

Aus dem Institut für Humangenetik
(Direktor: Prof. Dr. med. R. Siebert)
im Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel
an der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

IDENTIFIZIERUNG DES *SLC8A3*-GENS
ALS KANDIDATENGEN
FÜR DAS DE MORSIER SYNDROM
DURCH MOLEKULARZYTOGENETISCHE CHARAKTERISIERUNG
EINER TRANSLOKATION $t(1;14)$

Inauguraldissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Medizinischen Fakultät
der Christian-Albrechts-Universität zu Kiel

vorgelegt von
ANNIKA BASNER
aus Itzehoe

Kiel 2008

| | |
|--------------------------------|---|
| 1. Berichterstatter: | Herr Prof. Dr. med. Reiner Siebert |
| 2. Berichterstatter: | Herr Prof. Dr. med. Ulrich Stephani |
| Tag der mündlichen Prüfung: | 18.12.2009 |
| Zum Druck genehmigt, Kiel, den | 18.12.2009 |
| gez. | Herr Prof. Dr. med. Gregor Kuhlenbäumer |

| <u>Inhaltsverzeichnis</u> | | Seite |
|-----------------------------------|---|--------------|
| Inhaltsverzeichnis..... | | I |
| Abkürzungsverzeichnis..... | | IV |
| 1. | Einleitung..... | 1 |
| 1.1 | De Morsier Syndrom (Septo-optische Dysplasie)..... | 1 |
| 1.1.1 | Klinisches Erscheinungsbild des De Morsier Syndroms..... | 1 |
| 1.1.2 | Diagnostik des De Morsier Syndroms..... | 3 |
| 1.1.3 | Ätiologie des De Morsier Syndroms..... | 4 |
| 1.1.3.1 | Risikofaktoren für das Auftreten des De Morsier Syndroms..... | 4 |
| 1.1.3.2 | Genetische Ursachen des De Morsier Syndroms..... | 5 |
| 1.1.3.2.1 | Mutationen im <i>HESX1</i> -Gen..... | 5 |
| 1.1.3.2.2 | Mutationen in weiteren Genen..... | 8 |
| 1.2 | Ziele dieser Arbeit..... | 10 |
| 2. | Material und Methoden..... | 11 |
| 2.1 | Untersuchungsmaterial..... | 11 |
| 2.2 | Materialien..... | 12 |
| 2.2.1 | Chemikalien..... | 12 |
| 2.2.2 | Geräte..... | 13 |
| 2.2.3 | Puffer und Lösungen..... | 14 |
| 2.2.4 | Kits..... | 16 |
| 2.2.5 | Software und Online-Datenbanken..... | 16 |
| 2.2.6 | BAC- und Fosmid-Sonden..... | 16 |
| 2.2.7 | Primer..... | 20 |
| 2.3 | Methoden..... | 20 |
| 2.3.1 | Array-Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)..... | 21 |
| 2.3.1.1 | Durchführung der Array-CGH..... | 21 |
| 2.3.1.2 | Auswertung der Array-CGH..... | 22 |
| 2.3.2 | Eingrenzung der Bruchpunkte mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)..... | 22 |
| 2.3.2.1 | Präparation von BAC- und Fosmid-DNA..... | 23 |
| 2.3.2.2 | Markierung und Aufreinigung der DNA-Proben für FISH..... | 23 |
| 2.3.2.3 | Präparation der markierten Sonden..... | 24 |
| 2.3.2.4 | Herstellung von Auftropfpräparaten aus Zellsuspensionen für FISH..... | 24 |
| 2.3.2.5 | Hybridisierung..... | 25 |

| | | |
|-----------|--|-----------|
| 2.3.2.6 | Waschen und Färben der Präparate..... | 25 |
| 2.3.2.7 | Auswertung und Dokumentation der FISH-Untersuchungen..... | 25 |
| 2.3.3 | Long-Distance-Polymerasekettenreaktion (LD-PCR)..... | 26 |
| 2.3.3.1 | Durchführung der LD-PCR bei modifizierten Reaktionsbedingungen..... | 27 |
| 2.3.3.2 | Kombination der Primer und PCR-Programme..... | 27 |
| 2.3.3.3 | Analyse der LD-PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese..... | 30 |
| 2.3.3.4 | Ausschneiden und Aufreinigung der LD-PCR-Produkte aus Agarosegelen..... | 30 |
| 2.3.3.5 | Isolierung und Klonierung der LD-PCR-Produkte..... | 30 |
| 2.3.3.6 | Sequenz-PCR..... | 31 |
| 2.3.3.7 | Aufreinigung der Sequenz-PCR-Produkte..... | 32 |
| 2.3.3.8 | Sequenzierung..... | 32 |
| 2.3.3.9 | Auswertung und Dokumentation der Sequenzen..... | 32 |
| 2.3.4 | Durchführung einer hochauflösenden genomweiten Microarray-Analyse mit dem Genome-Wide Human SNP 6.0 Array..... | 32 |
| 3. | Ergebnisse..... | 34 |
| 3.1 | Phänotyp des Patienten mit der Translokation t(1;14) und Ergebnisse der klinischen Diagnostik..... | 34 |
| 3.2 | Ergebnisse der genetischen Untersuchungen..... | 38 |
| 3.2.1 | Nachweis der Translokation t(1;14) mittels konventioneller Chromosomenanalyse..... | 38 |
| 3.2.2 | Ausschluss submikroskopischer Imbalancen mittels Array-CGH..... | 40 |
| 3.2.3 | Eingrenzung der Bruchpunkte der Translokation t(1;14) mittels FISH..... | 40 |
| 3.2.3.1 | Kontrolluntersuchungen..... | 41 |
| 3.2.3.2 | Kartierung des Bruchpunktes in 1p mittels BAC- und Fosmid-Sonden..... | 42 |
| 3.2.3.3 | Kartierung des Bruchpunktes in 14q mittels BAC- und Fosmid-Sonden.... | 45 |
| 3.2.3.4 | Zusammenfassung: FISH mit BAC- und Fosmid-Sonden..... | 48 |
| 3.2.4 | Ergebnisse der Long-Distance-PCRs und Auswertung der Sequenzen.... | 49 |
| 3.2.5 | Identifizierung der Kandidatengene in 1p und 14q..... | 50 |
| 3.2.6 | Auswertung der Array-CGH im Hinblick auf genomische Imbalancen im Bereich der eingegrenzten Kandidatengene..... | 52 |
| 3.2.7 | Identifizierung von <i>SLC8A3</i> als Kandidatengen für das De Morsier Syn- drom mittels eines Affymetrix GeneChip® Mapping Arrays..... | 54 |

| | | |
|-----------|---|--------------|
| 4. | Diskussion..... | 55 |
| 4.1 | Einsatz des Genome-Wide Human SNP 6.0 Arrays zur Detektion sub-mikroskopischer Imbalancen im Bruchpunktbereich..... | 55 |
| 4.2 | Einsatz der Long-Distance-PCR zur Klonierung der Bruchpunkte der Translokation t(1;14)..... | 57 |
| 4.3 | Identifizierte Kandidatengene und ihre Funktion im Hinblick auf die Entstehung eines De Morsier Syndroms..... | 58 |
| 4.3.1 | Das <i>CYP4A22</i> -Gen..... | 58 |
| 4.3.2 | Das <i>SMOC1</i> -Gen..... | 59 |
| 4.3.3 | Das <i>SLC8A3</i> -Gen als neues Kandidatengen für das De Morsier Syndrom..... | 60 |
| 4.4 | Patient mit der Translokation t(1;14) und andere Risikofaktoren..... | 61 |
| 4.5 | Fazit..... | 62 |
| 4.6 | Ausblick..... | 62 |
| 5. | Zusammenfassung..... | 64 |
| 6. | Literaturverzeichnis..... | VI |
| 7. | Anhang..... | XII |
| 7.1 | Übersicht der Lage einzelner Oligonukleotide bei der Array-CGH..... | XII |
| 7.2 | Signalkonstellationen der Fosmid-Sonden..... | XIII |
| 7.3 | Ergebnisse der LD-PCRs mit den verschiedenen Primerkombinationen...XIV | XIV |
| 7.4 | Darstellung der Auswertung der Sequenzen..... | XV |
| 8. | Danksagung..... | XVIII |
| 9. | Lebenslauf..... | XIX |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--|---|
| A | Alanin, eine Aminosäure |
| A | Adenin, Purinbase der DNA |
| A. | Arteria |
| Abb. | Abbildung |
| ACTH | adrenocorticotropes Hormon |
| ADH | antidiuretisches Hormon |
| APGAR | Index, der Auskunft über die postnatale Adaptation des Neugeborenen gibt (10 = höchster Wert; 0 = niedrigster Wert) |
| Aqua dest. | destilliertes Wasser |
| BAC | künstliches Bakterienchromosom (Bacterial Artificial Chromosome) |
| bp | Basenpaare |
| C | Cytosin, Pyrimidinbase der DNA |
| CGH | <u>C</u> omparative <u>G</u> enomic <u>H</u> ybridization |
| Chr.1 | Chromosom 1 |
| Chr.14 | Chromosom 14 |
| cm | Zentimeter |
| CNVs | <u>C</u> opy <u>N</u> umber <u>V</u> ariations |
| Cot-1-DNA | DNA-Fraktion mit hohem Anteil hochrepetitiver Sequenzen |
| CT | Computertomographie |
| DABCO | 1,4-Diazabicyclooctan |
| DAPI | Diamidinophenylindoldihydrochlorid |
| dATP | 2`-Desoxyadenosin 5`-triphosphat |
| dCTP | 2`-Desoxycytidin 5`-triphosphat |
| del | Deletion (Verlust genetischen Materials) |
| dGTP | 2`-Desoxyguanosin 5`-triphosphat |
| DNA | Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleic acid) |
| dNTP | 2`-Desoxynucleotid 5`-triphosphat |
| dTTP | 2`-Desoxythymidin 5`-triphosphat |
| dUTP | 2`-Desoxyuridin 5`-triphosphat |
| E | Glutaminsäure, eine Aminosäure |
| E. coli | Escherichia coli |
| EDTA | Ethylendiamintrichloressigsäure |
| EEG | Elektroenzephalogramm |
| EKG | Elektrokardiogramm |
| FISH | Fluoreszenz in situ Hybridisierung (fluorescence in situ hybridization) |
| FSH | follikelstimulierendes Hormon |
| G | Glycin, eine Aminosäure |
| G | Guanin, Purinbase der DNA |
| g | Gramm |
| H | Histidin, eine Aminosäure |
| h | Stunde |
| <i>HESX1</i> (human)/ <i>Hesx1</i> (Maus) | homeobox gene expressed in embryonic stem cells, Spezies spezifische Nomenklatur |
| I | Isoleucin, eine Aminosäure |
| ins | Insertion (eingefügtes Chromosomenmaterial) |
| K | Lysin, eine Aminosäure |
| kb | Kilobasen |
| L | Leucin, eine Aminosäure |
| LD-PCR | <u>L</u> ong- <u>D</u> istance-PCR |
| LH | luteinisierendes Hormon |
| <i>LHX3</i> | <i>LIM Homeobox Gene 3</i> |

Abkürzungsverzeichnis

| | |
|--------------------------------|--|
| LHX4 | <i>LIM Homeobox Gene 4</i> |
| LINE | <u>L</u> ong <u>I</u> nterspersed <u>N</u> ucleotide <u>E</u> lement |
| M | molar |
| mg | Milligramm |
| min | Minute |
| ml | Milliliter |
| MLPA | <u>M</u> ultiplex <u>L</u> igation-dependent <u>P</u> robe <u>A</u> mplification |
| µg | Mikrogramm |
| µl | Mikroliter |
| MRT | Magnetresonanztomographie |
| NCX3 | Sodium-Calcium-Exchanger 3 (= SLC8A3) |
| ng | Nanogramm |
| nm | Nanometer |
| Nn. optici | Nervi optici (Sehnerven) |
| Nr. | Nummer |
| p | kurzer Chromosomenarm (p=petit) |
| PBS | phosphate buffered Saline (Salzlösung mit Phosphat gepuffert) |
| PCR | <u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction (Polymerasekettenreaktion) |
| pH | negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionenkonzentration |
| Pit-1 | Pituitary-specific homeodomain factor (= POU1F1) |
| pmol | Picomol |
| PROP1 | Prophet of Pit-1 (Transkriptionsfaktor) |
| Q | Glutamin, eine Aminosäure |
| q | langer Chromosomenarm (q=queue) |
| R | Arginin, eine Aminosäure |
| Rpx | Rathke`s pouch homeobox (= HESX1) |
| S | Serin, eine Aminosäure |
| s. | siehe |
| s | Sekunde |
| sgf | spectrum green |
| SINE | <u>S</u> hort <u>I</u> nterspersed <u>N</u> ucleotide <u>E</u> lement |
| SLC8A3 | Solute Carrier Family 8, Member 3, ein Natrium-Calcium-Austauscher |
| SMOC1 | <u>S</u> PARC-Related- <u>M</u> odular- <u>C</u> alcium- <u>B</u> inding1 |
| SNP | <u>S</u> ingle <u>N</u> ucleotide <u>P</u> olymorphism (Einzelnukleotidpolymorphismus) |
| so | spectrum orange |
| SSC | standard saline citrat (Standard Salzlösung aus Natriumchlorid und Natriumcitrat) |
| SOD | Septo-optische Dysplasie (Septo-Optic Dysplasia) |
| SOX2/3 | SRY related HMG Box (SRY= <u>S</u> ex <u>D</u> etermining <u>R</u> egion of <u>Y</u> , HMG= <u>H</u> igh <u>M</u> obility <u>G</u> roup Class), Transkriptionsfaktoren |
| SPARC | <u>S</u> ecreted <u>P</u> rotein, <u>A</u> cidic, <u>C</u> ysteine- <u>R</u> ich |
| STH | Somatotropes Hormon (Wachstumshormon) |
| T | Threonin, eine Aminosäure |
| T | Thymin, Pyrimidinbase der DNA |
| T ₃ /T ₄ | Trijodthyronin/ Tetrajodthyronin (Schilddrüsenhormone) |
| t(1;14) | Austausch (Translokation) von Bereichen auf den Chromosomen 1 und 14 |
| TBE | tris buffered saline |
| TBX19 | T-Box 19 |
| Tris | Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan |
| TSH | thyreoidestimulierendes Hormon |
| U/min | Umdrehungen pro Minute |
| V | Volt |
| X-Gal | 5-Brom-4-chlor-3-indolyl-β-D-galactosid |
| z.B. | zum Beispiel |

1. Einleitung

1.1 De Morsier Syndrom (Septo-optische Dysplasie)

Das De Morsier Syndrom (Synonym: Septo-optische Dysplasie, SOD) ist ein seltenes, klinisch heterogenes kongenitales Fehlbildungssyndrom, über das Reeves im Jahr 1941 erstmals berichtete (Reeves, 1941; Kelberman und Dattani, 2007a). Im Jahr 1956 wurde es von Georges de Morsier detailliert beschrieben (de Morsier, 1956). Es kann je nach Schweregrad direkt nach der Geburt aber auch erst später beim Heranwachsenden klinisch in Erscheinung treten. Die beschriebene Häufigkeit des Syndroms beträgt 1/10.000 Lebendgeborene, wobei Jungen ebenso häufig betroffen zu sein scheinen wie Mädchen (Patel et al., 2006). Es gibt eine Reihe charakteristischer Fehlbildungen und Symptome, die unterschiedlich häufig und mit variierendem Schweregrad bei dem De Morsier Syndrom vorkommen, so dass der Phänotyp sehr variabel ist (Dattani, 2001).

1.1.1 Klinisches Erscheinungsbild des De Morsier Syndroms

Charakteristisch für das De Morsier Syndrom sind typische Fehlbildungen des Gehirns und der Sehnerven sowie hormonelle Dysregulationen, die mit einer Hypophysenfehlbildung assoziiert sind. Dazu treten bei einigen Patienten variierende Dismorphiezeichen in Erscheinung.

Fehlbildungen des Gehirns:

Bedingt durch eine fehlerhafte Embryonalentwicklung gehören zu dem für das De Morsier Syndrom typischen Symptomkomplex meistens ein Mittelliniendefekt des Gehirns mit Agenesie oder Hypoplasie von Septum pellucidum und/oder Corpus callosum. Ebenso typisch ist eine uni- oder bilaterale Optikushypoplasie oder Optikusdysplasie mit Amaurose oder Visusverlust. Die dritte für das De Morsier Syndrom bedeutsame Fehlbildung betrifft die Hypophyse. So haben Patienten mit einem De Morsier Syndrom oft eine hypoplastische Adenohypophyse und/oder eine ektope Neurohypophyse (Acers, 1981; Polizzi et al., 2006). Die einzelnen Fehlbildungen kommen in unterschiedlichen Kombinationen vor. Dies bedingt die hohe Variabilität des Phänotyps. Bei der Auswertung verschiedener Untersuchungen von Patienten mit bilateraler Optikushypoplasie war bei 60% der Patienten zusätzlich eine Agenesie des Septum pellucidum und bei 62% der Patienten ein zusätzlicher Hypopituitarismus nachweisbar. Eine komplette Manifestation aller drei Komponenten des Syndroms lag bei ungefähr 30% der Patienten mit bilateraler Optikushypoplasie vor (Morishima und Aranoff, 1986).

Hormonelle Dysregulationen:

Mit den Fehlbildungen der Hypophyse sind meistens ein Hypopituitarismus sowie Funktionsstörungen des hypothalamo-hypophysären Systems assoziiert (Polizzi et al., 2006). Die verschiedenen betroffenen hormonellen Regelkreisläufe bedingen variierende hormonelle Dysfunktionen.

