Reagenzien	Mengenangabe [µl]
RNAse-freies Wasser	6,4
5x EvaGreen qPCR-Mix II	2,0
Primer F	0,3
Primer R	0,3
cDNA	1,0
Gesamtvolumen	10,0

Tab. 9: qPCR-Programm mit Eva-Green qPCR-Mix II

Zyklen	Temperatur	Zeit	Prozess
1	95 °C	10 min	Denaturierung
40	95 °C	10 s	Amplifikation
	60 °C	15 s	
	72 °C	15 s	
1	95 °C	10 s	Erstellung der Schmelzkurve
	45 °C	30 s	
	80 °C	-	
1	40 °C	120 s	Abkühlung

3. Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollte die molekulargenetische Ursache für eine isolierte, dominant vererbte Form der Hypotrichose identifiziert werden. Hierzu wurde zunächst eine Kopplungsanalyse und im Anschluss Exomsequenzierungen von vier Mitgliedern einer großen Familie chinesischen Ursprungs durchgeführt.

3.1 Klinische Vorstellung der untersuchten Familie

Das Ziel der vorliegenden Doktorarbeit ist die Identifizierung der molekulargenetischen Ursache für eine isolierte, autosomal-dominant vererbte Form der Hypotrichose. In Zusammenarbeit mit dem Dermatologen Professor Frédéric Caux vom *Avicenne Hospital & University Graduate School of Medicine* in Paris standen Blutproben von neun Familienmitgliedern einer großen, aus China stammenden Familie (siehe Abbildung 8 im Anhang) als Untersuchungsmaterial zur Verfügung. Abbildung 2 zeigt einen Ausschnitt des Stammbaums mit den Familienmitgliedern, die Teil der vorliegenden Arbeit waren. Weitere betroffene Familienmitglieder konnten zur Blutentnahme und klinischen Untersuchung nicht kontaktiert werden.

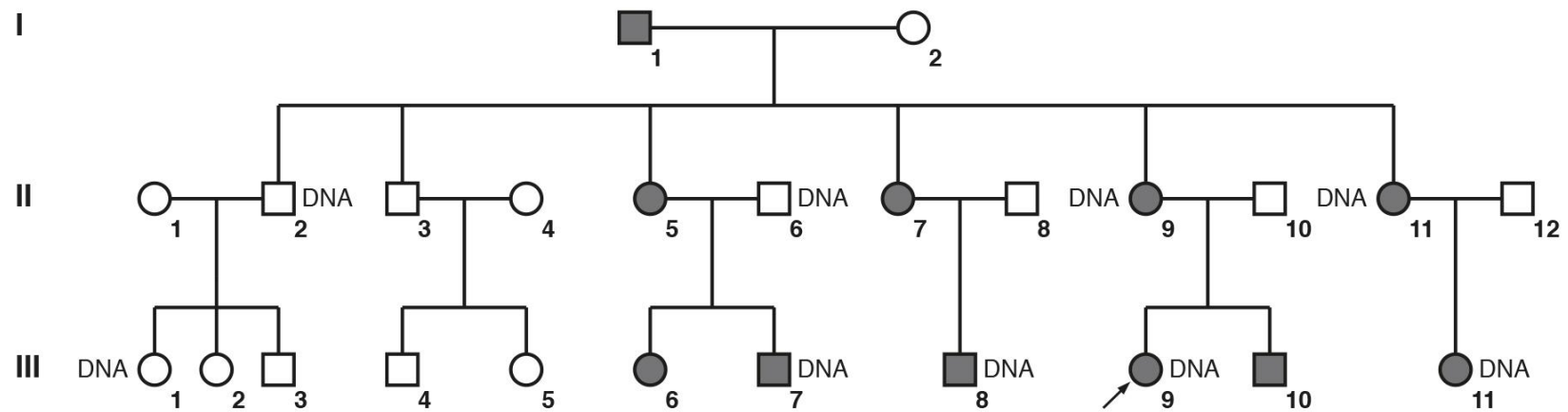


Abb. 2: Stammbaum der Familie (Ausschnitt). Dargestellt ist ein Ausschnitt des Stammbaums mit dem Teil der Familie, zu dem für die vorliegende Arbeit Kontakt bestand. Der gesamte Stammbaum ist im Anhang in Abbildung 8 abgebildet. Kreise stellen weibliche, Quadrate männliche Familienmitglieder dar. Dunkel ausgefüllte Kreise bzw. Quadrate zeigen betroffene Individuen. Nicht betroffene Individuen sind durch nicht ausgefüllte Kreise bzw. Quadrate dargestellt. Die Indexpatientin (III:9) ist mit einem Pfeil markiert. Von den mit "DNA" markierten Familienmitgliedern stand für die vorliegende Arbeit Untersuchungsmaterial zur Verfügung.

Von diesen neun Familienmitgliedern sind sechs von der Hypotrichose betroffen; zwei männliche und vier weibliche. Klinisch zeigten die betroffenen Individuen schon kurz nach der Geburt haarlose Stellen an der Kopfhaut und litten ab dem vierten Lebensjahr in zyklischen Perioden unter Haarverlust. Im Erwachsenenalter zeigt die Kopfhaut größere Areale vernarbender Alopezie. Sie haben nur spärliche Augenbrauen und Schambehaarung sowie fehlende Axillenbehaarung. Nägel und Zähne sind unauffällig. Abbildung 3 zeigt den klinischen Phänotyp der Indexpatientin III:9. Aufgrund dieses, mit Ausnahme der vernarbenden Alopezie, für die Hypotrichosis Typ Marie Unna typischen Phänotyps wurde zunächst klinisch ebenjene Diagnose gestellt. Aufgrund der großen Anzahl betroffener Individuen in der Familie kann von einem dominanten Erbgang ausgegangen werden.



Abb. 3: Fotos von der Indexpatientin III:9.

3.2 Sequenzierung bereits bekannter Genorte

Aufgrund der klinischen Verdachtsdiagnose der autosomal-dominant vererbten Hypotrichosis Typ Marie Unna wurden zunächst die hierfür bereits bekannten Genorte sequenziert. Dabei wurden keine Mutationen in *U2HR* und *EPS8L3* gefunden. Aus diesem Grund und auch weil die klinische Unterscheidung der einzelnen Hypotrichose-Formen nicht immer eindeutig ist (siehe Kapitel 1.5), wurden zusätzlich die für die autosomal-dominante Hypotrichosis und Monilethrix bekannten Gene sequenziert (siehe Tabelle 10). Hierbei wurden keine Mutationen gefunden, sodass die vorliegende Arbeit mit dem Ziel begonnen wurde, ein bisher unbekanntes, für die Hypotrichose ursächliches Gen zu identifizieren.

Tab. 10: Vor der vorliegenden Arbeit ausgeschlossene Mutationen

Gen	Lokalisation
APCDD1	18p11
CDH3	16q22.1
CDSN	6p21.3
EPS8L3	1p13
KRT71	12q13
KRT74	12q13
KRT81 (nur beschriebene Regionen)	12q13
KRT83 (nur beschriebene Regionen)	12q13
KRT85	12q13
KRT86 (nur beschriebene Regionen)	12q13
RPL21	13q12
SNRPE	2p25-2p23
SORBS2	4q35
U2HR	8p21

3.3 Einengung des Genortes mittels Kopplungsanalyse

Um den möglichen Genort anhand von SNPs als Marker einzugrenzen, wurde eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Marker, die in der Kopplungsanalyse durch einen hohen LOD-Score auffallen, werden mit hoher Wahrscheinlichkeit mit dem krankheitsverursachenden Gen gekoppelt vererbt und liegen in dessen Nähe. Die Kopplungsanalyse wurde mit der Software easyLINKAGE[®] durchgeführt (siehe Kapitel 2.12) (Lindner und Hoffmann, 2005).

In der durchgeführten Analyse konnte für keinen Marker ein signifikanter LOD-Score mit einem Wert > 3 erreicht werden. Aufgrund der Größe der Familie beziehungsweise der geringen Anzahl für die vorliegende Arbeit zur Verfügung stehender Proben wurde ein maximaler LOD-Score von 1,8 erwartet (Ott et al., 2015). Die höchsten erreichten Werte waren jeweils 1,6425 und lagen auf dem Chromosom 1. Aus früheren Projekten haben wir die Erfahrung gemacht, dass ursächliche Mutationen häufig auch mit geringeren LOD-Scores als den signifikanten oder erwarteten Werten gekoppelt waren. Aus diesem Grund wurden alle Regionen der Marker, die mit LOD-Scores $\geq 1,5$ gekoppelt waren, genauer untersucht. Die entsprechenden Marker sind in der untenstehenden Tabelle 11 aufgeführt.

Diese Regionen wurden zur genaueren Untersuchung mit den Ergebnissen der Exomsequenzierung der Indexpatientin (III:9) verglichen. In keiner der Regionen und der unmittelbaren Umgebung wurde eine Mutation in der Exomsequenzierung nachgewiesen. Die Grenze für Kopplung bei X-chromosomal vererbten Varianten ist niedriger (siehe Abschnitt 2.12). Allerdings wurde in der durchgeführten Analyse für keinen der Marker auf dem X-Chromosom ein LOD-Score ≥ 2 angegeben. Der höchste erreichte LOD-Score war 1,0753. Das im Verlauf der Arbeit durch Exomsequenzierung als Kandidatengen identifizierte Cyclin-dependent-kinase-like 5 (CDKL5)-Gen liegt in der Nähe eines dieser Marker (rs16980730) mit einem LOD-Score von 1,0753.

Tab. 11: Marker mit LOD-Scores $\geq 1,5$

Marker	Chromosom	LOD-Score
rs6684718	1	1,6425
rs12127467	1	1,6425
rs9819610	3	1,5952
psy_rs11184331	1	1,5458
rs9835577	3	1,5457
rs9861213	3	1,5457
rs9868264	3	1,5457
rs11159460	14	1,5457
rs7149906	14	1,5457
rs1542966	14	1,5457
rs10130856	14	1,5457
rs1110774	14	1,5457

3.4 Mutationssuche mittels Exomsequenzierung

Wie beschrieben ergab die durchgeführte Kopplungsanalyse keine signifikanten Ergebnisse. Des Weiteren wurden in den Regionen mit den höchsten LOD-Scores keine Mutationen in der Exomsequenzierung gefunden. Auch in der näheren Umgebung lagen keine plausiblen Varianten. Aus diesem Grund wurden erneut Exomsequenzierungen von drei weiteren betroffenen Familienmitgliedern durchgeführt. So konnten im Rahmen der Auswertung mit der Plattform *varbank* alle Mutationen ausgeschlossen werden, die nicht bei allen vier betroffenen Familienmitgliedern nachgewiesen werden konnten.

Es wurden drei Varianten in unterschiedlichen Genen herausgefiltert, die bei allen vier betroffenen Individuen in der Exomsequenzierung vorlagen. Eine Punktmutation in Calsyntenin 1 (*CLSTN1*) (c.166G>A) auf Chromosom 1, eine Deletion im Zinkfingerprotein 185 (*ZNF185*) (c.475_495del(GAG)7ins(GAG)6) auf dem X-Chromosom und eine Frameshift-Deletion in *CDKL5* (c.3035_3044delAGGTAAACCA) auf dem X-Chromosom. Das Vorliegen der herausgefilterten Varianten wurde im Anschluss bei allen Familienmitgliedern mittels Sanger-Sequenzierung genauer untersucht.

Die Mutation in *CLSTN1* konnte bei allen betroffenen Individuen heterozygot nachgewiesen werden, bei zwei der nicht betroffenen Familienmitglieder wurde sie nicht gefunden. Allerdings war auch ein nicht betroffener Mann (III:7) für die Mutation heterozygot.

Die Deletion in *ZNF185* wurde in der Inhouse Datenbank des Cologne Center for Genomics gefunden und ist damit als ursächliches Gen für die Hypotrichose unwahrscheinlich.

Die Ergebnisse der Sequenzierung von *CDKL5* auf dem X-Chromosom sind in den unten stehenden Abbildungen dargestellt (siehe Abbildungen 4 - 6). Die Sequenzierung eines nicht betroffenen Individuums ist in Abbildung 4 gezeigt. Dies entspricht dem Wildtyp. Abbildung 5 zeigt das Ergebnis der Sequenzierung eines betroffenen weiblichen Familienmitglieds. Die Deletion ist, wie bei einem gonosomal-dominanten Erbgang zu erwarten, heterozygot vorhanden. Abbildung 6 dagegen zeigt das Sequenzierungsergebnis eines betroffenen männlichen Familienmitglieds, bei dem die auf dem X-Chromosom liegende Deletion hemizygot vorliegt und sich deshalb gut darstellen lässt.

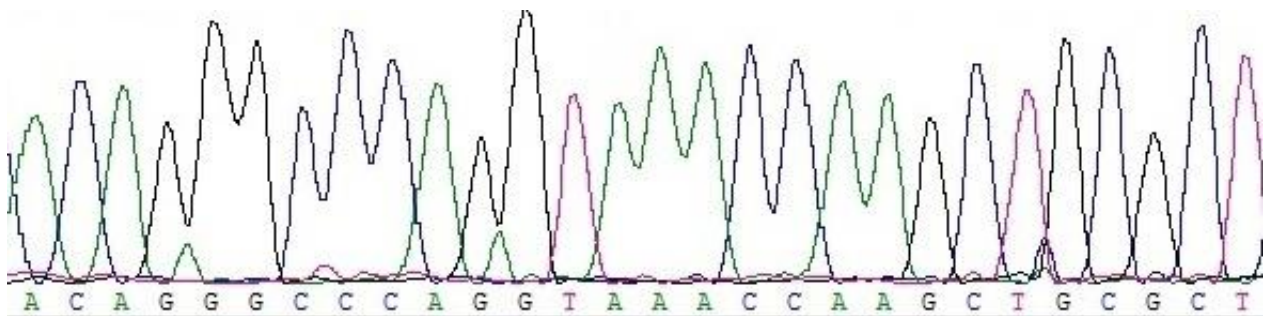


Abb. 4: Sequenzabfolge beim Wildtyp. Sequenzierung von *CDKL5* bei dem nicht betroffenen Individuum II:2. Die Sequenz entspricht dem Wildtyp.

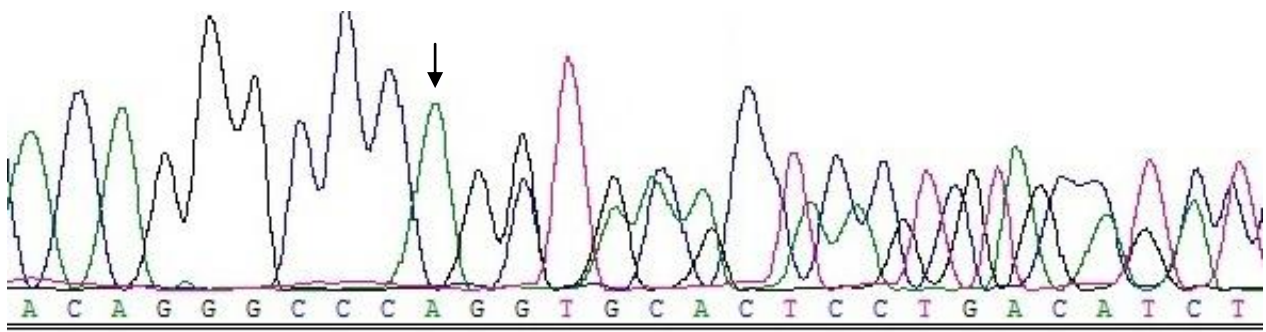


Abb. 5: Sequenzabfolge bei heterozygot vorliegender Mutation. Sequenzierung von *CDKL5* bei der Indexpatientin III:9. Die Deletion liegt nur auf einem Allel vor. Der Beginn der Deletion ist mit einem Pfeil markiert.

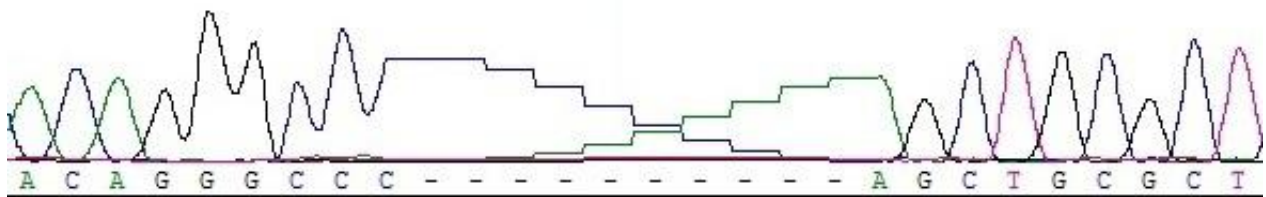


Abb. 6: Sequenzabfolge bei hemizygot vorliegender Mutation. Sequenzierung von *CDKL5* bei dem betroffenen männlichen Familienmitglied III:8. Die Deletion von zehn Basenpaaren (gekennzeichnet mit " — ") liegt hemizygot vor.

Durch die Sequenzierung aller neun Individuen konnte nachgewiesen werden, dass die Deletion bei allen Betroffenen vorhanden war. Bei den weiblichen Individuen lag sie in heterozygoter Form vor. Die nicht betroffenen Individuen zeigten alle den Wildtyp. In Datenbanken wie zum Beispiel der *Genome Aggregation Database* (gnomAD) (<https://gnomad.broadinstitute.org/>) wurde die Deletion bisher nicht beschrieben (Stand 07/2022). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde *CDKL5* als mögliches ursächliches Gen weiter verfolgt.

3.5 Expressionsanalyse des *CDKL5*-Gens

Mit der Sanger-Sequenzierung konnte nur *CDKL5* als plausibles Krankheitsgen identifiziert werden. Alle betroffenen Individuen trugen die Variante mit der Deletion, alle nicht betroffenen den Wildtyp. Einem X-chromosomal-dominanten Erbgang entsprechend trat die Mutation bei den weiblichen Individuen heterozygot, bei den männlichen hemizygot auf. Um *CDKL5* weiter als Kandidatengen zu bestätigen, wurde die Expression im Haarfollikel näher untersucht, da davon ausgegangen wurde, dass das für die Hypotrichose ursächliche Gen im Haarfollikel exprimiert sein muss. Die Genexpressionsdatenbanken, wie beispielsweise die vom *Linnarsson Lab* entwickelte Datenbank, deuten eine, wenn auch nur geringe, Expression in mehreren Kompartimenten des Haarfollikels an, vor allem in der Wulstregion (Joost et al., 2016; <http://linnarssonlab.org/epidermis/>). Diese Expression im Haarfollikel konnte im Rahmen der vorliegenden Arbeit jedoch nicht verifiziert werden. In einer durchgeführten qPCR mit Kontroll-cDNA von gesunden Probanden konnte keine Expression von *CDKL5* im Haarfollikel nachgewiesen werden.

4. Diskussion

4.1 Vererbungsmodus und Phänotyp

Aufgrund der hohen Anzahl betroffener Individuen in der Familie (siehe Abbildung 8 im Anhang) kann von einer dominanten Vererbung der pathogenen Variante ausgegangen werden. Für die vorliegende Arbeit lagen Proben von neun Familienmitgliedern vor. Ein Ausschnitt des Stammbaums, der die genauer untersuchten neun Individuen abbildet, ist in Abbildung 2 dargestellt. Wenn nur die für die vorliegende Arbeit untersuchten Individuen betrachtet werden, ist sowohl eine autosomale als auch eine X-chromosomale Vererbung denkbar. Wird allerdings der große Stammbaum der gesamten Familie betrachtet (siehe Abbildung 8), gibt es einige Stellen, an denen eine X-chromosomale Vererbung nicht plausibel ist. Die Konstellation eines betroffenen Vaters mit nicht betroffenen Töchtern ist mit einer dominanten X-chromosomalen Vererbung nicht vereinbar. Auch in dem Ausschnitt des Stammbaums sind zwei Tanten (II:13 und II:14) der Indexpatientin (III:9) abgebildet, die als nicht betroffen angegeben sind, wobei ihr Vater betroffen ist. Allerdings muss dabei bedacht werden, dass die in Abbildung 2 mit "DNA" markierten Individuen und deren engste Angehörige die einzigen Mitglieder der Familie sind, die uns für die vorliegende Arbeit für klinische Untersuchungen und Probenentnahme zur Verfügung standen. Sie wurden im Rahmen der vorliegenden Arbeit von dem Dermatologen Professor Frédéric Caux ausführlich untersucht. Die zwei Tanten (II:13 und II:14) der Indexpatientin (III:9) sowie ein großer Teil der weiteren Familienmitglieder leben noch in China und standen uns für die vorliegende Arbeit nicht zur Verfügung. Die Diagnosen und Phänotypen wurden dementsprechend nicht durch den mit uns zusammen arbeitenden Dermatologen gestellt, sondern durch die Indexpatientin mündlich überliefert.