Dazu gehört sehr häufig ein Mangel an STH (somatotropes Hormon, Wachstumshormon), der zu Minderwuchs führt. Damit kombiniert sein kann ein Mangel an TSH (thyreoidea-stimulierendes Hormon), so dass es zum Mangel an den Schilddrüsenhormonen T₃ (Trijodthyronin) und T₄ (Tetraiodthyronin) und den sich daraus ergebenden Symptomen einer Hypothyreose kommt. Ebenso kann ein Mangel an ACTH (adrenocorticotropes Hormon) auftreten, der einen Mangel an Cortisol zur Folge hat. Dieser wird bei betroffenen Patienten besonders in Stresssituationen (z.B. bei Infekten) auffällig. Durch das fehlende Cortisol und STH ereignen sich oft schon einige Stunden nach der Geburt rezidivierende Hypoglykämien. Auch ein Mangel an LH (luteinisierendes Hormon) und FSH (follikelstimulierendes Hormon) tritt bei einigen Fällen in Erscheinung (Arslanian et al., 1984). Eher selten kommt es durch Mangel an ADH (antidiuretisches Hormon) zu einem hypophysären Diabetes insipidus (Donahue et al., 2005). Seltener ist auch ein Anstieg des Prolaktins im Serum (Willnow et al., 1996). Teilweise entstehen durch Fehlbildungen im Bereich des Hypothalamus Störungen der Temperaturregulation (Sobrier et al., 2006).

Weitere assoziierte Dysmorphien, Fehlbildungen und Symptome:

Manchmal sind bei dem De Morsier Syndrom weitere zerebrale Fehlbildungen (z.B. Schizenzephalien) nachweisbar (Barkovich et al., 1989). Aufgrund der zerebralen Fehlbildungen können Entwicklungsverzögerungen sowie eine mehr oder weniger starke mentale Retardierung und motorische Defizite beobachtet werden (Miller et al., 2000). Außerdem kann es zum Auftreten entsprechender fokaler Symptome sowie epileptischer Anfälle kommen. Zudem wird ein verlängerter Neugeborenenikterus beschrieben, der pathogenetisch ungeklärt ist (Stangel et al., 1998). Im weiteren Verlauf kann man oft muskuläre Hypotonien beobachten. Gelegentlich kommt es zu einem Strabismus, einem Astigmatismus oder Hornhauttrübungen sowie Nystagmen, die sich in unterschiedlicher Form manifestieren können. Ebenfalls sind Mikrophthalmie und Kolobome der Iris, Choroidea und Retina in manchen Fällen mit dem Syndrom assoziiert. Betroffene Jungen haben häufig einen Mikropenis und/oder Kryptorchismus (Acers, 1981). Es gibt auch Beschreibungen über das Auftreten des De Morsier Syndroms in Kombination mit Fehlbildungen der Finger (Harrison et al., 2004; Orrico et al., 2002). Weitere Dysmorphiezeichen können sowohl im Gesicht (z.B. Hypertelorismus, Synophrys, tiefliegende Nasenwurzel, langes Philtrum) als auch in anderen Körperregionen auffallen (Polizzi et al., 2006).

1.1.2 Diagnostik des De Morsier Syndroms

Die Diagnose eines De Morsier Syndroms wird aufgrund der Vielfältigkeit der Befunde, die nicht immer eindeutig sind, oft erst spät gestellt (De Smedt et al., 2000). Bei vielen Betroffenen fallen zunächst Sehstörungen und später sehr häufig ein vermindertes Längenwachstum auf (Arslanian et al., 1984).

Die Diagnostik kann über den Nachweis der Optikushypoplasie durch Ophthalmoskopie erfolgen, bei der typischerweise im Bereich der Sehnervenpapille ein Sehnerv mit einem inneren hypoplastischen Ring und einem äußeren leuchtenden Rand zu sehen ist (Brook et al., 1972). Wegen dieser Veränderungen kann die Ophthalmoskopie für die Diagnosefindung wegweisend sein (De Smedt et al., 2000).

Auch das MRT (Magnetresonanztomographie) hat inzwischen große Bedeutung bei der Diagnostik der einzelnen zerebralen Fehlbildungen erlangt (Brodsky et al., 1993). Das CT (Computertomographie) kann ebenfalls zur Diagnostik genutzt werden. Der Nachweis der Agenesie von Septum pellucidum und/oder Corpus callosum über MRT und/oder CT gehört zur Diagnostik des De Morsier Syndroms, wobei gerade der Nachweis einer Agenesie des Septum pellucidum ein wichtiger Hinweis auf weitere zerebrale Fehlbildungen ist (Barkovich et al., 1989). Gelegentlich ist im MRT/CT auch eine hypoplastische Adeno- und/oder eine ektope Neurohypophyse sowie eine leer erscheinende Sella turcica (empty sella) zu erkennen, die schon Georges de Morsier anhand von anatomischen Präparaten im Jahre 1956 beschrieb (de Morsier, 1956; Mitchell et al., 2002; Melo et al., 2007). Außerdem gehören endokrinologische Stimulationstests zum Nachweis der hormonellen Dysfunktionen zur Basisdiagnostik.

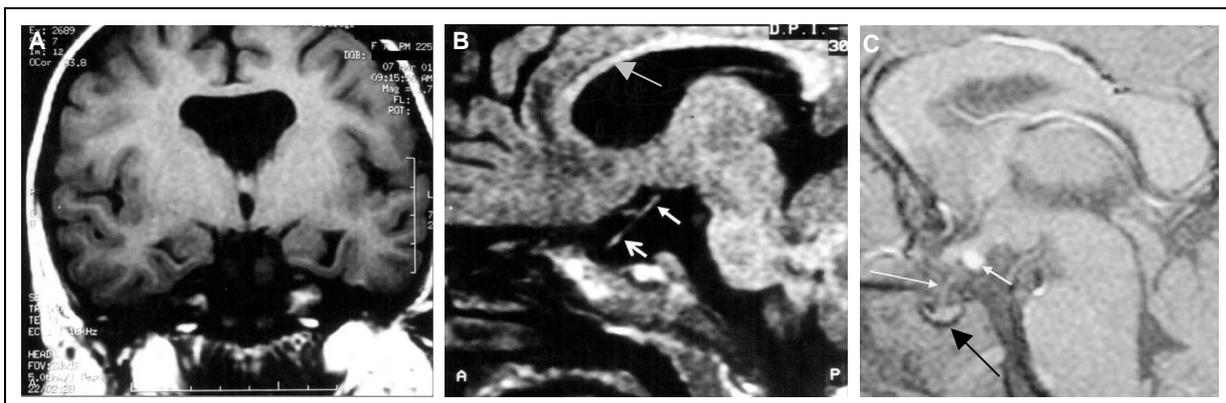


Abbildung 1: MRT-Bilder der verschiedenen zerebralen Fehlbildungen des De Morsier Syndroms. A: Koronares T1-gewichtetes Bild: Agenesie des Septum pellucidum und damit einhergehende fehlende Trennung der beiden Seitenventrikel. B: Sagittales T1-gewichtetes Bild: Hypoplasie des Corpus callosum (grauer Pfeil) sowie Hypoplasie des N. opticus (unterer weißer Pfeil) und des Chiasma opticum (oberer weißer Pfeil) (A u. B.: aus Polizzi et al., 2006). C: Sagittales T1-gewichtetes Bild: Hypoplastische Adenohypophyse in der Sella turcica (schwarzer Pfeil), schmales Infundibulum (unterer weißer Pfeil) und ektope Neurohypophyse (oberer weißer Pfeil) (C: aus Mitchell et al., 2002)

1.1.3 Ätiologie des De Morsier Syndroms

1.1.3.1 Risikofaktoren für das Auftreten des De Morsier Syndroms

Die Ätiologie des De Morsier Syndroms ist nicht vollständig geklärt. Die meisten Fälle treten scheinbar idiopathisch bzw. sporadisch auf. Dabei werden verschiedene Ursachen und Risikofaktoren diskutiert:

Das maternale Alter bei Geburt ist als ein beeinflussender Faktor für das De Morsier Syndrom beschrieben worden. So werden Patienten mit einem De Morsier Syndrom nach einer normal verlaufenden Schwangerschaft gehäuft von Müttern geboren, die signifikant jünger als der Durchschnitt sind (Murray et al., 2005; Rainbow et al., 2005). In Regionen mit hohen Schwangerschaftsraten bei Jugendlichen treten zudem sowohl die isolierte Optikushypoplasie als auch das De Morsier Syndrom vermehrt auf (Patel et al., 2006; Mc Nay et al., 2007). In einigen Studien wird auch ein Zusammenhang zwischen dem Auftreten des De Morsier Syndroms und schlechten sozialen Verhältnissen beschrieben. Das De Morsier Syndrom kommt zudem häufiger in Regionen mit hoher Arbeitslosigkeit vor. Auch Nikotin- und Alkoholabusus während der Schwangerschaft sind als Risikofaktoren für die Entstehung eines De Morsier Syndroms beschrieben worden (Patel et al., 2006; Mc Nay et al., 2007). Die Einnahme von Drogen wie Kokain, Heroin, Amphetaminen und diversen anderen Präparaten soll ebenfalls ein Risikofaktor sein (Orrico et al., 2002). Außerdem werden Frühgeburtlichkeit, ein geringes Geburtsgewicht, die erste Gravidität, Infektionen und die Einnahme von Antidepressiva sowie Ovulationshemmern während der Schwangerschaft als wahrscheinliche Risikofaktoren sowohl für das De Morsier Syndrom als auch für die isolierte Optikushypoplasie beschrieben (Tornqvist et al., 2002; Roessmann et al., 1987).

Im Jahr 1997 wurde zusätzlich die Hypothese geäußert, dass das De Morsier Syndrom möglicherweise eine vaskuläre Schwäche als Ursache hat, die den proximalen Abschnitt der A. cerebralis anterior betrifft. Das könnte das Spektrum der Fehlbildungen erklären, die von unterschiedlichen Geweben zu verschiedenen Zeitpunkten der Organogenese ausgehen (Lubinsky, 1997). Ähnliche Hinweise geben ein Patient mit De Morsier Syndrom und durch amniotische Abschnürungen entstandene Lippendefekte sowie Betroffene mit neurologischen Auffälligkeiten, die an Symptome nach zerebralen Gefäßverschlüssen erinnern (Stevens und Dobyns, 2004).

1.1.3.2 Genetische Ursachen des De Morsier Syndroms

1.1.3.2.1 Mutationen im *HESX1*-Gen

In seltenen Fällen wurden bei Patienten mit einem De Morsier Syndrom Mutationen im *HESX1*-Gen (*homeobox gene expressed in embryonic stem cells*) nachgewiesen. Hierbei handelt es sich um ein Gen auf dem kurzen Arm von Chromosom 3 (3p21.2-p21.1), das zu der Familie der Homöobox-Gene gehört (Thomas et al., 1995). Es ist auch als *Rpx* (*Rathke's pouch homeobox*) bekannt (Hermesz et al., 1996).

Die Homöobox-Gene kodieren für die große Gruppe der Homöoproteine. Diese sind Transkriptionsfaktoren, welche die Embryonalentwicklung von Organismen steuern. Entstehen durch Mutationen in diesen Genen fehlerhafte Proteine, kann das durch Fehlfunktionen zu Fehlentwicklungen führen.

Das *HESX1*-Gen besitzt eine konservierte Sequenz, die zwei Kilobasen umspannt, aus vier kodierenden Exons besteht und für den Transkriptionsfaktor HESX1 kodiert (Dattani et al., 1998). Dieser wird während der Embryonalentwicklung bereits sehr früh im Mesendoderm im Bereich der Mittellinie und im vorderen Bereich des Embryos exprimiert und ist verantwortlich für die korrekte Anordnung des Neuroektoderms zu Beginn der ZNS-Bildung (Thomas und Beddington, 1996).

Hesx1 ist bei Mäuseembryonen zu Beginn der Gastrulation im vorderen Bereich des viszeralen Endoderms nachweisbar. Bei fortschreitender Embryonalentwicklung kommt es zur Expression im angrenzenden Ektoderm, woraus sich das ventrale Prosenzephalon entwickelt. Außerdem findet man Hesx1 im vorderen Bereich des Embryos, wo sich später das Diencephalon entwickelt, aus welchem sich im Verlauf die Augenbläschen ausstülpen, sowie im oralen Ektoderm. Aus diesem bildet sich unter anderem die Rathke-Tasche als Vorläufer des Hypophysenvorder- und des intermediären Hypophysenlappens. So kommt es bei homozygoten Knockout-Mäusen für das *Hesx1*-Gen zu einer Fehlentwicklung der Vorderhirnstrukturen, der Augen, der vorderen und hippokampalen Kommissur, der Hypophyse, hypothalamischer Strukturen und des olfaktorischen Systems (Dattani et al., 1998; Thomas und Beddington, 1996).

HESX1 fungiert als Promotor-spezifischer Repressor (Brickmann et al., 2001). Er wird mit einigen anderen Transkriptionsfaktoren koexprimiert, die für die Entwicklung verschiedener Hirnbereiche und auch der Hypophyse von Bedeutung sind (Chou et al., 2006). Mutationen können sein Bindungsvermögen an die DNA (Desoxyribonukleinsäure) und auch seine Funktion als Repressor verändern (Brickmann et al., 2001). Seine Expression während der Organogenese ist dynamisch und wird von verschiedenen Regulationselementen sowohl positiv als auch negativ gesteuert (Hermesz et al., 2003). Wichtig ist seine Funktion als Repressor von PROP1 (Prophet of Pit-1 (Pituitary-specific homeodomain factor 1)) während

der Organogenese der Hypophyse und seine Funktion im Zusammenhang mit weiteren Corepressoren. PROP1 ist ebenfalls ein Transkriptionsfaktor, der als Aktivator den Beginn der Entwicklung und Differenzierung der hypophysären Zellen initiiert und außerdem wichtig ist für die Bildung von Pit-1(= POU1F1). Das ist ein weiterer Transkriptionsfaktor, der wiederum für die terminale Differenzierung der hormonbildenden Zellen des Hypophysenvorderlappens von großer Bedeutung ist (Dattani, 2001). Erscheint PROP1 während der Embryonalentwicklung zu früh, entwickelt sich die Hypophyse nicht, was die Bedeutung der Funktion von HESX1 als Repressor von PROP1 für die korrekte Entwicklung der Hypophyse zeigt (Dasen et al., 2001).

Im Jahr 1998 konnte erstmals eine Mutation innerhalb des *HESX1*-Gens bei zwei Geschwistern mit einem De Morsier Syndrom nachgewiesen werden (Dattani et al., 1998). Danach wurden weitere Mutationen im *HESX1*-Gen im Zusammenhang mit dem Auftreten eines De Morsier Syndroms beschrieben. Diese Mutationen und die mit ihnen assoziierten Phänotypen sowie das jeweilige familiäre Auftreten sind in Abbildung 2 und Tabelle 1 dargestellt. Allerdings wurden alle beschriebenen Mutationen immer nur bei einem einzigen Betroffenen mit dem De Morsier Syndrom oder innerhalb einer Familie nachgewiesen. Insgesamt wurden bei weniger als 1% aller untersuchten Patienten mit einem De Morsier Syndrom Mutationen im *HESX1*-Gen gefunden (Mc Nay et al., 2007).