Die Erstellung eines präzisen Stammbaums mit richtigen Phänotypbeschreibungen und Verwandtschaftsverhältnissen ist nicht einfach, vor allem bei großen Familien über mehrere Generationen, die räumlich weit getrennt leben. Ein Hinweis darauf, dass die Phänotypen, die in dem großen Stammbaum abgebildet sind, nicht alle richtig übermittelt oder erinnert werden konnten, geben die Generationen I und II. Wäre in diesen Generationen tatsächlich kein Individuum betroffen, hätte es in Generation III vier Neumutatio-

nen gegeben. Dies ist sehr unwahrscheinlich. Zudem wissen wir nicht, wie die Diagnose bei den als betroffen markierten Individuen gestellt wurde und ob ein erfahrener Kliniker die Untersuchung durchgeführt hat.

Wie aus Kapitel 1.5 hervorgeht, sind die einzelnen monogenen isolierten Alopezien phänotypisch schwer voneinander zu unterscheiden. Und selbst komplexe, nicht monogene Formen der Alopezie können einen sehr ähnlichen Phänotyp und Verlauf zeigen. Dies erschwert die Diagnosestellung. Zusätzlich sind alle Formen der Alopezie seltene Erkrankungen, wodurch häufig nicht viel Erfahrung in der Diagnosestellung besteht. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit initial auch alle bisher bekannten Gene überprüft und nicht nur die für die blickdiagnostisch gestellte Verdachtsdiagnose Marie Unna Hypotrichose.

Die Diagnose ist nicht nur durch die Ähnlichkeit der Phänotypen unterschiedlicher Hypotrichose-Formen schwierig, sondern auch durch eine unterschiedliche Ausprägung der Symptome. Besonders bei X-chromosomal vererbten Varianten unterscheidet sich die Ausprägung des Phänotyps bei Männern und Frauen häufig sehr. Die Unterscheidung zwischen einer leichten Form der Hypotrichose und physiologischem Haarausfall, der beispielsweise in Stresssituationen oder im Rahmen von Infektionen vermehrt auftreten kann, ist häufig schwierig. So kann einerseits physiologischer Haarausfall als leichte Form der Hypotrichose diagnostiziert werden, andererseits werden leichte Formen der Hypotrichose häufig nicht erkannt. Besonders bei den Individuen II:13 und II:14 ist diese Möglichkeit zu bedenken, da durch die X-chromosomale Vererbung der Phänotyp bei Frauen nur sehr leicht ausgeprägt sein kann. Eine Untersuchung durch einen erfahrenen Dermatologen wäre zielführend, um eine X-chromosomal-dominante Vererbung der pathogenen Variante endgültig auszuschließen oder weiterhin als mögliche Vererbungsform zu betrachten. Leider war es im Rahmen der vorliegenden Arbeit nicht möglich, die entsprechenden Familienmitglieder zu kontaktieren.

Die hohe Anzahl an betroffenen Individuen in der betrachteten Familie lässt auf eine monogene Vererbung schließen, weshalb in der vorliegenden Arbeit von einer monogen vererbten Form der Hypotrichose ausgegangen wurde. Eine komplexe Vererbung wäre bei der hohen Anzahl betroffener Familienmitglieder unwahrscheinlich, ist dennoch nicht endgültig auszuschließen.

4.2 Methodisches Vorgehen zur Einengung der Kandidatenregion

Die Technologie des NGS ist ein großer Fortschritt für die Forschung an monogenen Erkrankungen (siehe Kapitel 4.2.2). Sie bringt aber auch die Problematik mit sich, dass sehr viele Varianten gefiltert werden müssen, um das krankheitsverursachende Gen zu identifizieren. Dazu gibt es verschiedene Herangehensweisen. Prädiktionswerte der Wahrscheinlichkeit der Pathogenität einer Mutation, wie beispielsweise *Polymorphism Phenotyping v2* (PolyPhen-2), und die Anzahl bisher beschriebener Varianten in dem entsprechenden Kandidatengen können hilfreich sein, reichen allerdings häufig nicht aus, um die hohe Anzahl an Varianten zu filtern. Die Kandidatengenregion kann allerdings durch eine Kopplungsanalyse eingengt werden, um das Filtern der Varianten zu vereinfachen (Ott et al., 2015). Die möglichen Kandidatengenregionen können im Anschluss im Vergleich mit den Daten einer einzelnen Exomsequenzierung ausgewertet werden. Dieses Vorgehen wurde auch in der vorliegenden Arbeit zunächst gewählt. Eine weitere Möglichkeit der Einengung von Kandidatengenregionen ist die Exomsequenzierung mehrerer betroffener Individuen und das Herausfiltern gemeinsamer Varianten. Dies wurde in der vorliegenden Arbeit durchgeführt, nachdem durch die Kopplungsanalyse kein Kandidatengen identifiziert werden konnte. Auf die einzelnen Methoden und die Ergebnisse aus diesen soll in den folgenden Abschnitten genauer eingegangen werden.

4.2.1 Kopplungsanalyse

Zur Einengung der Kandidatengenregionen wurde zunächst eine Kopplungsanalyse durchgeführt. Dazu standen Genotypisierungsdaten von neun Individuen zur Verfügung. Der höchste LOD-Score in der durchgeführten Analyse war 1,6425 und wurde mit zwei auf Chromosom 1 liegenden Markern erreicht. Wie bereits beschrieben, konnte in der vorliegenden Arbeit aufgrund der relativ geringen Probenanzahl kein signifikantes Ergebnis von einem LOD-Score > 3 in der Kopplungsanalyse erwartet werden. Erwartet wurden mehrere Bereiche mit Werten von maximal 1,8. Statistisch signifikante Ergebnisse können bei dominant vererbten Merkmalen nur bei Familien mit großen Stammbäumen mit mindestens sechs bis zwölf betroffenen Individuen über mehrere Generationen erreicht werden (Kuhlenbäumer et al., 2011).

Allerdings wurde kein LOD-Score von 1,8 erreicht. Dennoch wurden die Regionen, die in der Kopplungsanalyse die höchsten LOD-Scores zeigten, näher betrachtet. In der Exomsequenzierung der Indexpatientin (III:9) lag keine Variante in der Nähe der entsprechenden Marker. Dies kann daran liegen, dass das krankheitsverursachende Gen weiter entfernt vom Marker liegt als angenommen. Zur präziseren Lokalisation könnten im Anschluss an eine Kopplungsanalyse Finemappingstrategien durchgeführt werden (Bickeböller und Fischer, 2007).

Für X-chromosomale Varianten wird bereits bei niedrigeren Werten von Kopplung ausgegangen (siehe Kapitel 2.12). Aus diesem Grund wurden die Marker mit den höchsten LOD-Scores auf dem X-Chromosom gesondert betrachtet. Die Deletion in *CDKL5*, das auch durch die Exomsequenzierung als Kandidatengen identifiziert wurde, liegt in der Nähe eines der Marker mit den höchsten LOD-Scores.

Das Potenzial der Kopplungsanalyse selbst wird bei inkompletter Penetranz oder Locusheterogenität herabgesetzt (Ott, 2015). Bei der hohen Anzahl an betroffenen Individuen innerhalb der Familie gingen wir in der vorliegenden Arbeit allerdings von einer monogenen Form der Hypotrichose aus, die dominant mit hoher Penetranz vererbt wird. Eine weitere Fehlerquelle in der Kopplungsanalyse können falsche Angaben zu der Phänotypzuordnung sein. Auf die Schwierigkeit der Diagnose von Hypotrichosen und damit der Festlegung des Phänotyps wurde in Abschnitt 4.1 ausführlicher eingegangen. Bei einer fehlerhaften Angabe kann die krankheitsverursachende Region nicht mit Hilfe der Kopplungsanalyse identifiziert werden.

Die Erfahrung aus früheren Projekten zeigte auch, dass das krankheitsverursachende Gen ebenso in der Nähe von Markern liegen kann, die nicht durch hohe LOD-Scores aufgefallen waren. Das bedeutet, dass das krankheitsverursachende Gen möglicherweise durch die Kopplungsanalyse in der vorliegenden Arbeit nicht identifiziert werden konnte, da nur die Regionen der Marker mit den höchsten LOD-Scores genauer untersucht wurden. Außerdem ist es denkbar, dass die Entfernung der krankheitsverursachenden Variante vom Marker größer ist als angenommen und die Variante deshalb nicht identifiziert werden konnte.

4.2.2 Exomsequenzierung und Identifizierung der Kandidatengene

Die Exomsequenzierung spielt inzwischen eine große Rolle bei der Identifizierung klinisch relevanter Varianten. Die Etablierung der ersten NGS-Plattform im Jahr 2005 ermöglichte durch bessere Zugänglichkeit und schnellere Analyse die häufigere Anwendung in der Forschung und auch in der Routinediagnostik. Der Zeit- und Kostenfaktor dieser Analysen wird auch in Zukunft weiter sinken, wodurch ein noch breiterer Einsatz möglich wird (Majewski et al., 2011). NGS ermöglicht auch die Identifizierung ursächlicher Gene für monogen vererbte Erkrankungen, die durch die Kopplungsanalyse bisher, beispielsweise aufgrund von zu kleiner Stammbaumgröße, nicht analysiert werden konnten. Die Exomsequenzierung betrachtet dabei zwar nur die Protein-codierenden Bereiche und damit einen kleinen Abschnitt des menschlichen Genoms, allerdings liegen den meisten monogenen Erkrankungen exonische Varianten zugrunde (Kuhlenbäumer et al., 2011; Majewski et al., 2011).

Es gibt jedoch auch Regionen, die mit dem WES nicht abgedeckt werden. Dazu gehören noch nicht in Datenbanken annotierte Exone, evolutionär konservierte nicht-kodierende Regionen und regulatorische Sequenzen (Bamshad et al., 2011; Majewski et al., 2011). Krankheitsverursachende Varianten in diesen Regionen bleiben durch die Exomsequenzierung also unentdeckt. Auch das in der vorliegenden Arbeit gesuchte ursächliche Gen könnte in einer der genannten Regionen liegen und deshalb mit den durchgeführten Methoden nicht erkannt worden sein. Eine Möglichkeit, die Zahl der nicht abgedeckten Regionen zu reduzieren, kann die Durchführung eines WGS sein.

Desweiteren können große Insertionen und Deletionen, sowie *Copy Number Variations* (CNVs) häufig nicht mittels NGS identifiziert werden (Kuhlenbäumer et al., 2011; Petersen et al., 2017). Es gibt einige Ansätze CNVs auch mittels NGS-Daten zu detektieren. Allerdings eignen sich dafür Daten eines WGS besser als eines WES, da mittels WGS mehr CNVs erfasst werden (Zhao et al., 2013). Weitere Methoden wären eine Karyotypisierung und Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) oder die Analyse von SNP-Array-Daten (Buysse et al., 2009; Carter, 2007; Kuhlenbäumer et al., 2011).

4.3 Das Kandidatengen *CDKL5*

Durch den Vergleich der Exomsequenzierungsdaten von vier betroffenen Individuen wurde in der vorliegenden Arbeit *CDKL5* als Kandidatengen identifiziert. In diesem Kapitel soll auf die bisherigen wissenschaftlichen Erkenntnisse und Studien zu *CDKL5* eingegangen werden.

Das *CDKL5*-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des X-Chromosoms (Xp22.13) und enthält 24 Exons, wovon die ersten drei (Exon 1, 1a und 1b) nicht kodierend sind. Das *CDKL5*-Gen kodiert für eine Kinase (*CDKL5* oder Serin/Threonin-Proteinkinase (*STK*) 9), die essenziell für die Entwicklung des Gehirns ist. Das entstehende Protein besteht aus 1030 Aminosäuren und hat vor allem in der N-terminalen katalytischen Domäne (Aminosäuren 13-297) homologe Proteinsequenzen zu anderen Serin/Threonin-Kinasen und auch zu weiteren Proteinen der *CDKL*-Proteinfamilie. Die Besonderheit des *CDKL5*-Proteins ist, dass es ein ungewöhnlich langes (600 Aminosäuren) C-terminales Ende hat, das eine wichtige Funktion in der Regulation der katalytischen Domäne und für die Lokalisation innerhalb der Zelle zu haben scheint (Bertani et al., 2006; Kilstrup-Nielsen et al., 2012). Die Kinase-Domäne kann in zwölf Subdomänen mit unterschiedlichen Merkmalen und Funktionen geteilt werden. Zwei Regionen konnten identifiziert werden, die bisher für Serin/Threonin-Kinasen bekannt sind. Die erste (Aminosäuren 14-47) ist eine Glycinreiche Region in der Nähe eines Lysin-Restes (Kilstrup-Nielsen et al., 2012; Montini et al., 1998). Dieser Lysin-Rest wurde als Adenosintriphosphat (ATP)-bindende Region in Serin/Threonin-Kinasen beschrieben (Hanks und Hunter, 1995). Die zweite Region (Aminosäure 127-144) enthält einen konservierten Aspartatrest, der wichtig für die katalytische Aktivität des Enzyms ist (Hanks und Hunter, 1995; Montini et al., 1998). Außerdem konnte in Domäne VIII, übereinstimmend mit anderen verwandten Kinasen, ein Thr-Xaa-Tyr Motiv (TEY) (Aminosäuren 196-171) identifiziert werden. Für Kinasen der Mitogen-aktivierte Protein-Kinase (*MAPK*)-Familie konnte schon gezeigt werden, dass eine Phosphorylierung von Threonin (Thr) und Tyrosin (Tyr) zu einer Aktivierung führt (Hanks und Hunter, 1995). Auch im *CDKL5*-Protein kann eine Autophosphorylierung dieses Motivs stattfinden (Bertani et al., 2006). Interaktionen konnten experimentell auch mit Methyl-CpG-Binding-Protein 2 (*MECP2*) nachgewiesen werden. Mari et al. (2005) zeigen, dass *CDKL5* die Phosphorylierung von (*MECP2*) katalysiert und Bertani et al. (2006) belegen, dass Mutationen in der katalytischen Domäne von *CDKL5*

diese Phosphorylierung unterbinden. Mutationen im X-chromosomalen *MECP2*- Gen sind bisher bekannt als ursächlich für das Rett-Syndrom (Amir et al., 1999), das eine häufige Ursache für mentale Retardierung bei Mädchen darstellt. Die betroffenen Kinder sind bei Geburt unauffällig und zeigen bis zum sechsten Lebensmonat eine normale Entwicklung. Im Verlauf entwickelt sich jedoch eine muskuläre Hypotonie, eine Mikrozephalie durch Dezeleration des Schädelwachstums und später kommt es zum Verlust bereits erworbener Fähigkeiten. Typische Merkmale sind außerdem Handstereotypien mit waschenden Bewegungen. Ungefähr die Hälfte der Patientinnen entwickelt im Verlauf zudem Epilepsien (Schaaf und Zocke, 2008). Diese Formen werden dann als atypisches Rett-Syndrom bezeichnet (Lin et al, 2005).

Eine Inaktivierung des *CDKL5*-Gens durch X-Autosomen-Translokation führt ebenso zu einem Phänotyp, der mit infantilen Spasmen, Entwicklungsverzögerung und Hypsarrhythmie in der Elektroenzephalographie (EEG) einhergeht (Kalscheuer et al., 2003).

Lin et al. (2005) beschreiben Mutationen direkt im *CDKL5*-Gen, die sich ebenfalls phänotypisch als Enzephalopathie äußern. Hierbei handelt es sich nicht nur um Mutationen in der katalytischen Domäne, sondern in allen Regionen des Gens. Diese Mutationen führen zu einem Krankheitsbild, das dem atypischen Rett- oder dem West-Syndrom ähnelt. Das West-Syndrom ist eine Form der Epilepsie mit infantilen Spasmen, die im frühen Kindesalter auftritt. Es geht typischerweise mit seriellen epileptischen Spasmen und Hypsarrhythmie im EEG einher. Teilweise kann es zu psychomotorischer Entwicklungsverzögerung kommen (Staudt, 2014).

Wie bei dem Rett-Syndrom sind nur Mädchen betroffen. Die betroffenen Kinder leiden unter einer frühen, meist Therapie-resistenten Epilepsie, die sich innerhalb der ersten drei Lebensmonate manifestiert. Außerdem zeigen alle beschriebenen Mädchen eine Entwicklungsverzögerung, Dyspraxie und Rumpfhypotonie, wodurch sie nicht selbstständig laufen können und besonders auch Einschränkungen in der Handmotorik und Koordination der Handbewegungen haben. Handstereotypien, die typisch für das Rett-Syndrom sind, können auch bei vielen Patienten mit *CDKL5*-Mutationen beobachtet werden. Auch die Sprachentwicklung ist häufig stark retardiert und einige betroffene Kinder zeigen autistische Symptome (Bahi-Buisson et al., 2008). Haut- oder Haarverän-

derungen sind bisher im Zusammenhang mit *CDKL5*-Mutationen nicht beschrieben worden.

4.4 Interaktionsprofil des *CDKL5*-Gens

Wie oben beschrieben kodiert das *CDKL5*-Gen eine Protein-Kinase, die einerseits auto-katalytische Fähigkeiten hat, andererseits auch mit anderen Proteinen interagieren kann, beispielsweise durch die Katalyse der Phosphorylierung. So können Mutationen im *CDKL5*-Gen nicht nur Auswirkungen auf das *CDKL5*-Protein selbst haben, sondern auch auf weitere Proteine des Interaktionsnetzwerks von *CDKL5*. Bisher sind einige Proteininteraktionen bekannt (siehe Abbildung 7), wobei die bekannteste die Interaktion von *CDKL5* und *MECP2* ist. Mutationen in *CDKL5* unterbinden die Phosphorylierung von *MECP2*, resultierend in einem dem Rett-Syndrom ähnlichen Phänotyp (siehe Abschnitt 4.3).

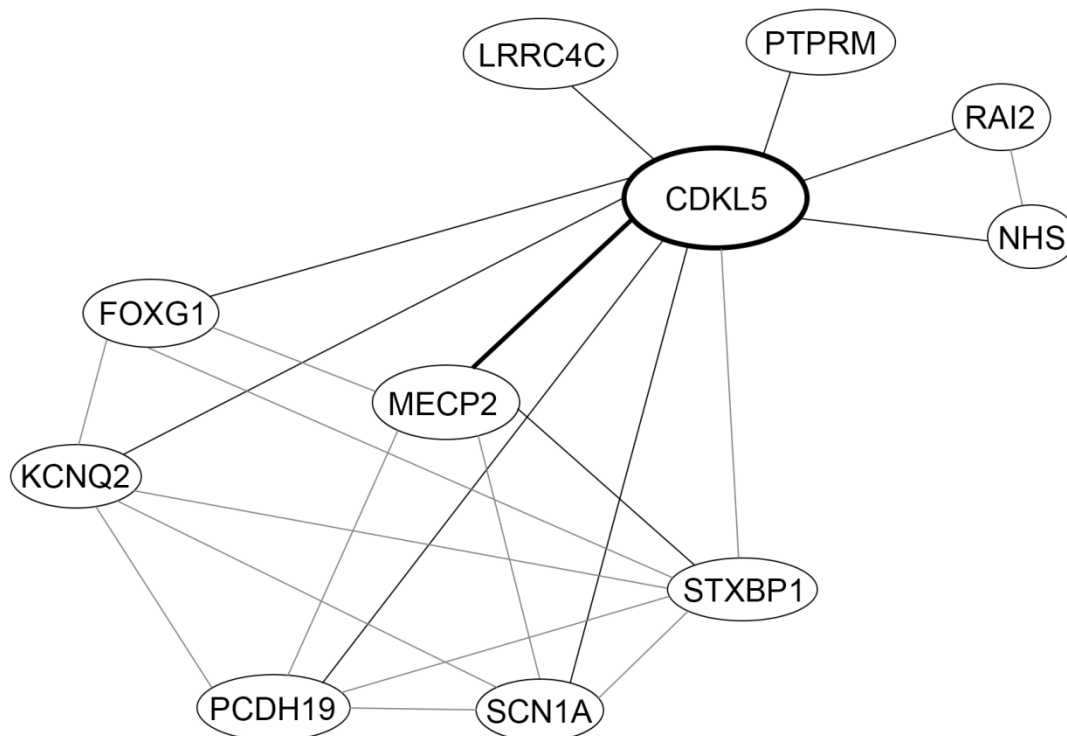


Abb. 7: Proteinnetzwerk von *CDKL5*. Modifiziert nach STRING-db.org, Szklarczyk et al., 2019.

Auch Mutationen in einigen der anderen Proteine aus dem Interaktionsnetzwerk von *CDKL5* können zu neuronalen Schädigungen führen. So sind Mutationen im Syntaxin Binding Protein 1 (*STXBP1*) beispielsweise als ursächlich für Enzephalopathien beschrieben worden, die mit Intelligenzminderung und Epilepsien einhergehen (Stamberger et al., 2016). Auch im Potassium Voltage-Gated Channel Subfamily Q Member 2 (*KCNQ2*) sind mehrere Mutationen bekannt, die zu neonatalen Enzephalopathien mit Epilepsie führen (Millichap et al., 2016). Forkhead Box G1 (*FOXP1*) spielt eine wichtige Rolle in der Entwicklung des Gehirns, besonders des Telencephalons (Kumamoto und Hanashima, 2017). Bisher hat keines der anderen Proteine des Interaktionsnetzwerkes eine bekannte Funktion in der Haarentwicklung oder dem Haarzyklus. Zudem ist keines als ursächlich für Haut- oder Haarerkrankungen beschrieben worden.