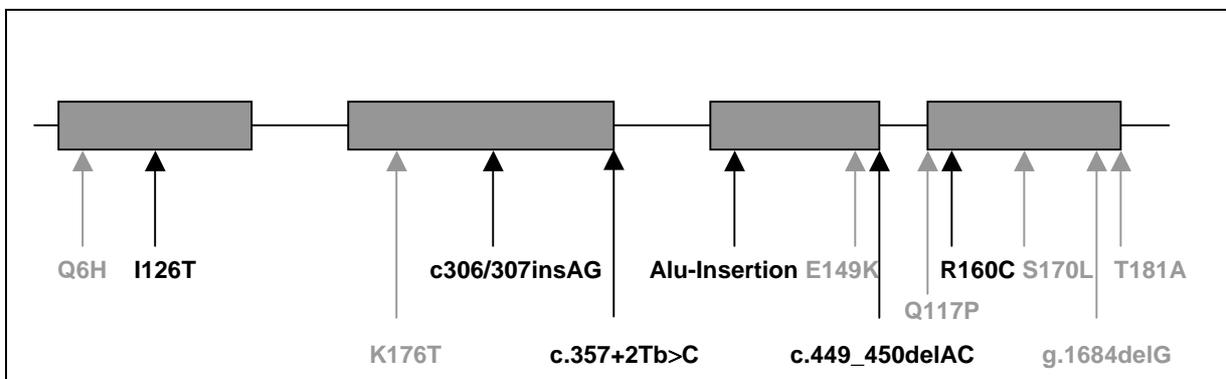


Abbildung 2: Schematische Darstellung der Mutationen innerhalb der vier kodierenden Exons des *HESX1*-Gens, die bei Patienten mit einem De Morsier Syndrom oder einer Fehlbildung der Hypophyse und einem damit verbundenen Mangel an hypophysären Hormonen identifiziert wurden. Mutationen, bei denen ein autosomal dominanter Erbgang vermutet wird, sind grau und Mutationen, bei denen ein autosomal rezessiver Erbgang vermutet wird, sind schwarz gekennzeichnet. (Adaptiert nach: Kelberman und Dattani, 2007a; Coya et al., 2007)

Tabelle 1: In der Literatur beschriebene Mutationen im *HESX1*-Gen und die korrelierenden Phänotypen

| Mutation | Betroffene und Phänotyp | Familiäres Auftreten | Referenz |
|--|--|--|-----------------------|
| homozygote R160C (C478T) Transition | ⇒ <u>zwei Geschwister, beide von der Mutation betroffen:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Hypoplasie des N. opticus beidseits • Agenesie des Septum pellucidum u. Corpus callosum • hypoplastische Adenohypophyse • ektope Neurohypophyse • Mangel an hypophysären Hormonen | <u>Eltern (miteinander verwandt):</u> Nachweis derselben Mutation (heterozygot), ebenso weitere Familienmitglieder von derselben Mutation heterozygot betroffen alle: Phänotypisch unauffällig → Vermutung eines autosomal rezessiven Erbgangs | Dattani et al., 1998 |
| heterozygote S170L (C509T) Transition | ⇒ <u>zwei betroffene Brüder:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Hypoplasie des N. opticus beidseits (nur bei einem Bruder) • ektope Neurohypophyse • Wachstumshormonmangel | <u>Mutter:</u> Nachweis derselben Mutation (heterozygot), phänotypisch unauffällig → Vermutung eines autosomal dominanten Erbganges mit unvollständiger Penetranz | Thomas et al., 2001 |
| heterozygote T181A (A514G) Transition | ⇒ <u>ein betroffener Patient:</u> <ul style="list-style-type: none"> • hypoplastische Adenohypophyse • Wachstumshormonmangel • TSH-Mangel | <u>ein Elternteil und ein Geschwisterkind:</u> ebenfalls heterozygot für dieselbe Mutation, phänotypisch unauffällig → Vermutung eines autosomal dominanten Erbganges mit unvollständiger Penetranz | Thomas et al., 2001 |
| heterozygote Q6H (G18C) Transition | ⇒ <u>ein betroffener Patient:</u> <ul style="list-style-type: none"> • hypoplastische Adenohypophyse • ektope Neurohypophyse • multipler Mangel an hypophysären Hormonen | <u>ein Elternteil:</u> ebenfalls heterozygot für dieselbe Mutation, phänotypisch unauffällig → Vermutung eines autosomal dominanten Erbganges mit unvollständiger Penetranz | Thomas et al., 2001 |
| heterozygote 2-Basenpaar-Insertion 306/307insAG | ⇒ <u>ein betroffener Patient:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Hypoplasie des N. opticus links • hypoplastische Adenohypophyse • ektope Neurohypophyse • multipler Mangel an hypophysären Hormonen | <u>kein familiärer Nachweis:</u> → Vermutung einer <i>de novo</i> Mutation | Tajima et al., 2003 |
| homozygote I26T (T77C) Transition | ⇒ <u>eine betroffene Patientin:</u> <ul style="list-style-type: none"> • hypoplastische Adenohypophyse • ektope Neurohypophyse • dünner Hypophysenstiel • Mangel an hypophysären Hormonen | <u>Eltern (miteinander verwandt):</u> keine Angaben zu Mutationen <u>eine Schwester:</u> Nachweis derselben Mutation, allerdings heterozygot, phänotypisch unauffällig → Vermutung eines autosomal rezessiven Erbgangs | Carvalho et al., 2003 |
| heterozygote Deletion in Position 1684 (g.1684delG) | ⇒ <u>ein betroffener Patient:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Hypoplasie des N. opticus beidseits • Agenesie des Corpus callosum • hypoplastische Adenohypophyse • ektope Neurohypophyse • Wachstumshormonmangel | <u>kein Auftreten in der Familie bekannt:</u> keine Geschwister | Cohen et al., 2003 |
| homozygote Alu-Element-Insertion in Exon 3 | ⇒ <u>eine betroffene Patientin:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Aplasie der Adenohypophyse • Mangel an hypophysären Hormonen • hypoplastische Sella turcica • Amaurose rechts wegen eines Koloboms am N. opticus rechts • Schlaganfall nach andauernder Hypoglykämie und folgendem Status epilepticus im Alter von vier Jahren | <u>Eltern (miteinander verwandt) und zwei weitere Geschwisterkinder:</u> alle phänotypisch unauffällig <u>drittes Geschwisterkind:</u> <ul style="list-style-type: none"> • Aplasie der Adenohypophyse • Mangel an hypophysären Hormonen • hypoplastische Sella turcica • Zwerchfellhernie links • Aortenocoarctation • Tod mit 18 Monaten nach intensivmedizinischer Therapie | Sobrier et al., 2005 |

Fortsetzung Tabelle 1

| | | | |
|--|---|--|-----------------------------|
| <p>homozygote Frameshift-Mutation (2-Basenpaar-Deletion) c.449_450delAC</p> | <p>⇒ <u>eine betroffene Patientin:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • dünnes Corpus callosum • Aplasie der Adenohypophyse • Mangel an hypophysären Hormonen | <p><u>beide Eltern und eine Schwester:</u> heterozygote Träger der Mutation, phänotypisch unauffällig → Vermutung eines autosomal rezessiven Erbgangs <u>ein Bruder, totgeboren:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Aplasie der Adenohypophyse <p><u>eine Schwester:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Tod 26 Tage nach der Geburt wegen Komplikationen bei rezidivierenden schweren Hypoglykämien und einer Sepsis <p><u>Mutter:</u> ein Abort</p> | <p>Sobrier et al., 2006</p> |
| <p>homozygoter Splicing-Defekt T357C (c.357+2Tb>C) (im Bereich des Intron 2)</p> | <p>⇒ <u>eine betroffene Patientin:</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Aplasie der Adenohypophyse • Mangel an hypophysären Hormonen | <p><u>beide Eltern:</u> heterozygote Träger der Mutation, phänotypisch unauffällig <u>eine Schwester:</u> nicht Trägerin der Mutation, phänotypisch unauffällig <u>Mutter:</u> zwei Aborte bei vorherigen Schwangerschaften</p> | <p>Sobrier et al., 2006</p> |
| <p>heterozygote Mutation E149K</p> | <p>⇒ <u>ein betroffener Patient :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • Wachstumshormonmangel • ektope Neurohypophyse | <p><u>ein Sohn :</u> heterozygoter Träger der Mutation, phänotypisch unauffällig → Vermutung eines autosomal dominanten Erbganges mit unvollständiger Penetranz</p> | <p>Mc Nay et al., 2007</p> |
| <p>heterozygote Mutation K176T</p> | <p>⇒ <u>ein betroffener Patient :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • ektope Neurohypophyse • Mangel an hypophysären Hormonen | <p><u>Mutter und eine Schwester:</u> heterozygote Träger derselben Mutation, beide phänotypisch unauffällig → Vermutung eines autosomal dominanten Erbganges mit unvollständiger Penetranz</p> | <p>Coya et al., 2007</p> |
| <p>heterozygote Mutation Q117P</p> | <p>⇒ <u>ein betroffener Patient :</u></p> <ul style="list-style-type: none"> • hypoplastische Adenohypophyse • ektope Neurohypophyse • Mangel an hypophysären Hormonen | <p><u>beide Eltern:</u> unauffälliger Phänotyp <u>Mutter:</u> ebenfalls Trägerin der Mutation → Vermutung eines autosomal dominanten Erbganges mit unvollständiger Penetranz</p> | <p>Coya et al., 2007</p> |

1.1.3.2.2 Mutationen in weiteren Genen

Neben den Genen *HESX1*, *PROP1* und *POU1F1* spielen diverse andere Gene eine Rolle bei der Entwicklung der hypothalamo-hypophysären Strukturen. Mutationen dieser Gene verursachen ebenfalls Fehlbildungen des hypothalamo-hypophysären Systems, aber kein De Morsier Syndrom. Zu nennen sind in diesem Zusammenhang die Gene *LHX3* (*LIM Homeobox Gene 3*), *LHX4* (*LIM Homeobox Gene 4*) und *TBX19* (*T-Box 19*) (Kelberman und Dattani, 2007b) (s. Tabelle 2).

Auch Gene der *SOX*-Familie (*SRY related HMG Box*) [(*SRY*=Sex Determing Region of Y, *HMG*= High Mobility Group Class)] sind an der Entwicklung der hypothalamo-hypophysären Strukturen beteiligt. Es wurden Mutationen in den Genen *SOX2* und *SOX3* beschrieben, die mit dem Auftreten von Symptomen oder Symptomkombinationen assoziiert sind, die für das

De Morsier Syndrom charakteristisch sind. Allerdings treten hier die Symptome oft nicht ganz typisch oder in Kombination mit anderen Symptomen und Fehlbildungen wie z.B. Anophthalmie oder Ösophagusatresie auf (s. Tabelle 2) (Kelberman und Dattani, 2007b; Kelberman et al., 2006; Woods et al., 2005).

Des Weiteren wurde in einer Einzelfallbeschreibung eines Patienten mit einer Kombination aus dem De Morsier Syndrom, Retinitis pigmentosa, hypertropher Kardiomyopathie und Rhabdomyolyse eine Mutation des mitochondrialen Cytochrom b nachgewiesen. Allerdings kann nur vermutet werden, dass diese Mutation zu den mit dem De Morsier Syndrom assoziierten Fehlbildungen geführt hat (Schuelke et al., 2002).

Tabelle 2: Humane Gene, die bei Mutationen eine Fehlentwicklung und/oder Funktionsstörungen der hypothalamo-hypophysären Strukturen verursachen können (Adaptiert nach: Kelberman und Dattani, 2007b)

| Gen | Phänotyp | Vererbung |
|--|--|------------------------|
| Kombinierter Mangel an hypophysären Hormonen: | | |
| POU1F1 | meist ausgeprägter STH-, TSH- und Prolaktinmangel, kleine oder normale Adenohypophyse | rezessiv, dominant |
| PROP1 | STH-, TSH-, LH-, FSH- und Prolaktinmangel, sich entwickelnder ACTH-Mangel, kleine, normale oder vergrößerte Adenohypophyse | rezessiv |
| Spezifische Syndrome: | | |
| HESX1 | isolierter STH-Mangel oder kombinierter Mangel an hypophysären Hormonen, SOD, hypoplastische Adenohypophyse, ektope Neurohypophyse, fehlendes Infundibulum, Corpus callosum Agenesie | rezessiv, dominant |
| LHX3 | kombinierter Mangel an hypophysären Hormonen, kurzer Hals mit verminderter Rotationsfähigkeit, kleine, normale oder vergrößerte Adenohypophyse, kurze Halswirbelsäule | rezessiv |
| LHX4 | kombinierter Mangel an hypophysären Hormonen, kleine Adenohypophyse, ektope Neurohypophyse, Kleinhirnfehlbildungen | dominant |
| SOX3 | isolierter STH-Mangel, mentale Retardierung, Panhypopituitarismus, hypoplastische Adenohypophyse, hypoplastisches Infundibulum, ektope Neurohypophyse | X-chromosomal-rezessiv |
| SOX2 | hypogonadotropher Hypogonadismus, hypoplastische Adenohypophyse, bilaterale An-/Mikrophthalmie, fehlgebildetes Corpus callosum, Lenschwierigkeiten, Ösophagusatresie, Hörverlust | de novo |
| TBX19 | neonataler ACTH-Mangel | rezessiv |

Insgesamt ist die genaue Ätiologie des De Morsier Syndroms bis zum jetzigen Zeitpunkt unklar. Es wird vermutet, dass dem De Morsier Syndrom eine multifaktorielle Genese zugrunde liegt, die sowohl von genetischen Faktoren als auch von verschiedenen Umweltfaktoren beeinflusst wird (Kelberman und Dattani, 2007b).

1.2 Ziele dieser Arbeit

Die Ätiologie des De Morsier Syndroms ist in den meisten Fällen unbekannt. Die Suche nach Kandidatengenen, in denen eine Mutation ein De Morsier Syndrom hervorrufen könnte, hat bislang nicht zum Ziel geführt. Eine Strategie zur Identifizierung neuer Krankheitsgene ist die Charakterisierung von *de novo* aufgetretenen strukturellen Chromosomenaberrationen bei Patienten mit definierten Phänotypen. Hier setzt die vorliegende Arbeit an:

Im Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel, wurde bei einem Patienten mit einem De Morsier Syndrom ohne Mutation im *HESX1*-Gen eine *de novo* Translokation t(1;14) mit einem Bruchereignis in 1p und einem Bruchereignis in 14q identifiziert.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollte diese Translokation t(1;14) sowohl mit zytogenetischen als auch mit molekularzytogenetischen und molekulargenetischen Methoden mit folgenden Zielen untersucht werden:

- 1.) Genomweiter Ausschluss genomischer Imbalancen mittels Array-Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)
- 2.) Kartierung des Bruchpunktes in 1p mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)
- 3.) Kartierung des Bruchpunktes in 14q mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)
- 4.) Genaue Lokalisation der Bruchpunkte in 1p und 14q mittels Long-Distance-Polymerase-Kettenreaktion (LD-PCR) und anschließender Sequenzierung
- 5.) Identifizierung von Kandidatengenen in 1p und 14q, die an der Entstehung eines De Morsier Syndroms beteiligt sein könnten
- 6.) Hochauflösende Identifizierung submikroskopischer Imbalancen im Bruchpunktbereich mittels einer GeneChip® Mapping-Array-Analyse

2. Material und Methoden

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Materialien und Methoden werden im Folgenden beschrieben. Dabei werden im Labor allgemein übliche Methoden, Reagenzien und Geräte nicht separat beschrieben.

2.1 Untersuchungsmaterial

Die klinischen Untersuchungen des Patienten einschließlich MRT, endokrine Stimulationstests, EEG (Elektroenzephalogramm), Röntgen, EKG (Elektrokardiogramm), Echokardiographie und Sonographie der Schilddrüse wurden im Alter von acht Jahren im Rahmen einer umfassenden Diagnostik in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt. Die MRT-Bilder wurden freundlicherweise von Herrn Dr. med. K. Alfke (Institut für Neuroradiologie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) für diese Arbeit zur Verfügung gestellt. Das MRT des Gehirns, das ausschlaggebend für die Diagnosestellung war, wurde im Alter von einem Jahr in der radiologischen Gemeinschaftspraxis Prüner Gang in Kiel angefertigt.

Im Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) wurden die Karyogramme des Patienten und seiner Eltern mittels der üblichen Standardmethoden erstellt.

Zur Eingrenzung der Bruchpunkte der Translokation $t(1;14)$ mittels FISH wurde eine Zellsuspension aus dem peripheren Blut des Patienten in Carnoy's Fixativ (Methanol:Eisessig; 3:1) verwendet, die im Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) nach Standardmethoden angefertigt wurde. Zu Kontrollzwecken dienten fixierte Zellen aus dem peripheren Blut freiwilliger gesunder Probanden, die ebenfalls in Carnoy's Fixativ vorlagen.

Die DNA des Patienten zur Durchführung der Array-Untersuchungen und der LD-PCRs wurde freundlicherweise von PD Dr. med. R. Santer (Klinik für Allgemeine Pädiatrie, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) zur Verfügung gestellt. Als Kontrollen wurde die DNA von freiwilligen gesunden Probanden verwendet.

Die Einwilligung des Patienten und seiner Eltern zur Suche nach einer möglichen Ursache des Auftretens des De Morsier Syndroms bei dem Patienten lag bei Beginn der genetischen Untersuchungen vor.

2.2 Materialien

2.2.1 Chemikalien

Die Chemikalien, die allgemein gebräuchlich sind, sind nicht im Einzelnen aufgeführt.

- Agarose (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- Borsäure (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Bromphenolblau (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- Carbenicillin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Chloramphenicol (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Coli Rollers Plating Beads (Novagen, Darmstadt, Deutschland)
- Cot-1 (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- DABCO (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- DAPI (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Desoxynukleotide (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland)
- Dextransulfat (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- dNTP-Mix (2,5 mM) (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan)
- dUTP spectrum green (1 mM) (Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland)
- dUTP spectrum orange (1 mM) (Vysis Abbott, Wiesbaden, Deutschland)
- EDTA (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Eisessig (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Ethidiumbromid (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Fixogum-Kleber (Rubber cement Fixogum) (Marabu, Tamm, Deutschland)
- Formamid, deionisiert (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Glycerin (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Goldstar DNA Polymerase System (Eurogentec, Seraing, Belgien)
- Hyperladder I, DNA-Standard (Bioline, Lukenwalde, Deutschland)
- Igepal (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Kaliumchloridlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- 10x LA PCR Buffer II (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan)
- LB BROTH BASE (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- Methanol (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- Magnesiumchloridlösung (25 mM) (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan)
- Natriumacetatlösung (Merck, Darmstadt, Deutschland)

- NaCl (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Na₃Citrat (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- NaOH (5N) (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Paraformaldehyd (Serva, Heidelberg, Deutschland)
- PCR Reaktionspuffer (10x) (TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan)
- Pepsin (Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland)
- Salzsäurelösung (HCL, 2N) (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- TaKaRa LA Taq DNA-Polymerase (5 U/μl) (TaKaRa Bio Inc., Otsu Shiga, Japan)
- Tris(hydroxymethyl)-aminomethan (Merck, Darmstadt, Deutschland)
- X-Gal (Roth, Karlsruhe, Deutschland)

2.2.2 Geräte

Allgemein im Labor gebräuchliche Geräte, wie z.B. Pipetten, sind nicht gesondert aufgeführt.

- Brutschrank (Heraeus, Hanau, Deutschland)
- Feinwaage: MC1 Laboratory LC620P (Sartorius, Göttingen, Deutschland)
- Filtersätze für das Fluoreszenzmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Fluoreszenzmikroskop: Axioskop 2 (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Geldokumentationssystem BioDoc Analyzer (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Gelkammer: 41-2026 (PEQLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland)
- GenePix® 4000B Microarray Reader (Molecular Devices Corporation, Union City, USA)
- Inkubatorschüttler für Zellkulturen (Edmund Bühler, Hechingen, Deutschland)
- Kapillar-Sequenzierer: Genetic Analyzer ABI PRISM 310 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- Lichtmikroskop (Zeiss, Oberkochen, Deutschland)
- Mikrowelle: M500 (Phillips, Hamburg, Deutschland)
- Minizentrifuge: PicoFuge (Stratagene, Cedar Creek, Texas, USA)
- PCR-Gerät: Triothermoblock (Biometra, Göttingen, Deutschland)
- Spektrophotometer: NanoDrop ND-1000 (PEQLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland)
- Vortexer REAXX2000 (Heidolph, Schwabach, Deutschland)
- Wasserbad (Labortechnik Köttermann, Hänigsen, Deutschland)
- Zentrifugen:
 - Biofuge 22 R (Heraeus, Hanau, Deutschland)
 - Eppendorf Zentrifuge 545C (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)

- Mikro 200 (Hettich-Zentrifugen, Tuttlingen, Deutschland)
- Sorvall Super T 21 (GMI, Ramsey, USA)

2.2.3 Puffer und Lösungen

1% Agarosegel:

2 g Agarose wurden in 200 ml 1x TBE-Puffer durch Kochen in einer Mikrowelle gelöst. Dann wurde die Lösung durch kaltes Wasser von außen heruntergekühlt. Nach dem Abkühlen wurden 10 µl Ethidiumbromid (10 mg/ml) hinzupipettiert. Die noch flüssige Lösung wurde zum Erstarren in einen Gelträger mit einem in einer dafür vorgesehenen Halterung eingebrachten Kamm gegeben. Der Kamm wurde anschließend aus dem Gel wieder entfernt. An der betreffenden Stelle bildeten sich während des Erstarrens des Gels Taschen, die später bei der Durchführung der Agarosegelelektrophorese mit dem LD-PCR-Produkt befüllt werden konnten.

Antifade:

230 mg DABCO, 800 ml Aqua dest. und 200 µl Tris-HCl (1 M, pH 8,0) wurden in 9 ml Glycerin gelöst.

Auftragspuffer:

0,125 g Bromphenolblau und 28,7 g Glycerin wurden mit Aqua dest. auf ein Volumen von 100 ml aufgefüllt.

Carnoy`s Fixativ:

Methanol wurde mit Eisessig im Verhältnis 3:1 gemischt.

DAPI-Lösung:

6 µl DAPI Konzentrat (0,2 mg/ml DAPI in Aqua dest.) wurden in 60 ml 2x SSC gegeben und dann bei 4°C lichtgeschützt gelagert.

0,5 M EDTA-Puffer pH 8,0:

186,1 g Na₂EDTA·H₂O wurden in 700 ml Aqua dest. gelöst und der pH mit 10 M NaOH auf 8,0 eingestellt. Dann wurde mit Aqua dest. auf 1 l aufgefüllt.

LB-Medium:

20 g LB BROTH BASE wurden in 1 l Aqua dest. gelöst und anschließend autoklaviert. Daraufhin wurde Chloramphenicol dazu pipetiert (Endkonzentration 20 µg/ml).

LB-Platten (zum Anzüchten der E-coli bei der Klonierung):

10 g LB BROTH BASE und 15 g Agarose wurden in 500 ml Aqua dest. gelöst und anschließend autoklaviert. Hinzugefügt wurden 1,25 ml X-Gal-Stammlösung (4%) und 500 µl Carbenicillin (50 mg/l).

Mastermix-Lösung für FISH-Sonden:

2,5 ml deionisiertes Formamid, 1,25 ml erwärmtes Dextransulfat (40%) und 0,5 ml 20x SSC wurden mit 5N NaOH auf pH 7,5 eingestellt und mit 1x SSC auf 4,5 ml aufgefüllt.

10x dNTP-Mix zur Markierung mit spectrum green (sgr) oder spectrum orange (so):

2,5 µl dATP (10 mM), 2,5 µl dCTP (10 mM), 2,5 µl dGTP (10 mM), 1,25 µl dTTP (10 mM) und

1,25 µl dUTP-SG oder 1,25 µl dUTP-SO wurden mit 3,75 µl Aqua dest. versetzt.

Paraformaldehydlösung 1%:

1 g Paraformaldehyd und 1 ml MgCl₂ wurden in 99 ml PBS gelöst, leicht erwärmt und auf pH 7,5 eingestellt.

20x SSC:

175,3 g NaCl und 88,2 g Na₃Citrat wurden in 1 l Aqua dest. gelöst und mit HCL auf pH 7,0 eingestellt.

SSC-Lösung I (Waschlösung I):

2 ml 20x SSC-Lösung und 300 µl Igepal Detergenz wurden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

SSC-Lösung II (Waschlösung II):

10 ml 20x SSC-Lösung und 100 µl Igepal Detergenz wurden mit Aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt.

10x TBE (Tris-Borat-EDTA)-Puffer:

108 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan, 55 g Borsäure und 40 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0) wurden in 1 l Aqua dest. gelöst.

Verdaulösung:

7,5 mg Pepsin (aus der -20°C-Kühltruhe) wurden in 150 ml Aqua dest. gegeben und dann durch Zugabe von 750 µl Salzsäurelösung aktiviert.

2.2.4 Kits

- Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- Bioprime DNA-Labeling System (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)
- 244K Array (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- Microcon Säulen Ultracel YM-30 (Millipore Corporation, Schwalbach, Deutschland)
- NucleoSpin Extract II (Macherey-Nagel, Düren, Deutschland)
- Perfectprep Plasmid Maxi (Eppendorf, Hamburg, Deutschland)
- TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland)

2.2.5 Software und Online-Datenbanken

- CGH Analytics Software v3.4.27 (Agilent Technologies, Santa Clara, USA)
- GeneScan Analysis Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- ISIS 3.0 Software (MetaSystems, Altusheim, Deutschland)
- NanoDrop Software, Version 3.2.1 (peqLab Biotechnologie, Erlangen, Deutschland)
- Sequencing Analysis 5.2 Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- Sequence Scanner v1.0 Software (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland)
- Human Genome Browser Gateway:
 - <http://genome.ucsc.edu/>
 - <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>
 - <http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>

2.2.6 BAC- und Fosmid-Sonden

Für die FISH-Untersuchungen wurden E. coli Bakterienklone ausgewählt, die BAC- (=Bacterial Artificial Chromosome) und Fosmid-DNA von entsprechenden Bereichen der humanen Chromosomen 1 und 14 enthalten.

Da anhand des Karyogramms zunächst vermutet wurde, dass die Bruchpunkte im Bereich von 1p31 und 14q13 liegen, wurden zahlreiche BACs ausgewählt, die den Bereich des jeweiligen Bruchpunktes weiträumig überspannen. BACs sind künstliche Bakterienchromosomen, die große Fragmente von Fremd-DNA in Vektoren (bis zu 300 kb groß) enthalten. Sie wurden bei der Firma Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland) bestellt. Die initialen Untersuchungen mit den BAC-Sonden waren bereits zuvor von Herrn Dr. med. S. Gesk im

Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt worden.

Im Anschluss wurden anhand dieser Ergebnisse E. coli Bakterienklone beim Wellcome Trust Sanger Institute (Cambridge, England) bestellt, die Fosmide enthalten. Fosmide enthalten ebenfalls Fragmente von Fremd-DNA. Sie sind allerdings mit einer Größe von ca. 40 kb kleiner. Deshalb erlauben Fosmid-Sonden eine noch genauere Eingrenzung der Bruchpunkte der Translokation t(1;14). Sowohl die BAC- als auch die Fosmid-DNA wurden mit Hilfe der Datenbank des Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/>) ausgewählt. Zudem wurde diese Datenbank zur Erstellung von genomischen Karten genutzt. Die für die Kartierung der Bruchpunkte der Translokation t(1;14) ausgewählten BAC- und Fosmid-Sonden sind in den Tabellen 3, 4, 5 und 6 dargestellt.

Tabelle 3: Ausgewählte BAC-Klone auf Chromosom 1:

| Klon: | Lage: | Start (bp): | Ende (bp): | Länge (bp): |
|--------------|-------------|---------------------|-----------------------|-------------|
| | | (telomerisch in 1p) | (centromerisch in 1p) | |
| RP11-282K16 | 1p34.2 | 43064056 | 43257822 | 193767 |
| RP11-441P20 | 1p34.2 | 43164305 | 43351529 | 187225 |
| RP11-638A18 | 1p34.1 | 45496158 | 45637622 | 141465 |
| RP11-97B12 | 1p33 | 46587721 | 46762853 | 175133 |
| RP4-732G19 | 1p33 | 46637268 | 46720339 | 83072 |
| RP11-159M22 | 1p33 | 46743093 | 46901681 | 158589 |
| RP11-705G19 | 1p33 | 46832821 | 46981979 | 149159 |
| RP11-624P10 | 1p33 | 46908472 | 47080871 | 172400 |
| RP11-742I1 | 1p33 | 46952180 | 47134220 | 182041 |
| RP11-707K1 | 1p33 | 47284314 | 47458783 | 174470 |
| RP11-359D19 | 1p33 | 47001485 | 47202220 | 200736 |
| RP11-721P2 | 1p33 | 47179586 | 47334998 | 155413 |
| RP11-260M10 | 1p33 | 47179618 | 47335003 | 155386 |
| RP4-666O22 | 1p33 | 47281830 | 47397657 | 115828 |
| RP11-835I9 | 1p33 | 47378305 | 47578300 | 199996 |
| RP11-45M2 | 1p33 | 47469019 | 47636545 | 167527 |
| RP11-687J22 | 1p33 | 48312573 | 48494692 | 182120 |
| RP11-1053C4 | 1p33 | 49705738 | 49879690 | 173953 |
| RP11-469J2 | 1p32.3 | 51095882 | 51288331 | 192450 |
| RP11-928B15 | 1p32.3 | 52907002 | 53094269 | 187268 |
| RP11-1058E15 | 1p32.3 | 54726054 | 54930665 | 204612 |
| RP11-451P17 | 1p32.2 | 55660452 | 55845574 | 185123 |
| RP11-635N20 | 1p32.2 | 57090171 | 57298081 | 207911 |
| RP11-153D17 | 1p32.1 | 59053008 | 59219089 | 166082 |
| RP11-110A23 | 1p31.3 | 60742735 | 60914694 | 171960 |
| RP11-5P4 | 1p31.3—32.3 | 62820155 | 62937994 | 117840 |
| RP11-75N16 | 1p31.3 | 64648075 | 64827192 | 179118 |
| RP11-262K24 | 1p31.1 | 75688879 | 75832667 | 143789 |

Erstellt mit der Datenbank des Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) (Version: Juli 2003)

Tabelle 4: Ausgewählte BAC-Klone auf Chromosom 14:

| Klon: | Lage: | Start (bp): | Ende (bp): | Länge (bp): |
|--------------|-----------------|------------------------|----------------------|-------------|
| | | (centromerisch in 14q) | (telomerisch in 14q) | |
| RP11-298I3 | 14q11.2 | 21355542 | 21547486 | 191945 |
| RP11-124D2 | 14q11.2 | 21677322 | 21873510 | 196189 |
| RP11-624L16 | 14q11.2-14q12 | 23153249 | 23319585 | 166337 |
| RP11-481O8 | 14q12 | 25107594 | 25303332 | 195739 |
| RP11-109D12 | 14q12 | 25115618 | 25265766 | 150149 |
| RP11-598P6 | 14q12 | 27112607 | 27275860 | 163254 |
| RP11-916C12 | 14q12 | 29158084 | 29327246 | 169163 |
| RP11-54H22 | 14q12 | 31055611 | 31204262 | 148652 |
| CTD-2589F17 | 14q13.1 | 31489412 | 31690833 | 201422 |
| RP11-831F6 | 14q13.2 | 33409626 | 33609700 | 200075 |
| RP11-796F21 | 14q13.3 | 35567525 | 35776910 | 209386 |
| RP11-982C23 | 14q21.1 | 37326535 | 37538410 | 211876 |
| RP11-793G2 | 14q21.2 | 39570122 | 39762454 | 192333 |
| RP11-663B9 | 14q21.2 | 42332291 | 42500252 | 167962 |
| RP11-591J11 | 14q21.2 | 44868184 | 45061040 | 192857 |
| RP11-626I4 | 14q21.2 | 46976746 | 47168838 | 192093 |
| RP11-55L16 | 14q22.1 | 49347217 | 49529093 | 181877 |
| CTD-2528J3 | 14q22.2 | 51501035 | 51726657 | 225623 |
| RP11-1107N7 | 14q22.2 | 52995203 | 53202822 | 207620 |
| RP11-956K16 | 14q22.3 | 54967366 | 55165322 | 197957 |
| RP11-571J17 | 14q23.1 | 56365935 | 56584415 | 218481 |
| CTD-2515K17 | 14q23.1 | 56789825 | 57009337 | 219513 |
| RP11-625K13 | 14q23.1 | 57337177 | 57525202 | 188026 |
| RP11-160G14 | 14q23.1 | 58353440 | 58534444 | 181005 |
| RP11-160J3 | 14q23.1 | 59227181 | 59411025 | 183845 |
| RP11-338P24 | 14q23.2 | 60185474 | 60382523 | 197050 |
| RP11-338H24 | 14q23.2 | 61110130 | 61296514 | 186385 |
| RP11-815A13 | 14q23.2 | 62125554 | 62300138 | 174585 |
| RP11-150D10 | 14q23.3 | 63101944 | 63265557 | 163614 |
| RP11-461C6 | 14q23.3 | 64026091 | 64199331 | 173241 |
| RP11-118I12 | 14q23.3 | 64939598 | 65112742 | 173145 |
| RP11-1058L7 | 14q24.1 | 66046935 | 66245870 | 198936 |
| RP11-179B8 | 14q24.1 | 67145088 | 67326066 | 180979 |
| RP11-1113M10 | 14q24.1-14q24.2 | 68153623 | 68333333 | 179711 |
| RP11-300A24 | 14q24.2 | 68310681 | 68501442 | 190762 |
| RP11-50K16 | 14q24.2 | 68361117 | 68534548 | 173432 |
| RP11-58M1 | 14q24.2 | 68406266 | 68586901 | 180636 |
| RP11-195B2 | 14q24.2 | 68412594 | 68583087 | 170494 |
| RP11-910L1 | 14q24.2 | 68491978 | 68695002 | 203025 |
| RP11-448I1 | 14q24.2 | 68679143 | 68851909 | 172767 |
| RP11-696D21 | 14q24.2 | 68836509 | 68992203 | 155695 |
| RP11-732I23 | 14q24.2 | 68888599 | 69066615 | 178017 |
| RP11-892B8 | 14q24.2 | 69039972 | 69229781 | 189810 |
| RP11-611E14 | 14q24.2 | 69975821 | 70150773 | 174953 |
| RP11-289P13 | 14q24.2 | 71005732 | 71181857 | 176126 |
| RP11-606A3 | 14q24.3 | 72058598 | 72232765 | 174168 |
| RP11-379H10 | 14q24.3 | 72997135 | 73217306 | 220172 |
| RP11-714F24 | 14q24.3 | 73998268 | 74195691 | 197424 |
| RP11-99E15 | 14q24.3 | 75056026 | 75242226 | 186201 |
| RP11-715K20 | 14q24.3 | 75976593 | 76216297 | 239705 |

Erstellt mit der Datenbank des Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>)
(Version: Juli 2003)

Tabelle 5: Ausgewählte Fosmid-Klone auf Chromosom 1:

| Klon: | Sondenname: | Start (bp): | Ende (bp): | Länge (bp): |
|---------------|-------------|---------------------|-----------------------|-------------|
| | | (telomerisch in 1p) | (centromerisch in 1p) | |
| G248P89661D9 | WI2-3914H17 | 47205109 | 47246395 | 41287 |
| G248P82646B10 | WI2-2353C20 | 47235241 | 47271382 | 36142 |
| G248P87982F8 | WI2-1697K16 | 47275417 | 47316023 | 40607 |
| G248P88003C11 | WI2-1691F22 | 47286979 | 47326573 | 39595 |
| G248P80480H4 | WI2-592O7 | 47315865 | 47352225 | 36361 |
| G248P89042C12 | WI2-2655E24 | 47328510 | 47371561 | 43052 |
| G248P8871D3 | WI2-759H6 | 47338473 | 47377507 | 39035 |
| G248P80025H2 | WI2-680P3 | 47348830 | 47391497 | 42668 |
| G248P86154H3 | WI2-2110O6 | 47384942 | 47423755 | 38814 |

Erstellt mit der Datenbank des Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) (Version: Mai 2004)

Tabelle 6: Ausgewählte Fosmid-Klone auf Chromosom 14:

| Klon: | Sondenname: | Start (bp): | Ende (bp): | Länge (bp): |
|---------------|-------------|------------------------|----------------------|-------------|
| | | (centromerisch in 14q) | (telomerisch in 14q) | |
| G248P85542G1 | WI2-1862M2 | 69423286 | 69463674 | 40389 |
| G248P82315H6 | WI2-1672P12 | 69462373 | 69499929 | 37557 |
| G248P81868A8 | WI2-1035A15 | 69496511 | 69535160 | 38650 |
| G248P88739F4 | WI2-3231L8 | 69513355 | 69556547 | 43193 |
| G248P88858E6 | WI2-2774I12 | 69529963 | 69570374 | 40412 |
| G248P87046B10 | WI2-2163C20 | 69558919 | 69602078 | 43160 |
| G248P80950D8 | WI2-746G16 | 69568982 | 69609245 | 40264 |
| G248P82393D7 | WI2-1019H13 | 69595923 | 69638728 | 42806 |
| G248P87210D4 | WI2-2214G8 | 69633872 | 69676623 | 42752 |

Erstellt mit der Datenbank des Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>) (Version: Mai 2004)

2.2.7 Primer

Die Primer für die LD-PCRs wurden bei biomers.net (Ulm, Deutschland) bestellt. Die Auswahl erfolgte anhand der Eingrenzung der Bruchpunkte durch die FISH-Untersuchungen, wobei die Primer jeweils ca. 2000 bp voneinander entfernt liegen. Die Primer wurden mit der im Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) üblichen fortlaufenden Nummer versehen und mit Aqua dest. auf eine Konzentration von 200 pmol/μl verdünnt. In Tabelle 7 sind die für die LD-PCRs verwendeten Primer sowie die vektor-spezifischen Primer 461 und 462 aufgelistet, die für die Sequenzierung der klonierten LD-PCR-Produkte verwendet wurden.