Deswegen ist auf Grundlage des heutigen Kenntnisstandes die Interaktion von *CDKL5* mit einem dieser in Abbildung 7 gezeigten Proteine als Ursache für die in der vorliegenden Arbeit beschriebene Form der Hypotrichose unwahrscheinlich.

4.5 Plausibilität des Kandidatengens *CDKL5*

Kuhlenbäumer et al. (2011) nennen für die Identifizierung krankheitsverursachender Varianten vier Merkmale, die erfüllt sein müssen: die Variante muss innerhalb der Familie mit dem Phänotyp kosegregieren, sie darf noch nicht beschrieben sein oder in Kontrollgruppen auftreten, sie muss zu einem Basenaustausch, einer Proteinverkürzung oder einem Spleißfehler führen und dieselbe oder andere Varianten sollten in weiteren betroffenen Familien nachgewiesen werden (Kuhlenbäumer et al., 2011). Im besten Fall können funktionelle Untersuchungen angeschlossen werden, die das identifizierte Kandidatengen als krankheitsverursachendes bestätigen (Collins, 1995).

In der vorliegenden Arbeit wurde ebenfalls nach diesem Schema vorgegangen. Zunächst wurden Kandidatenregionen mittels Exomsequenzierung eingengt und ein mögliches Kandidatengen identifiziert: *CDKL5*.

CDKL5 kosegregiert mit dem Phänotyp innerhalb der Familie. Dies wurde mittels Sanger-Sequenzierung nachgewiesen. Die Mutation, eine Deletion von zehn Basenpaaren, hat einen Frameshift zur Folge. Ein niedriger Intoleranzscore (Residual Variation Intolerance Score (RVIS)= -0,67) gibt den Hinweis, dass die Deletion kritische Auswir-

kungen auf die Proteinfunktion hat. Die Variante wurde bisher nicht beschrieben, was einen weiteren Hinweis auf ihre Pathogenität gibt. Allerdings konnte bis zu diesem Zeitpunkt die Variante, und auch keine andere Mutation im *CDKL5*-Gen, in keiner weiteren betroffenen Familie nachgewiesen werden. Dazu wurden Exomdaten aus früheren und laufenden Projekten mit Familien unterschiedlicher Formen der Alopezie auf Mutationen im *CDKL5*-Gen gefiltert. Von den von Kuhlenbäumer et al. (2011) angeführten Punkten sind dementsprechend nur die ersten drei bisher erfüllt.

Zusätzlich konnte in der Expressionsanalyse mittels qPCR keine Expression des *CDKL5*-Gens im Haarfollikel nachgewiesen werden. Bei einem Gen, das ursächlich für eine monogen vererbte Form der Hypotrichose ist, gehen wir davon aus, dass es im Haarfollikel exprimiert ist.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass *CDKL5*, ähnlich wie bei der oben beschriebenen Pathogenese des Rett-Syndroms, regulatorisch auf ein am Haarzyklus beteiligtes Gen wirkt. Das bisher bekannte Interaktionsprofil des *CDKL5*-Gens gibt dafür allerdings keinen Hinweis. Keins der dort aufgeführten Gene ist bisher für eine Form der Hypotrichose oder die Beteiligung am Haarzyklus bekannt. Hinzu kommt, dass *CDKL5* aufgrund der für das Rett-Syndrom bekannten Mutationen ein sehr gut erforschtes Gen ist. Phänotypisch gibt es zwischen dem Rett-Syndrom und der Hypotrichose Typ Marie Unna keinerlei bisher beschriebene Überschneidungen. Auch die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Familienmitglieder zeigten keine Auffälligkeiten in der psychomotorischen Entwicklung.

Aufgrund dieser Aspekte fehlt bisher der endgültige Beweis für *CDKL5* als krankheitsverursachendes Gen für die Hypotrichose Marie Unna. Durch die Erfüllung der ersten drei Punkte, die oben genannt wurden, bleibt *CDKL5* allerdings weiterhin ein Kandidatengenen.

4.6 Ausblick

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnten wir nicht mit endgültiger Sicherheit beweisen, dass Mutationen in *CDKL5* krankheitsverursachend für die Hypotrichose Typ Marie Unna sind. Dennoch bleibt die Möglichkeit, dass der fehlende abschließende Beweis in Zukunft gefunden wird. Wie bereits beschrieben, sind der Haarzyklus und die daran beteiligten Gene bisher noch nicht vollständig erforscht. Auch viele Abläufe und Proteinin-

teraktionen in der Haarmorphogenese sind noch unklar. Ebenso ist nicht sicher, ob *CDKL5* wirklich nur mit den oben genannten Proteinen interagiert oder es noch weitere, bisher unbekannte Interaktionspartner gibt. Es ist vorstellbar, dass darunter ein Protein ist, das im Haarzyklus eine Rolle spielt und von *CDKL5* reguliert wird.

Bereits in Abschnitt 4.2.2 wurde darauf eingegangen, dass die Etablierung der ersten NGS-Plattform im Jahr 2005 ein großer Meilenstein in der genetischen Forschung war und zur Identifizierung vieler ursächlicher Gene von monogenen Erkrankungen führte. Die Technologie des NGS, insbesondere des WES, wird in Zukunft durch bessere und kostengünstigere Verfügbarkeit eine immer größere Rolle spielen. Dadurch werden zur Analyse immer größere Patientenkollektive zur Verfügung stehen. Einerseits bringt dies die Schwierigkeit mit sich, effektive Methoden zum Filtern dieser hohen Menge an Varianten zu finden. Andererseits gibt dies auch die Möglichkeit, unkompliziert weitere betroffene Individuen, bei denen in unserer Arbeitsgruppe eine Exomsequenzierung durchgeführt wird, auf Mutationen im *CDKL5*-Gen zu untersuchen. Sollte durch diese Möglichkeiten *CDKL5* oder einer der Interaktionspartner als für die Hypotrichose Typ Marie Unna krankheitsverursachendes Gen identifiziert werden, ist die Durchführung funktioneller Untersuchungen zu erwägen. Dies könnte zu einem besseren Verständnis der Morphogenese des Haares und des physiologischen Ablaufs des Haarzyklus beitragen. Dieses Verständnis ist Voraussetzung für die Weiterentwicklung der bisher leider für viele Betroffene unbefriedigenden therapeutischen Möglichkeiten und somit für die Verbesserung der Lebensqualität.

5. Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, ein neues Gen für eine seltene monogene Alopeziform zu identifizieren. Die Gruppe der isolierten monogenen Alopezien beinhaltet mehrere klinisch und genetisch heterogene Formen der Haarlosigkeit. Gegenstand der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung einer großen Familie mit einer Form der Hypotrichose, die phänotypisch der Hypotrichose Typ Marie Unna ähnelt.

Die Betroffenen der Familie zeigen schon kurz nach Geburt haarlose Stellen an der Kopfhaut. Ab dem vierten Lebensjahr folgen zyklische Perioden mit Haarverlust. Im Erwachsenenalter treten größere Areale vernarbender Alopezie an der Kopfhaut auf. Augenbrauen und Schambehaarung sind spärlich vorhanden. Der Haarausfall in dem Ausmaß stellt nicht nur ein kosmetisches Problem dar, sondern kann auch psychisch belastend sein. Der Leidensdruck ist auch aufgrund bisher nicht zufriedenstellender Therapiemöglichkeiten hoch und die Identifizierung neuer Gene für monogene Alopeziformen wichtig, um die Physiologie des Haarwachstums vollständig zu verstehen und so neue Therapien zu entwickeln.

Für Hypotrichosen, genau wie für viele weitere monogene Erkrankungen, konnten in den letzten Jahren durch die Etablierung des NGS einige Gene identifiziert werden. Es gibt allerdings immer noch viele betroffene Familien, bei denen bisher keine ursächliche Mutation gefunden werden konnte. Deshalb gehen wir davon aus, dass es noch weitere ursächliche Gene gibt, die in den nächsten Jahren identifiziert werden. Auch in der vorliegenden Arbeit wurden im Vorfeld Mutationen in den bereits bekannten Genen für die Hypotrichose Typ Marie Unna und weitere isolierte monogene Hypotrichosen ausgeschlossen.

In der vorliegenden Arbeit konnte mittels Kopplungsanalyse und anschließenden Exomsequenzierungen von vier betroffenen Familienmitgliedern *CDKL5* als Kandidatengen identifiziert werden. Die Kosegregation mit dem Phänotyp innerhalb der Familie wurde mittels Sanger-Sequenzierung bestätigt. Mutationen im *CDKL5*-Gen wurden bisher beschrieben als ursächlich für Enzephalopathien, die phänotypisch dem Rett- oder dem West-Syndrom ähneln. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit konnte *CDKL5* nicht abschließend als ursächliches Gen bewiesen werden, da nach heutigem Kenntnisstand weder *CDKL5* noch eines der mit *CDKL5* interagierenden Proteine eine Rolle bei der

Haarentwicklung oder im Haarzyklus spielen. Außerdem konnten in keiner weiteren betroffenen Familie Mutationen in *CDKL5* gefunden werden.

Zukünftig werden durch bessere und kostengünstigere Verfügbarkeit des NGS immer größere Patientenkollektive zur Verfügung stehen. Dadurch ergibt sich unter anderem die Möglichkeit, das wachsende Patientenkollektiv unserer Arbeitsgruppe unkompliziert auf Mutationen im *CDKL5*-Gen zu untersuchen. Weitere Betroffene mit Mutationen im *CDKL5*-Gen würden die in der vorliegenden Arbeit vermutete Pathogenität des *CDKL5*-Gens für die Hypotrichose unterstützen. In diesem Falle könnten weitere funktionelle Untersuchungen durchgeführt werden, die zum besseren Verständnis der Haarphysiologie beitragen können.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Vereinfachte Darstellung der einzelnen Phasen des Haarzyklus	14
Abbildung 2: Stammbaum der Familie (Ausschnitt)	39
Abbildung 3: Fotos der Indexpatientin III:9 im Kindes- und Erwachsenenalter	40
Abbildung 4: Sequenzabfolge beim Wildtyp	44
Abbildung 5: Sequenzabfolge bei heterozygot vorliegender Mutation	45
Abbildung 6: Sequenzabfolge bei hemizygot vorliegender Mutation	45
Abbildung 7: Proteinnetzwerk von CDKL5	54
Abbildung 8: Stammbaum der Familie	73

7. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Reaktionsansatz mit Taq-Polymerase	27
Tabelle 2: Reaktionsansatz mit AccuPrime™ GC-Rich DNA Polymerase	27
Tabelle 3: Allgemeines PCR-Programm	28
Tabelle 4: Reaktionsansatz für Exol/FastAP-Verdau	29
Tabelle 5: PCR-Programm Verdau	30
Tabelle 6: Reaktionsansatz für Sequenzierreaktion	31
Tabelle 7: PCR-Programm Sequenzierreaktion	31
Tabelle 8: Reaktionsansatz für qPCR	37
Tabelle 9: qPCR-Programm mit Eva-Green qPCR-Mix II	37
Tabelle 10: Vor der vorliegenden Arbeit ausgeschlossene Mutationen	41
Tabelle 11: Marker mit LOD-Scores $\geq 1,5$	43
Tabelle 12: Primerliste	72

8. Literaturverzeichnis

Ahmad W, Faiyaz ul Haque M, Brancolini V, Tsou HC, ul Haque S, Lam H, Aita VM, Owen J, deBlaquiere M, Frank J, Cserhalmi-Friedman PB, Leask A, McGrath JA, Peacocke M, Ahmad M, Ott J, Christiano AM. Alopecia Universalis associated with a mutation in the human hairless gene. *Science* 1998; 279: 720-724

Alfonso M, Richter-Appelt H, Tosti A, Viera MS, Garcia M.. The psychosocial impact of hair loss among men: a multinational European study. *Curr Med Res Opin* 2005; 21: 1829-1836

Amir RE, van den Veyver IB, Wan M, Tran CQ, Francke U, Zoghbi HY. Rett syndrome is caused by mutations in X-linked MECP2, encoding methyl-CpG-binding protein 2. *Nat Genet* 1999; 23: 185-188

Anzai H, Shimizu H, Nishikawa T. X-linked recessive inheritance in a family with isolated congenital alopecia. *Lancet* 1996; 347: 337-338

Arnemann J. GC-Gehalt. In: Gressner AM, Arndt T (Hrsg.). *Lexikon der Medizinischen Laboratoriumsdiagnostik*. Berlin: Springer-Verlag, 2019; S. 937

Auber L. VII-The Anatomy of Follicles Producing Wool-Fibres with a special reference to Keratinization. *Trans R Soc Edinb* 1952; 62: 191-254

Bahi-Bouisson N, Nectoux J, Rosas-Vargas H, Milh M, Boddaert N, Girard B, Cances C, Ville D, Afenjar A, Rio M, Héron D, N'guyen Morel MA, Arzimanoglou A, Philippe C, Jonveaux P, Chelly J, Bienvenu T. Key clinical features to identify girls with CDKL5 mutations. *Brain* 2008; 131: 2647-2661

Bamshad MJ, Ng SB, Bigham AW, Tabor HK, Emond MJ, Nickerson DA, Shendure J. Exome sequencing as a tool for Mendelian disease gene discovery. *Nat Rev Genet* 2011; 12: 745-755

Bateson W, Saunders ER, Punnett RC. Further Experiments on Inheritance in Sweet Peas and Stocks: Preliminary Account. *Proc Biol Sci* 1906; 77: 236-238

Bertani I, Rusconi L, Bolognese F, Forlani G, Conca B, De Monte L, Badaracco G, Landsberger N, Kilstrup-Nielsen C. Functional consequences of mutations in CDKL5, an X-linked gene involved in infantile spasms and mental retardation. *J Biol Chem* 2006; 281: 32048-32056

Betz RC. Alopezien und Hypotrichosen im Kindesalter. *Klinik und Diagnostik. Hautarzt* 2014; 65: 520-526

Bickeböller H, Fischer C. Einführung in die genetische Epidemiologie. Mit 66 Tabellen (Statistik und ihre Anwendungen). Berlin: Springer, 2007; 1. Aufl., S. 21, 178, 218

Blanpain C, Lowry WE, Geoghegan A, Polak L, Fuchs E. Self-renewal, multipotency, and the existence of two cell populations within an epithelial stem cell niche. *Cell* 2004; 118: 635-648

Botchkarev VA, Botchkarev NV, Peters EMJ, Paus R. Epithelial growth control by neurotrophins. Leads and lessons from the hair follicle. *Prog Brain Res* 2004; 146: 493-513

Bowden PE, Hainey SD, Parker G, Jones DO, Zimonjic D, Popescu N, Hodgins MB. Characterization and chromosomal localization of human hair-specific keratin genes and comparative expression during the hair growth cycle. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 158-164

Buysse K, Delle Chiaie B, van Coster R, Loeys B, De Paepe A, Mortier G, Speleman F, Menten B. Challenges for the CNV interpretation in clinical molecular karyotyping. Lessons learned from a 1001 sample experience. *Eur J Med Genet* 2009; 52: 398-403

Carter NP. Methods and strategies for analyzing copy number variation using DNA microarrays. *Nat Genet* 2007; 39: 16-21

Chase HB. Growth of the hair. *Physiol Rev* 1954; 34: 113-126

Chase HB, Rauch R, Smith VW. Critical stages of hair development and pigmentation in the mouse. *Physiol Zool* 1951; 24: 1-8

Collins FS. Positional cloning moves from perditional to traditional. *Nat Genet* 1995; 9: 347-50

Commo S, Bernard BA. Immunohistochemical analysis of tissue remodelling during the anagen-catagen transition of the human hair follicle. *Br J Dermatol* 1997; 137: 31-38

Cotsarelis G, Sun TT, Lavker RM. Label-retaining cells reside in the bulge area of pilosebaceous unit. Implications for follicular stem cells, hair cycle and skin carcinogenesis. *Cell* 1990; 61: 1329-1337

Danilenko DM, Ring BD, Pierce GF. Growth factors and cytokines in hair follicle development and cycling. Recent insights from animal models and the potentials for clinical therapy. *Mol Med Today* 1996; 2: 460-467

Foitzik K, Lindner G, Mueller-Roever S, Maurer M, Botchkarev N, Botchkarev V, Handjiski B, Metz M, Hibino T, Soma T, Dotto GP, Paus R. Control of murine hair follicle regression (catagen) by TGF- β 1 in vivo. *FASEB J*. 2000; 14: 752-760

Fritsch P, Schwarz T. *Dermatologie Venerologie- Grundlagen, Klinik, Atlas*. Berlin: Springer, 2004. 2. Aufl., S. 717

Gay D, Kwon O, Zhang Z, Spata M, Plikus MV, Holler PD, Ito M, Yang Z, Treffeisen E, Kim CD, Nace A, Zhang X, Baratono S, Wang F, Ornitz DM, Millar SE, Cotsarelis G. FGF9 from dermal T cells induces hair follicle neogenesis after wounding. *Nat Med* 2013; 19: 916-923

Greco V, Chen T, Rendl M, Schober M, Pasolli HA, Stokes N, Dela Cruz-Racelis J, Fuchs E. A two-step mechanism for stem cell activation during hair regeneration. *Cell Stem Cell* 2009; 4:155-169

Hanks SK, Hunter T. Protein kinases 6. The eukaryotic protein kinase superfamily: kinase (catalytic) domain structure and classification. *FASEB J* 1995; 9: 1959-1975

Hansen LA, Alexander N, Hogan ME, Sundberg JP, Dlugosz A, Threadgill DW, Magnuson T, Yuspa SH. Genetically null mice reveal a central role for epidermal growth factor receptor in the differentiation of the hair follicle and normal hair development. *Am J Pathol* 1997; 150: 1959-1975

Hébert JM, Rosenquist T, Götz J, Martin GR. FGF5 as a regulator of the hair growth cycle. Evidence from targeted and spontaneous mutations. *Cell* 1994; 78: 1017-1025

Jansohn M, Rothhämel S. *Gentechnische Methoden. Eine Sammlung von Arbeitsanleitungen für das molekularbiologische Labor.* Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg 2012; 5. Aufl., S. 162

Jindo T, Tsuboi R, Takamori K, Ogawa H. Local injection of hepatocyte growth factor/scatter factor (HGF/SF) alters cyclic growths of murine hair follicles. *J Invest Dermatol* 1998; 110: 338-342

Joost S, Zeisel A, Jacob T, Sun X, La Manno G, Lönnerberg P, Linnarsson S, Kasper M. Single-Cell Transcriptomics Reveals that Differentiation and Spatial Signatures Shape Epidermal and Hair Follicle Heterogeneity. *Cell Syst* 2016; 3: 221-237

Kalscheuer VM, Tao J, Donnelly A, Hollway G, Schwinger E, Kübart S, Menzel C, Hoeltzenbein M, Tommerup N, Eyre H, Harbord M, Haan E, Sutherland GR, Ropers HH, Gécz J. Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. *Am J Hum Genet* 2003; 72: 1401-1411

Kazantseva A, Goltsov A, Zinchenko R, Grigorenko AP, Abrukova AV, Moliaka YK, Kirillov AG, Guo Z, Lyle S, Ginter EK, Rogaev EI. Human hair growth deficiency is linked to a genetic defect in the phospholipase gene LIPH. *Science* 2006; 314: 982-985

Khan S, Habib R, Mir H, Umm-e-Kalsoom, Naz G, Ayub M, Shafique S, Yamin T, Ali N, Basit S, Wasif N, Kamran-UI-Hassan Naqvi S, Ali G, Wali A, Ansar M, Ahmad W. Mutations in the LPAR6 and LIPH genes underlie autosomal recessive hypotrichosis/woolly hair in 17 consanguineous families from Pakistan. *Clin Exp Dermatol* 2011; 36: 652-654

Kilstrup-Nielsen C, Rusconi L, La Montanara P, Ciceri D, Bergo A, Bedogni F, Landsberger N. What we know and would like to know about CDKL5 and its involvement in epileptic encephalopathy. *Neural Plast* 2012; 2012: 728267

Kligman AM. The human hair cycle. *J Invest Dermatol* 1959; 33: 307-316

Kligman AM, Freeman B. History of baldness. From magic to medicine. *Clin Dermatol* 1988; 6: 83-88