Tabelle 7: Ausgewählte Primer auf Chromosom 1 und Chromosom 14:

| Nummer: | Name: | Lokalisation: | Primer-Sequenz: |
|---------|------------|------------------|---------------------------------|
| 4488 | C14_26653r | 14q24.2 | 5`-gctctaggggcagaactcct-3` |
| 4489 | C14_22197r | 14q24.2 | 5`-actccagcttccttggtt-3` |
| 4490 | C14_18235r | 14q24.2 | 5`-cctcttccaagggaact-3` |
| 4491 | C14_14035r | 14q24.2 | 5`-tcactgcagatgaggaatgg-3` |
| 4492 | C14_10165r | 14q24.2 | 5`-cttggtgaggggttcata-3` |
| 4493 | C14_6143r | 14q24.2 | 5`-taatggtggcctgaagaag-3` |
| 4494 | C14_2229r | 14q24.2 | 5`-acaggaccaccgaccagtag-3` |
| 4495 | C1_15167r | 1p33 | 5`-cactcttctctggccttg-3` |
| 4496 | C1_13115r | 1p33 | 5`-gggcagatggccatttta-3` |
| 4497 | C1_11160r | 1p33 | 5`-tctctgccaggtttggaat-3` |
| 4498 | C1_9064r | 1p33 | 5`-tgtgttttcagctcatca-3` |
| 4499 | C1_7028r | 1p33 | 5`-ggccccatggaattgtgat-3` |
| 4500 | C1_5111r | 1p33 | 5`-cagcctgggtattcggtta-3` |
| 4501 | C1_3045r | 1p33 | 5`-attgtttcccgatgcagttc-3` |
| 4502 | C1_1185 | 1p33 | 5`-tgtcattgggcaagacagaa-3` |
| 4741 | C14_24942r | 14q24.2 | 5`-ccttctctgaccacctgt-3` |
| 4742 | C14_20238r | 14q24.2 | 5`-aacaagctgccaagagcaat-3` |
| 4743 | C14_16261r | 14q24.2 | 5`-tcccaggtgagagtgagagg-3` |
| 4744 | C14_12331r | 14q24.2 | 5`-accacgctctgtctcctaa-3` |
| 4745 | C14_8107r | 14q24.2 | 5`-agggggtgattcaaaagaca-3` |
| 4746 | C14_4273r | 14q24.2 | 5`-atgtgtggtgagggaaagg-3` |
| 461 | M13 F | vektorspezifisch | 5`-gaattgtaatacgaactcactatag-3` |
| 462 | M13 R | vektorspezifisch | 5`-ttcacacaggaacagctatgacc-3` |

C1= Chromosom 1; C14= Chromosom 14; r= Rückwärtsprimer

2.3 Methoden

Es wurde eine Array-CGH durchgeführt, um eventuell vorhandene genomische Imbalancen als Ursache für das bestehende De Morsier Syndrom bei einem Patienten mit einer *de novo* Translokation t(1;14) ausschließen zu können. Zudem wurden zahlreiche FISH-Untersuchungen durchgeführt, um die Bruchpunkte dieser Translokation t(1;14) zu kartieren. Danach wurden LD-PCRs durchgeführt, die die eingegrenzten Bruchpunkte überspannen sollten. Dann wurden anhand der Ergebnisse der FISH-Untersuchungen mögliche Kandidatengene für die Entstehung eines De Morsier Syndroms identifiziert. Nach Abschluss

dieser Untersuchungen wurde im Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) eine hochauflösende genomweite Microarray-Analyse mit dem Genome-Wide Human SNP 6.0 Array (Affymetrix) durchgeführt, um submikroskopische genomische Imbalancen im Bruchpunktbereich zu detektieren.

2.3.1 Array-Comparative Genomic Hybridization (Array-CGH)

Um eventuell vorhandene submikroskopische Imbalancen auszuschließen, die konventionell-zytogenetisch nicht nachweisbar sind, wurde eine hochauflösende vergleichende genomische Analyse (Array-CGH) durchgeführt.

Bei der Array-CGH handelt es sich um eine gesamtgenomische Hybridisierung von unterschiedlich fluoreszenzmarkierter Patienten- und Referenz-DNA. Diese Technik ermöglicht es, in einem einzigen Experiment eine vergleichende Analyse des kompletten Patientengenoms in Bezug auf mögliche vorliegende Imbalancen durchzuführen. Balancierte chromosomale Veränderungen wie Inversionen und balancierte Translokationen können dagegen nicht erkannt werden (Tönnies, 2002).

Verwendet werden Glasobjektträger (Arrays), auf deren Oberfläche definierte Oligonukleotide gespottet vorliegen, die das gesamte euchromatische humane Genom in gleichmäßigen Abständen repräsentieren. Die Patienten- und die Referenz-DNA werden vor der Hybridisierung mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert und auf die Oberfläche des Arrays unter Suppressionsbedingungen cohybridisiert. Die Hybridisierung an die Target-Oligonukleotide erfolgt kompetitiv, d.h. die markierten DNA-Fragmente binden in Abhängigkeit von ihrem Vorhandensein im DNA-Pool an die vorhandenen Bindungsstellen. Im Falle des Verlustes eines kleinen euchromatischen Bereichs in der Patienten-DNA (Deletion) binden somit weniger Patienten-DNA-Fragmente an die Bindungsstellen als dies bei der Referenz-DNA der Fall ist. Hierbei kommt es zu einer Verschiebung des Farbverhältnisses beider fluoreszenzmarkierter DNAs. Unter Verwendung einer geeigneten Computersoftware wird diese Abweichung ermittelt und dokumentiert.

2.3.1.1 Durchführung der Array-CGH

Die Array-CGH-Analyse wurde mit Unterstützung von Frau Dr. med. A. Caliebe und Herrn Dr. rer. nat. H. Tönnies am Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt.

Es wurde ein 244K Array (Agilent Technologies, Santa Clara, USA) verwendet. Dieser enthält 238.381 60-mer Oligonukleotide. Es wurden 1 µg extrahierte DNA des Patienten und 1 µg Referenz-DNA eingesetzt. Bei der Referenz-DNA handelt es sich um gepoolte DNA von

zehn männlichen Probanden mit normalem Karyotyp. Die Markierung der Patienten- und der Referenz-DNA erfolgte nach Anleitung des Herstellers. Entsprechend der Protokolle wurden Patienten und Referenz-DNA auf dem Array für zwei Tage cohybridisiert.

Anschließend wurden die Hybridisierungssignale mit dem GenePix® 4000B Microarray Reader (Molecular Devices Corporation, Union City, USA) bei einer Auflösung von 5 µm/Pixel eingescannt.

2.3.1.2 Auswertung der Array-CGH

Im Anschluss wurden die Signalintensitäten der erhaltenen Bilder mit Hilfe einer speziellen Software gemessen und ausgewertet (CGH Analytics v3.4.27, Agilent Technologies, Santa Clara, USA). Regionen, die von der Software als statistisch signifikant erfasst wurden, lagen außerhalb einer festgelegten Log₂ Ratio von |0,5|. Enthielten diese Regionen mehr als 10 veränderte Marker (Oligonukleotide), wurden sie als aberrant gewertet. Dies entspricht einer Auflösung von etwa 100 kb. Bei der Auswertung wurden die pathologischen Regionen von sogenannten CNVs (Copy Number Variations) abgegrenzt. Dabei handelt es sich um polymorphe Kopienzahlvarianten ohne bekannte klinische Bedeutung, die bei phänotypisch gesunden Menschen in unterschiedlicher Anzahl vorhanden sind. Die Unterscheidung von CNVs und pathologischen aberranten Regionen erfolgte mittels einer in der Software integrierten Datenbank. Als signifikant aberrant bewertete Regionen wurden mit Hilfe des Human Genome Browsers (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>, Version: März 2006) mit der entsprechenden Sequenz des humanen Genoms verglichen und überprüft.

2.3.2 Eingrenzung der Bruchpunkte mittels Fluoreszenz in situ Hybridisierung (FISH)

Um die Bruchpunkte der Translokation t(1;14) einzugrenzen, wurden Meta- und Interphasezellen aus dem peripheren Blut des Patienten mittels FISH untersucht.

Bei dieser Technik verwendet man fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden. Diese binden nach dem Prinzip der komplementären Basenpaarung an die DNA von Inter- oder Metaphasezellen, die vorher auf einen Objektträger aufgetropft und dann einem Verdau unterzogen werden. Zunächst werden die Sonden und die Ziel-DNA, an die sich die Sonden später anlagern sollen, durch Denaturierung in Einzelstränge aufgespalten. Gibt es in der Ziel-DNA eine komplementäre Sequenz zu einer Sonde, dann kann diese sich während der nun folgenden Renaturierung dort anlagern und erzeugt ein Hybridisierungssignal, das sich unter einem Fluoreszenzmikroskop auswerten lässt. Durch Waschen lassen sich unspezifische Anlagerungen und überflüssige Sonden vor der Auswertung entfernen.

2.3.2.1 Präparation von BAC- und Fosmid-DNA

Die ausgewählten BAC- und Fosmid-DNA enthaltenden E. coli Bakterienklone wurden als Glycerinstock (500 µl Glycerin auf 500 µl Bakterienkultur) bei -80°C aufbewahrt. Zur Kultivierung wurden 100 µl Glycerinstock in 250 ml LB-Nährmedium mit Chloramphenicol über Nacht bei 37°C in einem Inkubatorschüttler für Zellkulturen kultiviert und geschüttelt. Am nächsten Tag erfolgte die Isolierung der DNA mit dem Perfectprep Plasmid Maxi Kit (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) nach Anleitung des Herstellers. Durch vorsichtiges Pipettieren und Schütteln wurde die isolierte und aufgereinigte DNA in 250 µl Aqua dest. gelöst.

Um die Konzentration der isolierten DNA zu messen, wurde ein Spectrophotometer eingesetzt (NanoDrop ND-1000 Spektrophotometer, PEQLab). Mit diesem Gerät ist eine Analyse des gesamten Spektrums von UV- bis zum sichtbaren Licht möglich. Neben der Messung der Absorption von DNA ist es auch möglich die Absorption von RNA, Proteinen, Färbungen und die optische Dichte von Kulturansätzen zu messen. Das Gerät besteht aus einer unteren Messapparatur und einem beweglichen oberen Gerätearm. Vor der Messung wurde ein Nullabgleich mit 1 µl Aqua dest. durchgeführt. Bei der Messung der DNA-Konzentration wurde 1 µl der DNA-Lösung auf den unteren Teil der Messapparatur pipettiert. Der bewegliche Gerätearm wurde darauf abgelegt. Mit Hilfe der NanoDrop Software (Version 3.2.1) wurde die Messung gestartet. Die Werte konnten im Anschluss mit Hilfe der Software direkt abgelesen werden. Die optische Dichte der DNA-Lösungen wurde bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen. Zusätzlich ermittelt die Software die Absorptionswerte bei 280 nm und errechnet das Verhältnis dieser beiden Absorptionswerte, da dieses Aufschluss über die Reinheit der Probe gibt. Dabei sollte das Verhältnis einen Wert von etwa 1,8 haben.

2.3.2.2 Markierung und Aufreinigung der DNA-Proben für FISH

Um die isolierte DNA mit spectrum green oder spectrum orange zu markieren, wurde das Kit Bioprime DNA-Labeling System der Firma Invitrogen verwendet.

Hierbei wurde 1 µg der isolierten DNA mit Aqua dest. auf ein Volumen von 24 µl verdünnt. Dann wurden 20 µl 2,5x Random Primer hinzugegeben und der Ansatz wurde für 5 min im kochenden Wasserbad denaturiert und im Anschluss sofort auf Eis heruntergekühlt. Daraufhin wurden 5 µl dNTP-Lösung mit spectrum green oder spectrum orange dazugegeben. Nach diesem Schritt sollte das Gemisch möglichst im Dunkeln aufbewahrt werden, um ein Ausleuchten der Sonden zu verhindern. Alles wurde mit der Pipette vorsichtig durchgemischt. Dann wurde 1 µl Klenow Fragment eingespült, das zuvor auf Eis

aufbewahrt wurde. Nach kurzem Anzentrifugieren wurde das Gemisch bei 37°C über Nacht im Brutschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden 5 µl Stop-Puffer dazugegeben.

Der folgende Schritt diente zur Entfernung aller Verunreinigungen. Dazu wurden Microcon Centrifugal Filter Devices genutzt. Zunächst wurde die Säule, die in einem Auffangröhrchen mit Deckel platziert worden war, mit der Sonde und 300 µl Aqua dest. befüllt. Der Deckel des Auffangröhrchens verschloss nun die Säule und es wurde 10 min bei 14.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Vorgang noch einmal so wiederholt. Dann wurde die Säule mit 50 µl Aqua dest. befüllt und umgedreht in einem frischen Auffangröhrchen ohne Deckel 5 min bei 5000 U/min zentrifugiert. Die so markierten Sonden konnten nun im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

2.3.2.3 Präparation der markierten Sonden

Zur Eingrenzung der Kandidatengene auf Chromosom 1 und Chromosom 14 wurden jeweils Gemische aus zwei Sonden hergestellt, von denen eine mit spectrum green (sgr) und die andere mit spectrum orange (so) markiert wurde. Bei der Eingrenzung mit den BAC-Sonden wurden zunächst jeweils zwei Sonden, die entweder auf Chromosom 1 oder 14 lokalisiert sind, miteinander kombiniert. Ebenso konnte auch je eine Sonde von Chromosom 1 mit einer Sonde von Chromosom 14 kombiniert werden. Nach der Eingrenzung der Bruchpunkte der Translokation t(1;14) durch die BAC-Sonden wurde mit den Fosmid-Sonden gleichermaßen verfahren.

Zur Herstellung der Sondengemische wurden je 10 µl der Sonden mit 5 µl Cot-1-DNA versetzt. Hinzugefügt wurden daraufhin 1/10 des Volumens an 3 M NaAc. Im nächsten Schritt wurde das 2,5fache des Volumens an Ethanol (absolut) dazugegeben. Nach dem Mischen wurde 30 min bei 17.000 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit der Pipette entfernt und verworfen und das Pellet im Dunkeln getrocknet. Nach dem Trocknen wurde das Sondengemisch in 10 µl Mastermix-Lösung (50%) gelöst.

2.3.2.4 Herstellung von Auftropfpräparaten aus Zellsuspensionen für FISH

Bei der Herstellung von Auftropfpräparaten wurden zwei bis drei Tropfen der Zellsuspensionen aus dem peripheren Blut des Patienten oder der Kontrollpersonen mit einer Pipette auf Objektträger aufgetropft. Damit später möglichst viele gut sichtbare Metaphasechromosomen ausgewertet werden konnten, wurde aus möglichst großer Höhe aufgetropft. Die Auftropfpräparate wurden getrocknet. Unter dem Lichtmikroskop wurden Bereiche mit besonders vielen Zellen und Metaphasen aufgesucht und auf der Rückseite des Objektträgers mit einem Glasschreiber markiert.

Danach wurden die Zellen einem Verdau unterzogen, der das Zytoplasma entfernt. Die Präparate wurden in eine Küvette gelegt, in die dann die Verdauungslösung gefüllt wurde. Alles wurde bei 37°C im Brutschrank für 5 min inkubiert. Danach wurden die Präparate in einer Küvette mit Aqua dest. gespült und anschließend für 2 min in Paraformaldehyd (1%) zur Fixierung der Zellen inkubiert. Es folgte erneutes Spülen in Aqua dest.. Um die Präparate zu dehydrieren, wurden sie jeweils für 2 min in eine aufsteigende Alkoholreihe (70%, 85% und absolut) gestellt, woraufhin sie an der Luft oder vor dem Ventilator getrocknet wurden.

2.3.2.5 Hybridisierung

Nach Herstellung der Auftropfpräparate wurden diese mit den Sonden hybridisiert. Dazu wurden 1,3 µl des Sondengemisches auf die markierten Bereiche gegeben. Dann wurde ein kleines rundes Deckglas auf diesen Bereichen platziert und alles mit Fixogum-Kleber verschlossen. Die Präparate wurden mit einem feuchten Tuch in einen Metallkasten gelegt, bei 75°C im Wasserbad 7 min lang inkubiert und anschließend über Nacht bei 37°C im Brutschrank gelagert.