Kljuic A, Bazzi H, Sundberg JP, Martinez-Mir A, O'Shaughnessy R, Mahoney MG, Levy M, Montagutelli X, Ahmad W, Aita VM, Gordon D, Uitto J, Whiting D, Ott J, Fischer S, Gilliam TC, Jahoda CA, Morris RJ, Panteleyev AA, Nguyen VT, Christiano AM. Desmoglein 4 in hair follicle differentiation and epidermal adhesion: evidence from inherited hypotrichosis and acquired pemphigus vulgaris. *Cell* 2003; 113: 249-260

Kuhlenbäumer G, Hullmann J, Appenzeller S. Novel genomic techniques open new avenues in the analysis of monogenic disorders. *Hum Mutat* 2011; 32: 144-151

Levy-Nissenbaum E, Betz RC, Frydman M, Simon M, Lahat H, Bakhan T, Goldman B, Bygum A, Pierick M, Hillmer AM, Jonca N, Toribio J, Kruse R, Dewald G, Cichon S, Kubisch C, Guerrin M, Serre G, Nöthen MM, Pras E. Hypotrichosis simplex of the scalp is associated with nonsense mutations in CDSN encoding corneodesmosin. *Nat Genet* 2003; 34: 151-153

Li LF, Fiedler VC, Kumar R. Induction of hair growth by skin irritants and its relation to skin protein kinase C isoforms. *Br J Dermatol* 1999; 140: 616-623

Lin C, Franco B, Rosner MR. CDKL5/STK9 kinase inactivation is associated with neuronal developmental disorders. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 3775-3786

Lin WH, Xiang LJ, Shi HX, Zhang J, Jiang LP, Cai PT, Lin ZL, Lin BB, Huang Y, Zhang HL, Fu XB, Guo DJ, Li XK, Wang XJ, Xiao J. Fibroblast growth factors stimulate hair growths through b-catenin and Shh expression in C57BL/6 mice. *Biomed Res Int* 2015; 2015: 730139

Lindner TH, Hoffmann K. easyLINKAGE. A PERL script for easy and automated two-/multipoint linkage analyses. *Bioinformatics* 2005; 21: 405-407

Lottspeich F, Engels JW (Hg.). *Bioanalytik*. Springer Spektrum 2012. 3. Aufl. S. 571-574

Lowry WE, Blanpain C, Nowak JA, Guasch G, Lewis L, Fuchs E. Defining the impact of beta-catenin/Tcf transactivation on epithelial stem cells. *Genes Dev* 2005; 19:1596-1611

Lüllmann-Rauch R. *Taschenlehrbuch Histologie*. Leipzig: Thieme, 2009; 3. Aufl., S. 526-539

Majewski J, Schwartzenruber J, Lalonde E, Monpetit A, Jabado N. What can exome sequencing do for you? *J Med Genet* 2011; 48: 580-589

Malki L, Sarig O, Cesarato N, Mohamad J, Canter T, Assaf S, Pavlovsky M, Vodo D, Anis Y, Bihari O, Malovitski K, Gat A, Thiele H, White B, Samuelov L, Nanda A, Paller AS, Betz RC, Sprecher E. Loss-of-function variants in C3ORF52 result in localized autosomal recessive hypotrichosis. *Genet Med* 2020; 22: 1227-1234

Mari F, Azimonti S, Bertani I, Bolognese F, Colombo E, Caselli R, Scala E, Longo I, Grosso S, Pescucci C, Ariani F, Hayek G, Balestri P, Bergo A, Badaracco G, Zappella M, Broccoli V, Renieri A, Kilstrup-Nielsen C, Landsberger N. CDKL5 belongs to the same molecular pathway of MeCP2 and it is responsible for the early-onset seizure variant of Rett syndrome. *Hum Mol Genet* 2005; 14: 1935-1946

Messenger AG, Rundegren J. Minoxidil. Mechanisms of action on hair growth. *Br J Dermatol* 2004; 150: 186-194

Millar SE, Willert K, Salinas PC, Roelink H, Nusse R, Sussman DJ, Barsh GS. WNT signaling in the control of hair growth and structure. *Dev Biol* 1999; 207: 133-149

Millichap JJ, Park KL, Tsuchida T, Ben-Zeev B, Carmant L, Flamini R, Joshi N, Levisohn PM, Marsh E, Nangia S, Narayanan V, Ortiz-Gonzalez XR, Patterson MC, Pearl PL, Porter B, Ramsey K, McGinnis EL, Tagliatela M, Tracy M, Tran B, Venkatesan C, Weckhuysen S, Cooper EC. KCNQ2 encephalopathy. Features, mutational hot spots and ezogabine treatment of 11 patients. *Neurol Genet* 2016; 2: e96

Montini E, Andolfi G, Caruso A, Buchner G, Walpole SM, Mariani M, Consalez G, Trump D, Ballabio A, Franco B. Identification and characterization of a novel serine-threonine kinase gene from the Xp22 region. *Genomics* 1998; 51: 427-433

Morgan TH. The theory of the gene. *Am Nat* 1917; 51: 513-544

Müller-Röver S, Handjiski B, van der Veen C, Eichmüller S, Foitzik K, McKay IA, Stenn KS, Paus R. A comprehensive guide for the accurate classification of murine hair follicles in distinct hair cycle stages. *J Invest Dermatol* 2001; 117: 3-15

Mullis K, Faloona F, Scharf S, Saiki R, Horn G, Erlich H. Specific Ezymatic Amplification of DNA In Vitro. The Polymerase Chain Reaction. *Biotechnology* 1992; 24: 17-27

Netter FH, Technau-Hafsi K (Hg.). *Netters Dermatologie*. Leipzig: Thieme, 2010; 2. Aufl

Nöthen MM, Cichon S, Vogt IR, Hemmer S, Kruse R, Knapp M, Höller T, Faiyaz ul Haque M, Haque S, Propping P, Ahmad M, Rietschel M. A gene for universal congenital alopecia maps to chromosome 8p21-22. *Am J Hum Genet*. 1998; 62: 386-390

Ott J, Wang J, Leal SM. Genetic linkage analysis in the age of whole-genome sequencing. *Nat Rev Genet* 2015; 16: 275-284

Passchier J. Quality of life issues in male pattern hair loss. *Dermatology* 1998; 197: 217-218

Pasternack SM, von Kügelgen I, Al Aboud K, Lee YA, Rüschenhoff F, Voss K, Hillmer AM, Molderings GJ, Franz T, Ramirez A, Nürnberg P, Nöthen MM, Betz RC. G protein-coupled receptor P2Y5 and its ligand LPA are involved in maintenance of human hair growth. *Nat Genet* 2008; 40: 329-334

Pasternack SM, Refke M, Paknia E, Hennies HC, Franz T, Schäfer N, Fryer A, van Steensel M, Sweeney E, Just M, Grimm C, Kruse R, Ferrándiz C, Nöthen MM, Fischer U, Betz RC. Mutations in SNRPE, which encodes a core protein of the spliceosome, cause autosomal-dominant hypotrichosis simplex. *Am J Hum Genet* 2013; 92: 81-87

Paus R, Cotsarelis G. The biology of hair follicles. *N Engl J Med* 1999; 341: 491-497

Paus R, Handjiski B, Czarnetzki BM, Eichmüller S. A murine model for inducing and manipulating hair follicle regression (catagen). Effects of dexamethasone and cyclosporin A. *J Invest Dermatol* 1994; 103: 143-147

Petersen BS, Fredrich B, Hoepfner MP, Ellinghaus D, Franke A. Opportunities and challenges of whole-genome and -exome sequencing. *BMC Genet* 2017; 18: 14 Plikus MV, Baker RE, Chen CC, Fare C, de la Cruz D, Andl T, Maini PK, Millar SE, Widelitz R, Chuong CM. Self-organizing and stochastic behaviors during the regeneration of hair stem cells. *Science* 2011; 332: 586-589

Pulst SM. Genetic linkage analysis. *Arch Neurol* 1999; 56: 667-672

Redler S, Kruse R, Eigelshoven S, Hanneken S, Refke M, Wen Y, Zhang X, Cichon S, Betz RC, Nöthen MM. Marie Unna hereditary hypotrichosis: identification of a U2HR mutation in the family from the original 1925 report. *J Am Acad Dermatol* 2011; 64: e45-50

Salamon T, Schnyder UW. On monilethrix. *Arch Klin Exp Dermatol* 1962; 215: 105-136

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Biotechnology* 1992; 24: 104-108

Sato N, Leopold PL, Crystal RG. Induction of the hair growth phase in postnatal mice by localized transient expression of Sonic hedgehog. *J Clin Invest* 1999; 104: 855-864

Schaaf CP, Zschocke J. *Basiswissen Humangenetik*. Heidelberg: Springer Medizin, 2008; 1.Aufl., S. 406ff.

Shimomura Y, Agalliu D, Vonica A, Luria V, Wajid M, Baumer A, Belli S, Petukhova L, Schinzel A, Brivanlou AH, Barres BA, Christiano AM. APCDD1 is a novel Wnt inhibitor mutated in hereditary hypotrichosis simplex. *Nature* 2010; 464: 1043-1047

Solomon LM, Esterly NB, Medenica M. Hereditary Trichodysplasia. Marie Unna's Hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 1971; 57: 389-400

Stamberger H, Nikanorova M, Willemsen MH, Accorsi P, Angriman M, Baier H, Benkel-Herrenbrueck I, Benoit V, Budetta M, Caliebe A, Cantalupo G, Capovilla G, Casara G, Courage C, Deprez M, Destrée A, Dilena R, Erasmus CE, Fannemel M, Fjaer R, Giordano L, Helbig KL, Heyne HO, Klepper J, Kluger GJ, Lederer D, Lodi M, Maier O, Merckenschlager A, Michelberger N, Minetti C, Muhle H, Phalin J, Ramsey K, Romeo A, Schallner J, Schanze I, Shinawi M, Slegers K, Sterbova K, Syrbe S, Traverso M, Tzschach A, Uldall P, Van Coster R, Verhelst H, Viri M, Winter S, Wolff M, Zenker M, Zoccante L, De Jonghe P, Helbig I, Striano P, Lemke JR, Moller RS, Weckhuysen S. STXBP1 encephalopathy. A neurodevelopmental disorder including epilepsy. *Neurology* 2016; 86: 954-962

Staudt F (Hg.). *Kinder-EEG*. Leipzig: Thieme, 2014; 1. Aufl., S. 134

Stenn KS, Paus R. Controls of hair follicle cycling. *Physiol Rev* 2001; 81: 449-494

Strachan T, Read AP. *Molekulare Humangenetik*. München: Elsevier Spektrum Akad. Verl., 2005; 3. Aufl., S. 276, 462f, 472, 937

Szklarczyk D, Gable AL, Lyon D, Junge A, Wyder S, Huerta-Cepas J, Simonovic M, Doncheva NT, Morris JH, Bork P, Jensen LJ, Mering CV. STRING v11. Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genomewide experimental datasets. *Nucleic Acids Res* 2019; 47: D607-D613

Tobin DJ. The cell biology of human hair follicle pigmentation. *Pigment Cell Melanoma Res* 2011; 24: 75-88

Toribio J, Quiñones PA. Hereditary hypotrichosis simplex of the scalp. Evidence for autosomal dominant inheritance. *Br J Dermatol* 1974; 91: 687-696

Van Steensel MAM, Steijlen PM, Bladergroen RS, Vermeer M, Van Geel M. A missense mutation in the type II hair keratin hHb3 is associated with monilethrix. *J Med Genet* 2005; 42: e19

Weert J, Kint A, Geerts ML. Morphological changes in the proximal area of the rat's hair follicle during early catagen. An electron-microscopic study. *Arch Dermatol Res* 1982; 272: 79-92

Wen Y, Liu Y, Xu Y, Zhao Y, Hua R, Wang K, Sun M, Li Y, Yang S, Zhang XJ, Kruse R, Cichon S, Betz RC, Nöthen MM, van Steensel MA, van Geel M, Steijlen PM, Hohl D, Huber M, Dunnill GS, Kennedy C, Messenger A, Munro CS, Terrinoni A, Hovnanian A, Bodemer C, de Prost Y, Paller AS, Irvine AD, Sinclair R, Green J, Shang D, Liu Q, Luo Y, Jiang L, Chen HD, Lo WH, McLean WH, He CD, Zhang X. Loss-of-function mutations of an inhibitory upstream ORF in the human hairless transcript cause Marie Unna hereditary hypotrichosis. *Nat Genet* 2009; 41: 228-233

Williamson D, Gonzalez M, Finlay AY. The effect of hair loss on quality of life. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2001; 15: 137-139

Winter H, Labrèze C, Chapalain V, Surlève-Bazeille JE, Mercier M, Rogers MA, Taieb A, Schweizer J. A variable monilethrix phenotype associated with a novel mutation,

Glu402Lys, in the helix termination motif of the type II hair keratin hHb1. *J Invest Dermatol* 1998; 111: 169-172

Winter H, Rogers MA, Langbein L, Stevens HP, Leigh IM, Labrèze C, Roul S, Taieb A, Krieg T, Schweizer J. Mutations in the hair cortex keratin hHb6 cause the inherited hair disease monilethrix. *Nat Genet* 1997; 16: 372-374

Wolff H. Erkrankungen der Haare. In: Braun-Falco O (Hrsg.). *Dermatologie und Venerologie*. Berlin: Springer, 2005; 5. Aufl. S. 753, 923-953

Zhang X, Guo BR, Cai LQ, Jiang T, Sun LD, Cui Y, Hu JC, Zhu J, Chen G, Tang XF, Sun GQ, Tang HY, Liu Y, Li M, Li QB, Cheng H, Gao M, Li P, Yang X, Zuo XB, Zheng XD, Wang PG, Wang J, Wang J, Liu JJ, Yang S, Li YR, Zhang XJ. Exome sequencing identified a missense mutation of EPS8L3 in Marie Unna hereditary hypotrichosis. *J Med Genet* 2012; 49: 727-730

Zhao M, Wang Q, Wang Q, Jia P, Zhao Z. Computational tools for copy number variation (CNV) detection using next-generation sequencing data. Features and perspectives. *BMC Bioinformatics* 2013; 14 Suppl 11: S1

Zhou C, Zang D, Jin Y, Wu H, Liu Z, Du J, Zhang J. Mutation in ribosomal protein L21 underlies hereditary hypotrichosis simplex. *Hum Mutat* 2011; 32: 710-714

Zlotogorski A, Marek D, Horev L, Abu A, Ben-Amitai D, Gerad L, Ingber A, Frydman M, Reznik-Wolf H, Vardy DA, Pras E. An autosomal recessive form of monilethrix is caused by mutations in DSG4: clinical overlap with localized autosomal recessive hypotrichosis. *J Invest Dermatol* 2006; 126: 1292-1296

9. Anhang

Tab. 12: Primerliste

Primer	Basenabfolge	Annealing-Temperatur	Verwendung in der vorliegenden Arbeit
CDKL5 Exon_21F	agccagagtgcacctgctag	64 °C	PCR von CDKL5 Exon 21
CDKL5 Exon_21R	gctcaggcaatgcacctgct	64 °C	
CDKL5 Exon_21.1R	cattgggttaattggttct	54 °C	Bestätigung der Deletion in CDKL5 durch Sequenzierung
CDKL5 cDNA_F	gattcctaacattggtaattgga	62 °C	Nachweis der gewonnenen cDNA
CDKL5 cDNA_R	ccgcattctcatggtatgtca	62 °C	
CDKL5 qPCR_F1	CCCTACAGGAAGTTGA GCTGTA	59 °C	qPCR zum Nachweis der Expression von CDKL5 im Haarfollikel
CDKL5 qPCR_R1	CTCACTGGTTGGTGGG AACT	59,5 °C	
CDKL5 qPCR_F2	GACCCTACAGGAAGTTG AGCTGTA	61,5 °C	
CDKL5 qPCR_R2	CTCACTGGTTGGTGGGA ACTT	60 °C	
CLSTN1 Exon_2F	aatagcaggtgtgtcttc	58 °C	PCR zur Überprüfung der Ergebnisse der Exomsequenzierung
CLSTN1 Exon_2R	gctatggagacatttcaga	56 °C	
ZNF185 Exon_7F	tcattgtgttgaaagccagg	60 °C	PCR zur Überprüfung der Ergebnisse der Exomsequenzierung
ZNF185 Exon_7R	cagtacaattcattccagcagt	62 °C	

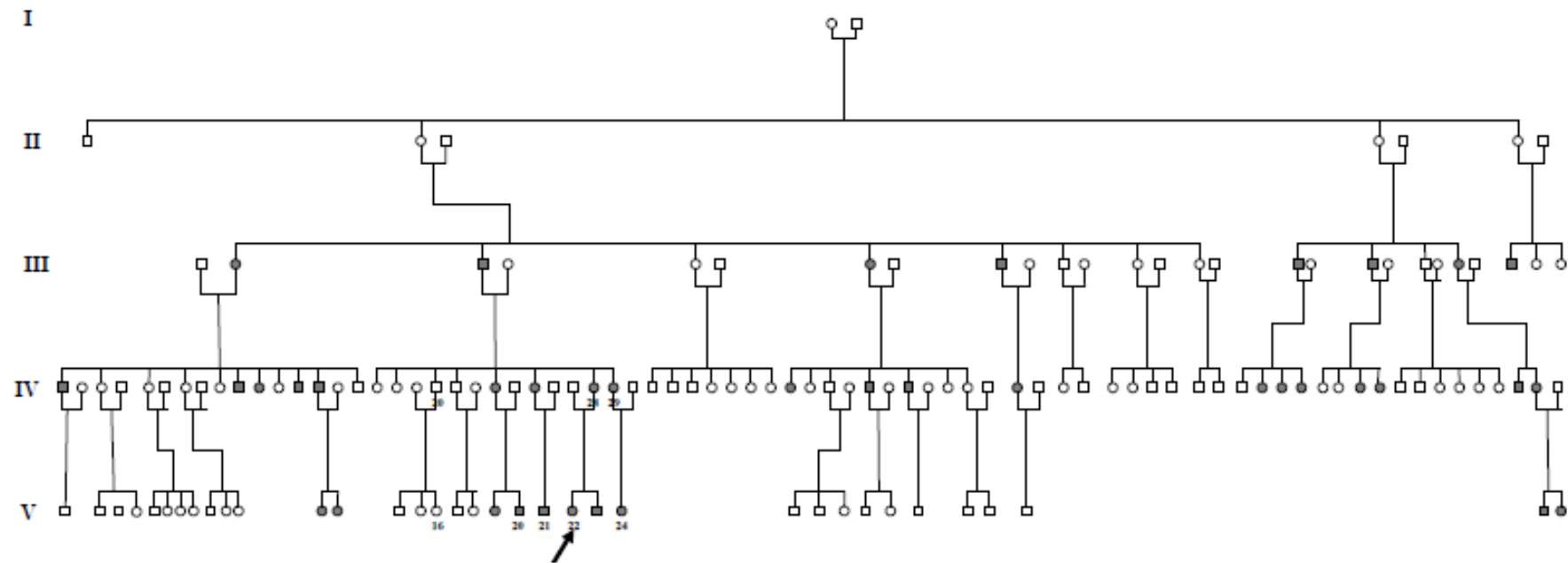


Abb. 8: Stammbaum der Familie. Kreise stellen weibliche, Quadrate männliche Familienmitglieder dar. Dunkel ausgefüllte Kreise bzw. Quadrate zeigen betroffene Individuen. Nicht betroffene Individuen sind durch nicht ausgefüllte Kreise bzw. Quadrate dargestellt. Mit dem Pfeil ist die Indexpatientin III:9 markiert.

10. Danksagung

Mein größter Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Regina Betz für die Bereitstellung des Themas dieser Arbeit und die ausgezeichnete Betreuung. Sie hatte bei Fragen und Problemen immer ein offenes Ohr und gab mir die Möglichkeit, neben dieser Arbeit auch an einem weiteren Projekt zu arbeiten.

Vielen Dank den Mitarbeitern der AG Betz- Aytaj, Ayla, Damian, Maria R., Maria W., Sabrina für die tolle Arbeitsatmosphäre und die vielen hilfreichen Anregungen und Ratschläge.

Herrn Prof. Dr. med. Andreas Müller danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens.

Mein Dank gilt auch Prof. Frédéric Caux für die Kontaktierung und klinische Untersuchung der Familie. Ich danke auch den Mitgliedern der Familie, die sich bereit erklärt haben, Teil dieser Arbeit zu sein und mir Blut- und Haarproben zur Verfügung zu stellen.

Vielen Dank an die AG Nürnberg des Cologne Center for Genomics (Prof. Dr. Peter Nürnberg, Dr. Holger Thiele und Dr. Janine Altmüller) für die Durchführung der Exomsequenzierung.

Danken möchte ich auch der Medizinischen Fakultät Bonn für die Förderung der Arbeit im Rahmen des BONFOR SciMed-Promotionsstipendiums, besonders Prof. Dr. med. Philipp Sasse für das Mentoring.

Ein großer Dank gilt auch meiner Familie, Martin und meinen Freunden für die uneingeschränkte Unterstützung während meines Studiums und dieser Arbeit.