2.3.2.6 Waschen und Färben der Präparate

Am folgenden Tag wurden die überflüssigen oder unspezifisch gebundenen Sonden durch einen Waschvorgang entfernt. Dazu wurden die Waschlösungen I und II (s. 2.2.3) hergestellt und in Küvetten gefüllt. Die Waschlösung I wurde auf 71°C im Wasserbad erhitzt und die Waschlösung II bei Raumtemperatur aufbewahrt. Daraufhin wurden der Fixogum-Kleber und die Deckgläser von den Präparaten bei möglichst wenig Licht entfernt. Das Waschen der Präparate erfolgte für 2 min in Lösung I und für 1 min in Lösung II. Danach wurde kurz in 2x SSC gespült. Um die DNA zu färben, wurden die Präparate 5 min in DAPI-Lösung gestellt. Es folgte wiederum ein kurzes Waschen in 2x SSC. Zuletzt wurden die Objektträger in Antifade eingedeckt und lichtgeschützt aufbewahrt.

2.3.2.7 Auswertung und Dokumentation der FISH-Untersuchungen

Zur Auswertung wurde ein Fluoreszenzmikroskop der Firma Zeiss mit verschiedenen Filtern für die einzelnen Fluoreszenzfarbstoffe und Breitbandfiltern für die Kombinationen grün/rot und grün/rot/blau verwendet. Zur Dokumentation diente die ISIS 3.0-Software der Firma MetaSystems.

Zunächst wurde jede Sondenkombination an fixierten Zellen von gesunden Probanden, die in Carnoy's Fixativ vorlagen, getestet. Im Rahmen der Auswertung wurden sowohl die Meta-

als auch die Interphasechromosomen bewertet. Für jede Sondenkombination wurden sowohl bei den Kontrollen als auch bei der Auswertung des t(1;14)-Falles jeweils 100 Interphasen und so viele Metaphasen wie möglich (d.h. alle vorhandenen) ausgewertet.

Bei den Kontrollen sollten die Signale beider Sonden jeweils colokalisiert auf dem entsprechenden Chromosom liegen. Bei den Metaphasen von Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten wurde darauf geachtet, auf welchem Chromosom die Sonden lagen oder ob innerhalb einer Sonde ein Bruch zu erkennen war, sie also teilweise auf dem derivativen Chromosom 1 und teilweise auf dem derivativen Chromosom 14 lag. Dies bedeutet, dass sie den jeweiligen Bruchpunkt überspannt und diesen so eingrenzt. Hybridisierte dagegen z.B. eine Sonde, die eigentlich auf Chromosom 1 lokalisiert sein sollte, komplett auf dem derivativen Chromosom 14, dann hybridisierte sie schon außerhalb des Bruchpunktes. Bei der Auswertung der Interphasen wurde in jeder Zelle neben einer Colokalisation der Signale, die man aufgrund des unveränderten Chromosoms erwartet, auf Signale, die nicht mehr colokalisiert waren, oder auf zusätzliche Signale geachtet. Auch die Größe von zusätzlichen Signalen im Verhältnis zu den Signalen auf dem unveränderten Chromosom ging in die Auswertung ein.

2.3.3 Long-Distance-Polymerasekettenreaktion (LD-PCR)

Um die Bruchpunkte der Translokation t(1;14) genau lokalisieren zu können, wurden Long-Distance-PCR-Untersuchungen durchgeführt. Eine PCR (Polymerase Chain Reaction) wird zur Amplifizierung von DNA-Abschnitten mit einer spezifischen Sequenz genutzt und besteht aus einem Zyklus mit drei Schritten. Der erste Schritt, bei dem der DNA-Doppelstrang auf ca. 93-95°C erhitzt wird, ist die Denaturierung. Nachdem der DNA-Doppelstrang durch diese in zwei Einzelstränge aufgespalten wurde, kommt es im zweiten Schritt zum Annealing, dem Anlagern der Primer an die komplementäre Sequenz des DNA-Stranges. Primer sind kurze Oligonukleotide, welche die zu amplifizierende DNA-Sequenz flankieren. Die Annealing-Temperatur ist von den jeweiligen Primern abhängig. Der letzte Schritt ist die DNA-Synthese. Die vorher angelagerten Primer dienen als Starter für eine hitzestabile DNA-Polymerase, die aus vorher zugegebenen Desoxynukleotiden bei einer Temperatur von 68-75°C den komplementären DNA-Strang synthetisiert. Durch mehrere Zyklen kann die Ausgangs-DNA auf diese Weise exponentiell vervielfältigt werden.

Da die Bruchpunkte der Translokation t(1;14) nicht bekannt waren, wurde die LD-PCR verwendet, denn durch sie können im Gegensatz zu einer normalen PCR mit einer speziellen Polymerase (hier: TaKaRa LA Taq DNA-Polymerase, TaKaRa Bio Inc., Otsu, Shiga, Japan) besonders lange DNA-Fragmente amplifiziert werden. In diesem Fall wurden aufgrund der Translokation Primer auf Chromosom 1 und Chromosom 14 kombiniert.

2.3.3.1 Durchführung der LD-PCR bei modifizierten Reaktionsbedingungen

Bei der Durchführung der LD-PCRs wurden alle Primer, die an eine Sequenz auf Chromosom 1 hybridisieren, mit allen Primern, die an eine Sequenz auf Chromosom 14 hybridisieren, jeweils einzeln kombiniert und teilweise unter verschiedenen Reaktionsbedingungen getestet. Pipettiert wurde auf Eis. Es wurden pro Primerpaar immer eine Kontrolle mit DNA von gesunden Probanden und eine Negativkontrolle mit Aqua dest. durchgeführt. Waren die DNA-Banden der PCR-Produkte zu schwach, um sie direkt zu sequenzieren, wurde 1 µl einer 1:100 Verdünnung dieses PCR-Produkts mit Aqua dest. in eine zweite PCR eingesetzt. Um die Menge der amplifizierten DNA zu erhöhen, wurde bei dieser PCR daraufhin ebenso verfahren wie bei der Ausgangs-PCR.

Pipettierschema für eine Reaktion:

1 µl DNA des Patienten (100 ng/µl) bzw. 1 µl Kontroll-DNA (100 ng/µl) bzw. 1 µl Aqua dest.
2,5 µl 10x LA PCR Buffer II (TaKaRa Bio Inc.)
2,5 µl Magnesiumchloridlösung (25 mM) (TaKaRa Bio Inc.)
5 µl dNTP-Mix (2,5 mM) (TaKaRa Bio Inc.)
je 1 µl Primer (20 pmol/µl)
0,3 µl TaKaRa La Taq DNA-Polymerase (5 U/µl) (TaKaRa Bio Inc.)
12,7 µl Aqua dest.

2.3.3.2 Kombination der Primer und PCR-Programme

Bei der Durchführung der PCRs wurden die verschiedenen Primerkombinationen bei modifizierten Reaktionsbedingungen (PCR-Programme) getestet. Die verschiedenen PCR-Programme sind in Tabelle 8 und die verwendeten Primerkombinationen in Tabelle 9 aufgelistet.

Tabelle 8: Darstellung der verschiedenen PCR-Programme

| Programm 1: | | |
|--------------------------|----------------|--------------|
| Schritt 1: | 94°C | 2 min |
| Schritt 2: | 94°C | 30 s |
| Schritt 3: | 68°C (-0,5°C) | 30 s |
| Schritt 4: | 72°C | 5 min |
| Schritt 2 bis Schritt 4: | | 16x |
| Schritt 5: | 94°C | 30 s |
| Schritt 6: | 60°C | 30 s |
| Schritt 7: | 72°C | 5 min + 15 s |
| Schritt 5 bis Schritt 7: | | 16x |
| Schritt 8: | 72°C | 10 min |
| Schritt 9: | 4°C | Ende |
| Programm 2: | | |
| Schritt 1: | 94°C | 2 min |
| Schritt 2: | 94°C | 30 s |
| Schritt 3: | 64°C (-0,25°C) | 30 s |
| Schritt 4: | 72°C | 5 min |
| Schritt 2 bis Schritt 4: | | 16x |
| Schritt 5: | 94°C | 30 s |
| Schritt 6: | 60°C | 30 s |
| Schritt 7: | 72°C | 5 min + 15 s |
| Schritt 5 bis Schritt 7: | | 16x |
| Schritt 8: | 72°C | 10 min |
| Schritt 9: | 4°C | Ende |
| Programm 3: | | |
| Schritt 1: | 94°C | 10 min |
| Schritt 2: | 94°C | 30 s |
| Schritt 3: | 68°C (-0,5°C) | 30 s |
| Schritt 4: | 72°C | 5 min |
| Schritt 2 bis Schritt 4: | | 16x |
| Schritt 5: | 94°C | 30 s |
| Schritt 6: | 60°C | 30 s |
| Schritt 7: | 72°C | 5 min + 15 s |
| Schritt 5 bis Schritt 7: | | 16x |
| Schritt 8: | 72°C | 10 min |
| Schritt 9: | 4°C | Ende |
| Programm 4: | | |
| Schritt 1: | 95°C | 10 min |
| Schritt 2: | 95°C | 30 s |
| Schritt 3: | 68°C (-0,5°C) | 30 s |
| Schritt 4: | 72°C | 5 min |
| Schritt 2 bis Schritt 4: | | 16x |
| Schritt 5: | 94°C | 30 s |
| Schritt 6: | 60°C | 30 s |
| Schritt 7: | 72°C | 5 min + 15 s |
| Schritt 5 bis Schritt 7: | | 16x |
| Schritt 8: | 72°C | 10 min |
| Schritt 9: | 4°C | Ende |
| Programm 5: | | |
| Schritt 1: | 94°C | 10 min |
| Schritt 2: | 94°C | 30 s |
| Schritt 3: | 65°C (-0,5°C) | 30 s |
| Schritt 4: | 72°C | 5 min |
| Schritt 2 bis Schritt 4: | | 10x |
| Schritt 5: | 94°C | 30 s |
| Schritt 6: | 60°C | 30 s |
| Schritt 7: | 72°C | 5 min + 15 s |
| Schritt 5 bis Schritt 7: | | 10x |
| Schritt 8: | 72°C | 10 min |
| Schritt 9: | 4°C | Ende |

Material und Methoden

Tabelle 9: Übersicht der verschiedenen Primerkombinationen und Reaktionsbedingungen

| Chr.14 | 4488 | 4741 | 4489 | 4742 | 4490 | 4743 | 4491 | 4744 | 4492 | 4745 | 4493 | 4746 | 4494 |
|--------------------------|--|----------------|---|---|----------------|------------|---|------------|---|--|----------------|--|--|
| Chr.1 | C14_26653r | C14_24942r | C14_22197r | C14_20238r | C14_18253r | C14_16261r | C14_14035r | C14_12331r | C14_10165r | C14_8107r | C14_6143r | C14_4273r | C14_2229r |
| 4495 C1_15167r | Prg.1 Prg.2 2x Prg.3 Prg.5 | Prg.3 | Prg.1 Prg.2 2x Prg.3 Prg.5 | Prg.1 | Prg.1 Prg.2 | Prg.1 | Prg.1 Prg.2 | Prg.1 | Prg.1 Prg.2 | Prg.1 | Prg.1 Prg.2 | Prg.1 | Prg.1 Prg.2 |
| 4496 C1_13115r | Prg.1 | Prg.1 Prg.3 | Prg.1 | 3x Prg.1, nvP >2x PCR aus PCR (Prg.1) | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 >2x PCR aus PCR (Prg.1), nvP | Prg.1 |
| 4497 C1_11160r | 3x Prg.1 Prg.2 5x Prg.3, nvP Prg.4 | Prg.1 Prg.3 | Prg.1 2x Prg.3 >PCR aus PCR (Prg.3) Prg.5 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 Prg.3 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 2x PCR aus PCR, (Prg.1), nvP | Prg.1 | Prg.1 >PCR aus PCR (Prg.1) | Prg.1 |
| 4498 C1_9064r | Prg.1 | Prg.3 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | 2x Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 Prg.3 >PCR aus PCR (Prg.3) |
| 4499 C1_7028r | Prg.1 | Prg.3 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | 3x Prg.1 Prg.2 Prg.3 | Prg.1 | Prg.1 > PCR aus PCR (Prg.1) | Prg.1 |
| 4500 C1_5111r | Prg.1 | Prg.1 Prg.3 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 >2x PCR aus PCR (Prg.1), | Prg.1 |
| 4501 C1_3045r | Prg.1 | Prg.3 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | 2x Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 |
| 4502 C1_1185r | Prg.1 | Prg.3 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | Prg.1 | 3x Prg.1 Prg.2 8x Prg.3, nvP >PCR aus PCR (Prg.3) Prg.5 | Prg.1 | 3x Prg.1 Prg.2 7x Prg.3, nvP Prg.4 Prg.5 | Prg.1 | Prg.1 | 2x Prg.1 >2x PCR aus PCR, nvP | 3x Prg.1 Prg.2 5x Prg.3, nvP Prg.4 |

C1= Chromosom 1 (Chr.1); C14= Chromosom 14 (Chr.14); r= Rückwärtsprimer; Prg.=Programm (die verschiedenen PCR-Programme sind in Tab. 8 dargestellt); nvP= neu verdünnte Primer (bei einigen Reaktionen wurde versucht, eine Verbesserung durch ein neues Ansetzen der Primer-Verdünnung zu erzielen); PCR aus PCR= PCR aus dem jeweils letzten PCR-Produkt, 1:100 verdünnt

2.3.3.3 Analyse der LD-PCR-Produkte mittels Agarosegelelektrophorese

Zur Auftrennung der LD-PCR-Produkte wurde zunächst ein 1%iges Agarosegel hergestellt (s. 2.2.3). Dieses wurde in eine Kammer mit 1x TBE-Puffer gestellt. Jeweils 10 µl des PCR-Produktes und 3,5 µl Auftragspuffer wurden vermischt und auf das Gel aufgetragen. Auch ein DNA-Standard (Hyperladder I, Bionline), der später dazu diente, die Größe der PCR-Produkte zu bestimmen, wurde aufgetragen. Dann erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte mittels Elektrophorese bei ca. 10 V pro 1 cm Gellänge für ungefähr 1 h. Im Anschluss wurden die dabei entstandenen Banden mittels UV-Licht sichtbar gemacht, fotografiert und dokumentiert (Geldokumentationssystem BioDoc Analyzer, Biometra).

2.3.3.4 Ausschneiden und Aufreinigung der LD-PCR-Produkte aus Agarosegelen

Einige PCR-Produkte bestanden aus mehreren DNA-Banden. In diesem Fall mussten die Banden einzeln ausgeschnitten und aufgereinigt werden, um die DNA sequenzieren zu können. Dazu wurden die DNA-Banden zunächst unter UV-Licht vorsichtig und möglichst genau mit einem Skalpell aus dem Gel herausgeschnitten. Die Aufreinigung erfolgte mit dem NucleoSpin Extract II Kit der Firma Macherey-Nagel nach Anleitung des Herstellers. Die aufgereinigte DNA wurde anschließend in 30 µl Aqua dest. gelöst.

2.3.3.5 Isolierung und Klonierung der LD-PCR-Produkte

Ließen sich die ausgeschnittenen DNA-Banden aufgrund von Verunreinigungen mit anderen DNA-Fragmenten nicht sequenzieren, wurde das entsprechende DNA-Fragment vor der Sequenzierung mit Hilfe einer Klonierung isoliert. Hierbei wurden einzelne DNA-Fragmente in *E. coli* transformiert.

Die Klonierung der PCR-Produkte erfolgte mit dem TOPO TA Cloning Kit (Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland) nach Angaben des Herstellers. Die nun im Vektor vorliegenden DNA-Fragmente konnten mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Die PCR erfolgte mit dem Goldstar DNA Polymerase System (Eurogentec, Seraing, Belgien).

Pipettierschema für eine Reaktion:

2,5 µl PCR Reaktionspuffer (10x)

1 µl dNTP Mix (5 nmol/µl)

0,5 µl Taq-Polymerase Gold Star (4 U/µl)

4 µl Magnesiumchloridlösung (25 mM)

je 1µl der vektorspezifischen Primer 461 und 462 (20 pmol/µl)

14 µl Aqua dest.

PCR-Programm :

| | | |
|--------------------------|------|-------|
| Schritt 1 : | 95°C | 5 min |
| Schritt 2 : | 95°C | 30 s |
| Schritt 3: | 60°C | 30 s |
| Schritt 4: | 72°C | 1 min |
| Schritt 2 bis Schritt 4: | | 35x |
| Schritt 5: | 72°C | 5 min |
| Schritt 6: | 4°C | Ende |

Nach Durchführung der PCR erfolgte die Auftrennung und Analyse der PCR-Produkte auf einem 1%igen Agarosegel (s. 2.3.3.3).

2.3.3.6 Sequenz-PCR

Sowohl die PCR-Produkte aus der LD-PCR als auch die PCR-Produkte aus der Klonierung wurden nun sequenziert. Hierzu wurde das Big Dye Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) verwendet.

Zunächst wurde eine Sequenz-PCR angesetzt:

Pipettierschema für eine Reaktion:

1 µl Big Dye Terminator

2 µl Big Dye 10x Puffer

2 µl eines Primers, der bei der entsprechenden LD-PCR eingesetzt wurde, bei

Sequenzierung aus der Klonierung einer der vektorspezifischen Primer (verwendete Primer s. Tabelle 7)

3 µl PCR-Produkt (bei Ansatz aus ausgeschnittener Bande) oder 1 µl PCR-Produkt bei Ansatz direkt aus dem PCR-Produkt oder aus der Klonierung mit Aqua dest. auf 20 µl auffüllen

Sequenz-PCR-Programm:

| | | |
|--------------------------|------|-------|
| Schritt 1: | 96°C | 2 min |
| Schritt 2: | 96°C | 10 s |
| Schritt 3: | 50°C | 5 s |
| Schritt 4: | 60°C | 4 min |
| Schritt 2 bis Schritt 4: | | 25x |
| Schritt 5: | 4°C | Ende |

2.3.3.7 Aufreinigung der Sequenz-PCR-Produkte

Die Aufreinigung der Sequenz-PCR-Produkte erfolgte mit Microcon Centrifugal Filter Devices wie in 2.3.2.2 beschrieben. Am Ende wurde die aufgereinigte DNA in 25 µl Aqua dest. gelöst.

2.3.3.8 Sequenzierung

Die aufgereinigten Sequenz-PCR-Produkte wurden vollständig (25 µl) in Plastikbehälter, die speziell für die Sequenzierung hergestellt worden sind, pipettiert und mit dem Kapillar-Sequenzierer (Genetic Analyzer ABI PRISM 310, Applied Biosystems) analysiert. Die Laufzeit betrug 30 min und die Injektionszeit betrug zunächst 10 s und wurde gegebenenfalls bei zusätzlichen Durchläufen variiert (15, 30, 45 s).

2.3.3.9 Auswertung und Dokumentation der Sequenzen

Die Analyse der Sequenzen wurde mit Hilfe der Software Sequencing Analysis 5.2 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und Sequence Scanner v1.0 (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) durchgeführt. Die Sequenzen wurden ausgedruckt und die genaue Lokalisation der Sequenzen wurde mit der Blat-Funktion der Datenbank des Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat>) analysiert. Dafür wurden die erhaltenen Sequenzen eingegeben. Daraufhin suchte die elektronische Datenbank nach Übereinstimmungen mit dieser Sequenz im gesamten humanen Genom und zeigte die Übereinstimmungen, ihre Abweichungen von der eingegebenen Sequenz und die Lage dieser Übereinstimmungen an. Mittels dieser Angaben konnten die Original-Sequenzen der LD-PCRs im humanen Genom lokalisiert werden.

2.3.4 Durchführung einer hochauflösenden genomweiten Microarray-Analyse mit dem Genome-Wide Human SNP 6.0 Array

Nach Abschluss der Untersuchungen der Translokation t(1;14) mittels Array-CGH, FISH-Analysen und LD-PCRs wurde die DNA des Jungen mit der Translokation t(1;14) von Frau Dr. rer. nat. Inga Vater am Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) mit Hilfe eines Affymetrix GeneChip® Mapping-Arrays analysiert. Mit dieser hochauflösenden Technik sollten submikroskopische genomische Imbalancen im Bruchpunktbereich detektiert werden, deren Existenz eine wesentliche Erklärungsmöglichkeit für die Ergebnisse der Arbeit waren. Dabei ist die theoretische Auflösung, die mit dieser

Microarray-Plattform erreicht werden kann, mit etwa 17 kb deutlich höher als bei der bereits zu Beginn der Untersuchungen durchgeführten Array-CGH mit etwa 100 kb.

Es wurde der Genome-Wide Human SNP (=Single Nucleotide Polymorphism) 6.0 Array (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) verwendet. Dieser besteht aus 25mer Oligonukleotiden, die speziell zur Untersuchung von bestimmten SNPs entwickelt wurden. Der verwendete Genome-Wide Human SNP Array 6.0 enthält mehr als 900.000 Oligonukleotide zur Detektion von SNPs sowie mehr als 900.000 Oligonukleotide zur Detektion von CNVs. Die Probenvorbereitung sowie die Hybridisierung und das Waschen des Arrays wurden nach dem Genome-Wide Human SNP 6.0-Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Die bioinformatische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Software Genotyping Console 3.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA).

Die Ergebnisse dieser GeneChip-Analyse wurden freundlicherweise von Frau Dr. rer. nat. Inga Vater für die Auswertung in der vorliegenden Arbeit zur Verfügung gestellt.

3. Ergebnisse

In der vorliegenden Arbeit sollte eine *de novo* Translokation t(1;14) bei einem Patienten mit einem De Morsier Syndrom sowohl mit zytogenetischen als auch mit molekulargenetischen Methoden charakterisiert werden.

Um submikroskopische genomische Imbalancen auszuschließen, wurde eine Array-CGH durchgeführt. Umfangreiche FISH-Analysen an Zellen aus dem peripheren Blut des Patienten mit BAC- und Fosmid-Sonden verfolgten das Ziel, die Bruchpunkte auf beiden Chromosomen zu kartieren. Um diese noch genauer zu lokalisieren, wurden LD-PCR-Untersuchungen durchgeführt, die die Bruchpunkte der Translokation t(1;14) überspannen sollten. Danach wurden Kandidatengene identifiziert, die an der Entstehung eines De Morsier Syndroms beteiligt sein könnten. Im Anschluss an diese Untersuchungen wurde eine hochauflösende Microarray-Analyse mit dem Genome-Wide Human SNP 6.0 Array durchgeführt. Diese verfolgte das Ziel, submikroskopische genomische Imbalancen im Bereich der Bruchpunkte zu detektieren, die unterhalb des Auflösungsvermögens der in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Array-CGH liegen.

3.1 Phänotyp des Patienten mit der Translokation t(1;14) und Ergebnisse der klinischen Diagnostik

Bei dem Patienten handelt es sich um den Sohn einer 18-jährigen Erstgebärenden und eines 25-jährigen Vaters, der vier Tage vor dem errechneten Geburtstermin nach vorzeitigem Blasensprung spontan geboren wurde. Das Geburtsgewicht betrug 3450 g, die Größe 54 cm und der Kopfumfang 35,5 cm. Der APGAR war 6/8/10.

Bereits im Kreißsaal fiel der Neugeborene durch deutliche Unreife auf. Unmittelbar nach der Geburt ereigneten sich rezidivierende schwere Hypoglykämien, die mit Glucose-Infusionen behandelt werden mussten. Des Weiteren bestand ein verlängerter cholestatischer Neugeborenenikterus, der mit einer Phototherapie behoben werden konnte. Schon wenige Tage nach der Geburt erkrankte der Neugeborene an einem schweren Harnwegsinfekt mit eitriger Pyelonephritis, was eine stationäre Behandlung nach sich zog.

Im Alter von sechs Monaten wurde eine schwere Sehbehinderung mit Verdacht auf Amaurose festgestellt. Im Alter von einem Jahr wurde ein MRT des Gehirns angefertigt. Dieses führte schließlich zu der Diagnose eines De Morsier Syndroms.

In den ersten Lebensjahren ereigneten sich mehrere Infektionen wie eine Gastroenteritis mit Erbrechen und eine Tonsillitis, die aufgrund eines schweren Verlaufs mit Hypoglykämien zu mehreren stationären Aufenthalten führten. Im Alter von vier Jahren kam es erstmals zum Auftreten eines hypoglykämischen Komas.

Ebenfalls im Alter von einem Jahr wurde eine Chromosomenanalyse am peripheren Blut des Jungen im Institut für Humangenetik (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) durchgeführt. Diese ergab einen balanciert erscheinenden Karyotyp mit einer Translokation t(1;14). Eine Wiederholung der Chromosomenanalyse im Alter von acht Jahren konnte diesen Befund bestätigen (s. Abbildung 5).

Die daraufhin am peripheren Blut beider Eltern durchgeführten Chromosomenanalysen ergaben jeweils einen regelrechten Chromosomensatz ohne Hinweis auf strukturelle Chromosomenaberrationen. Somit handelt es sich bei der bei dem Patienten identifizierten Translokation t(1;14) um eine *de novo* Veränderung. Eine molekulargenetische Untersuchung der vier Exons und der Exon-Intron-Grenzen des *HESX1*-Gens mittels Amplifizierung und Sequenzierung konnte eine Mutation in diesem Gen als Ursache für das De Morsier Syndrom ausschließen (PD Dr. R. Santer, Klinik für Allgemeine Pädiatrie des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein, Campus Kiel).

Im Alter von 8 1/12 Jahren wurde bei dem Jungen in der Klinik für Allgemeine Pädiatrie (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel) im Rahmen eines stationären Aufenthaltes eine umfassende Diagnostik durchgeführt:

Stationäre Aufnahme:

Es zeigte sich ein blinder, kooperativer Junge in gutem Allgemeinzustand. Die psychomotorische Entwicklung war altersgerecht, die Spontanmotorik seitengleich und die Sensibilität regelrecht. Auffällig waren eine Schädelasymmetrie, ein etwas gedrungener Habitus, relativ kurze Fingerglieder, ein hypoplastisches männliches Genitale, Genua valga und ein leichter Knickfuß beidseits. Die Pupillen waren beidseits weit und zeigten keine Reaktion auf Licht.

Endokrinologische Diagnostik:

Eine zuvor bereits festgestellte primäre Hypothyreose mit sonographisch verkleinerter Schilddrüse wurde bestätigt. Dazu passend ergaben die Laboruntersuchungen ein erhöhtes TSH bei erniedrigten fT₃- und fT₄-Werten. Beim TRH-Test zur Stimulation von TSH kam es zu einem normalen TSH-Anstieg. Die Therapie durch Substitution von L-Thyrox® war nach Erstdiagnose bereits eingeleitet worden.

Mittels weiterer endokrinologischer Tests konnte ein schwerer, substitutionsbedürftiger hypophysärer STH-Mangel nachgewiesen werden. So kam es weder im Rahmen des Arginin-Belastungstests noch im Rahmen des Glucagon-Propranolol-Tests zu einem Anstieg des STH. Auch die Entwicklung des Jungen im Hinblick auf Längenwachstum und Gewicht wiesen auf den STH-Mangel hin. Während das Körpergewicht des Jungen zunächst um die 50. Perzentile nach Brandt pendelte und dann auf die 10. Perzentile abfiel, ereignete sich

beim Längenwachstum ein Abfall von der 50. auf die 3. Perzentile (s. Abbildung 3) (Brandt, 1980). Außerdem zeigte ein Röntgenbild der linken Hand ein kurzgliedriges, aber normal mineralisiertes Handskelett mit einem retardierten Skeletalter von 4 6/12 Jahren. Es wurde eine Therapie mit einer täglichen subkutanen STH-Substitution eingeleitet.

Weitere Tests führten zur Diagnose einer tertiären Nebenniereninsuffizienz. Dabei bewegte sich der basale ACTH-Wert im unteren Normbereich und das Cortisol-Tagesprofil zeigte ein erniedrigtes Niveau mit wenig Rhythmus. Es wurde eine Substitution mit Hydrocortison begonnen.

Die Basalwerte für LH und FSH waren altersgemäß niedrig präpubertär. Das LH war im Stimulationstest normal stimulierbar, während beim FSH eine leicht verminderte Stimulierbarkeit festgestellt werden konnte.

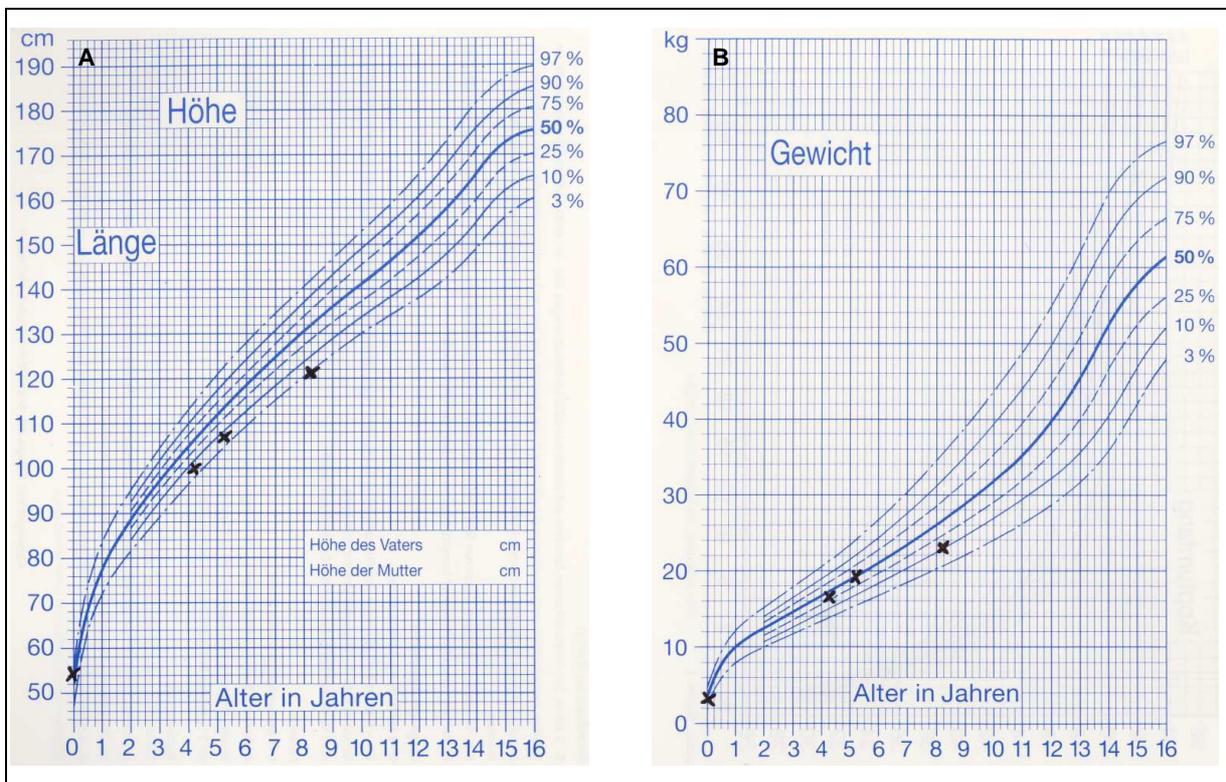


Abbildung 3: Perzentilenkurven nach Brandt für Länge (A) und Gewicht (B) des Patienten mit der Translokation t(1;14): A: Zu sehen ist ein Abfall des Längenwachstums von der 50. Perzentile zum Zeitpunkt der Geburt auf die 3. Perzentile im Alter von 8 1/12 Jahren, was den schweren hypophysären STH-Mangel dokumentiert. B: Auch das Gewicht ist von der 50. Perzentile innerhalb der ersten Lebensjahre auf die 10. Perzentile im Alter von 8 1/12 Jahren gefallen.

Bildgebende Diagnostik:

Die im Alter von 8 Jahren angefertigten MRT-Bilder zeigten eine Hypoplasie beider Nn. optici, des Chiasma opticum und des Tractus opticus beidseits sowie eine Agenesie des Septum pellucidum. Außerdem war zu erkennen, dass das Knie und der ventrale Anteil des Truncus des Corpus callosum nicht angelegt sind, während die vordere Kommissur regelrecht vorhanden ist. Des Weiteren waren eine hypoplastische Adenohypophyse, ein hypoplastischer Hypophysenstiel sowie eine auf dem Boden des dritten Ventrikels liegende ektope Neurohypophyse zu sehen.

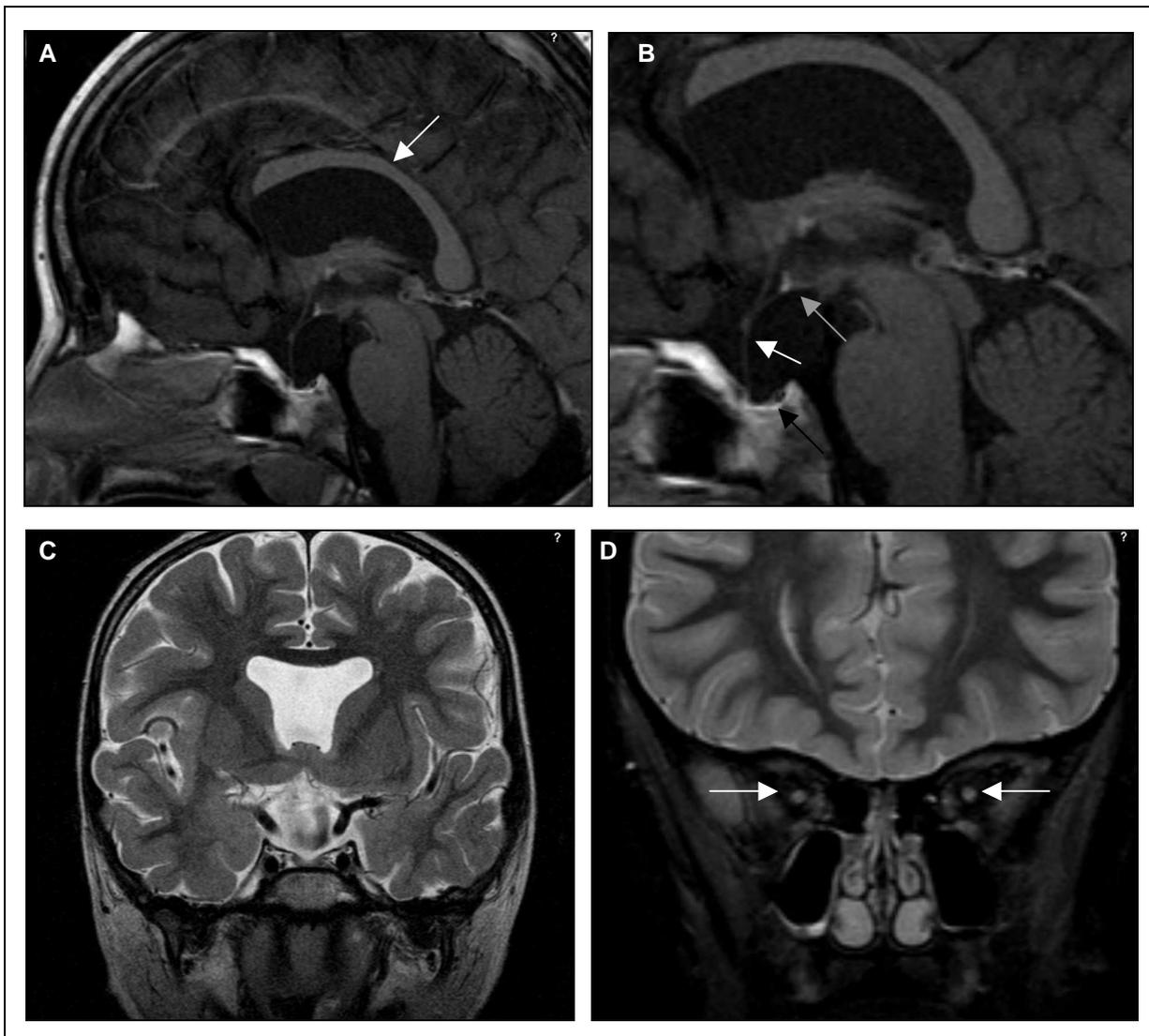


Abbildung 4: MRT-Bilder des Patienten mit einem De Morsier Syndrom und einer Translokation t(1;14): A: Sagittales T1-gewichtetes Bild: Der ventrale Anteil und das Knie des Corpus callosum (weißer Pfeil) fehlen. B: Vergrößerung eines Ausschnitts aus A: Zu erkennen sind die hypophysären Fehlbildungen: Die Adenohypophyse in der Sella turcica (schwarzer Pfeil) und der Hypophysenstiel (weißer Pfeil) sind hypoplastisch, die Neurohypophyse liegt auf dem Boden des dritten Ventrikels (grauer Pfeil). C: Koronares T2-gewichtetes Bild: Durch die Agenesie des Septum pellucidum ist eine fehlende Trennung der beiden Seitenventrikel erkennbar. D: Koronares T2-gewichtetes Bild mit Fettunterdrückung, auf dem die Hypoplasie der beiden Sehnerven (weiße Pfeile) zu sehen ist.

EKG und Echokardiographie:

Ein EKG zeigte keine Auffälligkeiten und eine Echokardiographie stellte einen hämodynamisch unbedeutsamen Ductus arteriosus dar.

EEG:

Ebenfalls im Alter von acht Jahren wurde die Erstdiagnose einer Absence-Epilepsie gestellt und eine Therapie mit Valproat begonnen. Die im Rahmen der stationären Diagnostik angefertigten EEGs ergaben keine Auffälligkeiten.

Insgesamt zeigt der Phänotyp des Patienten mit der Translokation t(1;14) die typische Symptomtrias eines De Morsier Syndroms mit Hypoplasie beider Sehnerven, einer hypophysären Fehlbildung und damit assoziierten endokrinen Funktionsstörungen sowie Fehlbildungen im Mittellinienbereich des Gehirns.

3.2 Ergebnisse der genetischen Untersuchungen

3.2.1 Nachweis der Translokation t(1;14) mittels konventioneller Chromosomenanalyse

In Abbildung 5A ist ein im Alter von acht Jahren nach Standardmethoden angefertigtes Karyogramm des Patienten dargestellt (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Schleswig-Holstein, Campus Kiel).

Die Darstellung der Chromosomen erfolgte nach Trypsin-Giemsa-Färbung (G-Bänderung). Das Karyogramm zeigt einen numerisch unauffälligen männlichen Chromosomensatz. Bei der strukturellen Beurteilung ist eine Translokation zwischen dem kurzen Arm eines Chromosoms 1 und dem langen Arm eines Chromosoms 14 zu erkennen. Diese Translokation t(1;14) stellte sich in allen ausgewerteten Metaphasen dar. Sie schien nach Auswertung von 20 Karyogrammen zytogenetisch balanciert zu sein. Zytogenetisch wurden die Bruchpunkte in 1p31 und 14q13 lokalisiert. Der zytogenetische Karyotyp lautete: 46, XY, t(1;14)(p31;q13).

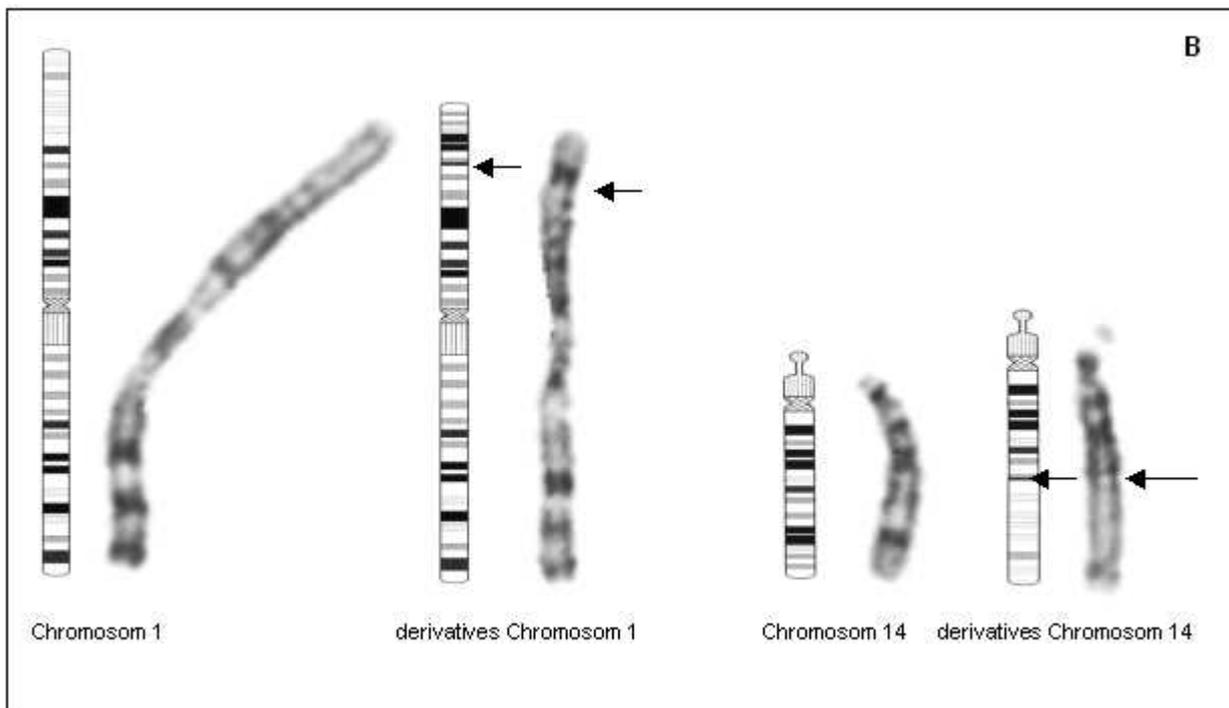
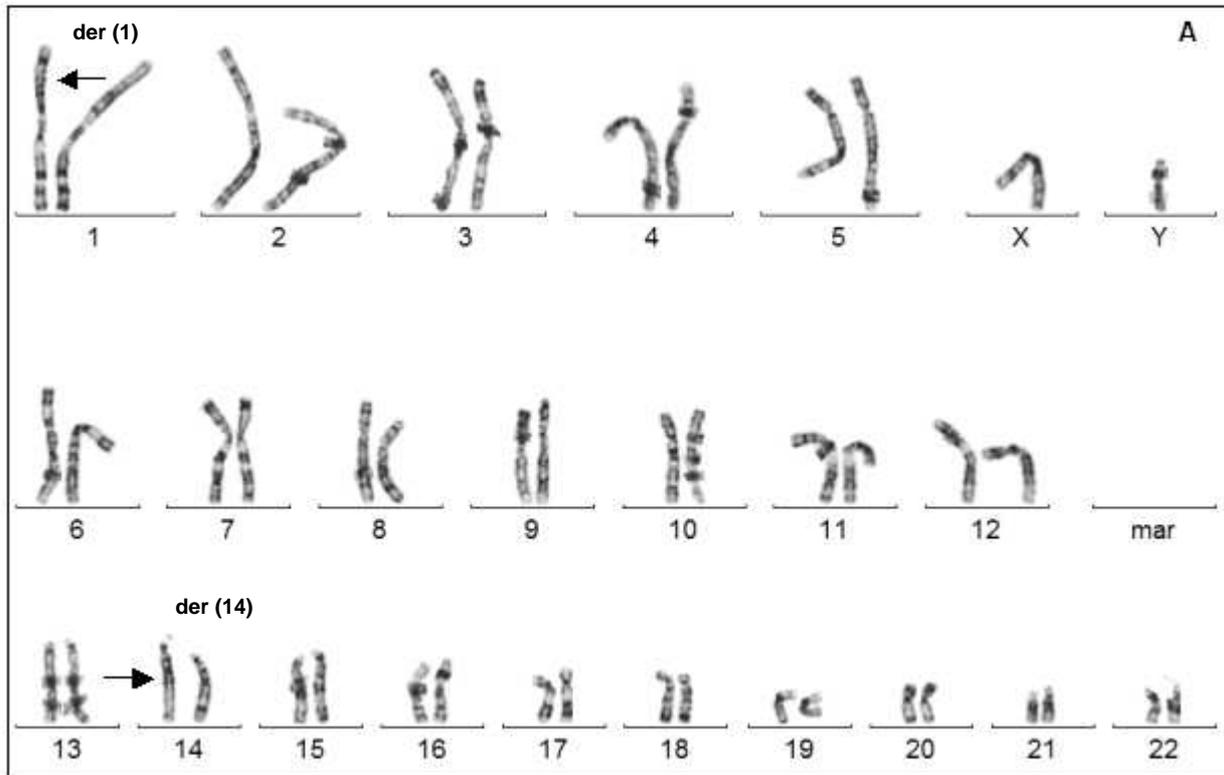


Abbildung 5: A: Karyogramm des Patienten: 46 XY, t(1;14)(p31;q13); Die derivativen Chromosomen 1 (= der (1)) und 14 (=der (14)) sind im Bereich der Bruchpunkte mit Pfeilen gekennzeichnet. B: Partielles Karyogramm der Translokation t(1;14). Abgebildet sind jeweils die schematische Darstellung des unveränderten bzw. derivativen Chromosoms 1 und 14 sowie eine Vergrößerung des entsprechenden Chromosoms aus dem in Abbildung A gezeigten Karyogramm. Die Bereiche der Bruchpunkte sind mit Pfeilen gekennzeichnet.

3.2.2 Ausschluss submikroskopischer Imbalancen mittels Array-CGH

Um ausschließen zu können, dass Imbalancen (z.B. Deletionen oder Duplikationen) im Genom des Patienten mit der Translokation $t(1;14)$ vorliegen, die das phänotypische Erscheinungsbild des Patienten erklären könnten, wurde eine Array-CGH mit einem 244K Array durchgeführt.

Die Array-CGH ergab bei einer Auflösung von etwa 0,1 Mb im Rahmen der diagnostischen Kriterien (zehn abweichende Oligonukleotide) keine Hinweise auf klinisch relevante Deletionen oder Duplikationen im Patientengenom (s. Abbildung 6).

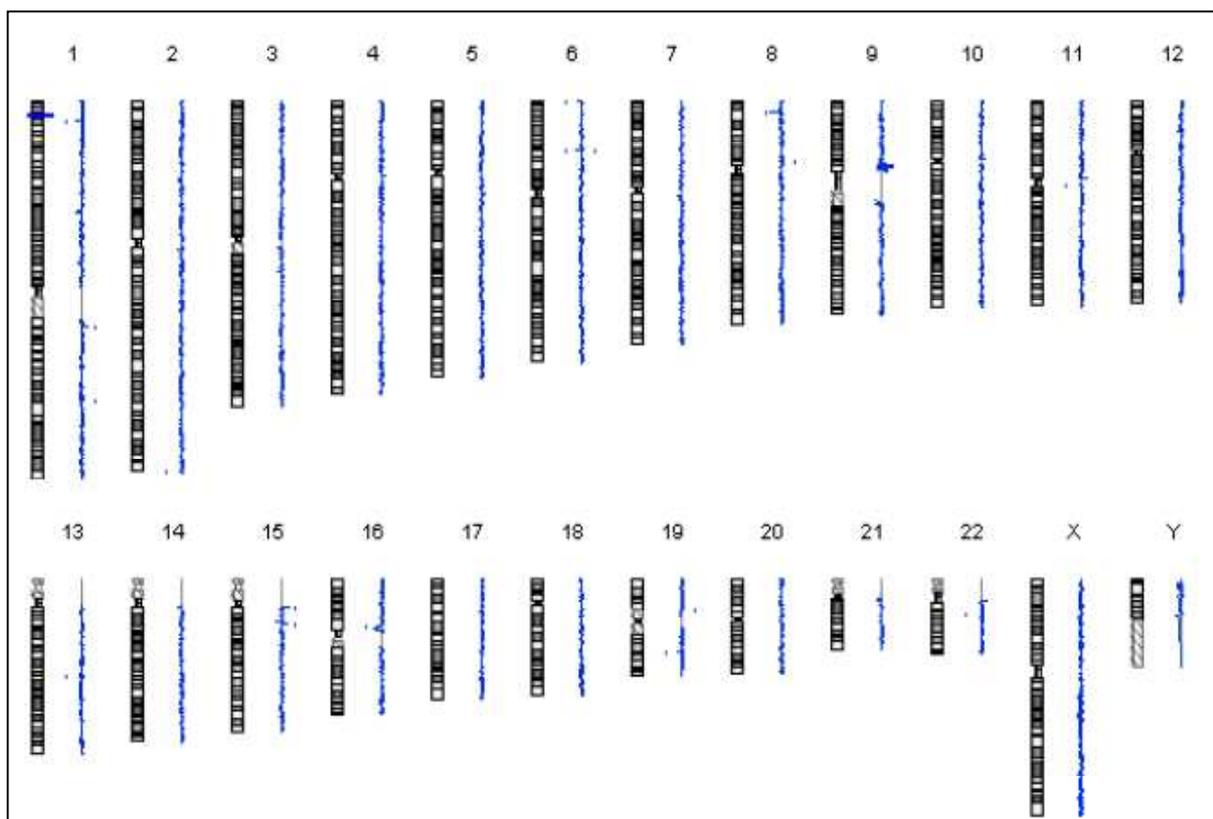


Abbildung 6: Übersicht der Ergebnisse der Array-CGH: Dargestellt ist das gesamte Patientengenom, das im Rahmen der diagnostischen Kriterien keine Hinweise auf relevante Deletionen oder Duplikationen zeigt.

3.2.3 Eingrenzung der Bruchpunkte der Translokation $t(1;14)$ mittels FISH

Um die Bruchpunkte der Translokation $t(1;14)$ eingrenzen und Kandidatengene identifizieren zu können, wurden FISH-Untersuchungen mit BAC- und Fosmid-Sonden durchgeführt. Dabei wurden zunächst die BAC-Sonden hybridisiert. Basierend auf den Ergebnissen mit den BAC-Sonden wurden anschließend Fosmide für weitere Hybridisierungen ausgewählt.

Mittels der Fosmid-Sonden konnten die Bruchpunkte und damit die möglichen Kandidatengene noch weiter eingegrenzt werden.

Insgesamt gelang es sowohl mit den BAC- als auch mit den Fosmid-Sonden, die Bruchpunkte genauer einzugrenzen.

3.2.3.1 Kontrolluntersuchungen

Nach Herstellung der Sondengemische wurde jede Sondenkombination an fixierten Zellen von gesunden Probanden, die in Carnoy's Fixativ vorlagen, getestet. Da die Untersuchungen mit den BAC-Sonden bei Beginn dieser Arbeit bereits begonnen worden waren, sind hier exemplarisch nur die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen mit den Fosmid-Sonden detailliert beschrieben.

Alle hergestellten Sonden hybridisierten mit Ausnahme von WI2-2655E24 regelmäßig auf den Chromosomen 1 und 14. Es waren jeweils zwei fluoreszierende Sondenpaare (rot/grün) in einer Inter- oder einer Metaphase der Kontrollpersonen zu sehen (Abbildungen 7A, 7B, 8B und 10B). Die Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen sind in Tabelle 10 dargestellt:

Tabelle 10: Ergebnisse der Kontrolluntersuchungen mit den Fosmid-Sonden

| Kontroll-Nummer | Sondenkombination und Markierung | Signale nach Hybridisierung Interphasen / Metaphasen | | Anmerkungen |
|-----------------|-----------------------------------|--|-----------------------------------|--|
| 1 | WI2-2774I12 so WI2-2163C20 sgr | 2x Co R/G | 2x Co R/G auf Chr.14 | keine |
| 2 | WI2-2774I12 so WI2-746G16 sgr | 2x Co R/G | 2x Co R/G auf Chr.14 | keine (Abb. 10B) |
| 3 | WI2-3231L8 so WI2-1019H13 sgr | 2x Co R/G | 2x Co R/G auf Chr.14 | keine |
| 4 | WI2-1035A15 so WI2-2163C20 sgr | 2x Co R/G | 2x Co R/G auf Chr.14 | keine (Abb. 7A) |
| 5 | WI2-592O7 so WI2-2110O6 sgr | 2x Co R/G | 2x Co R/G auf Chr.1 | keine (Abb. 7B) |
| 6 | WI2-2353C20 so WI2-2655E24 sgr | 2x Co R/G 2x G | 2x Co R/G auf Chr.1 2x G | WI2-2655E24 chimär: 4 grüne Signale pro Zelle - in folgenden FISH-Analysen wurden nur Metaphasen ausgewertet (Abb. 7C) |
| 7 | WI2-1691F22 so WI2-680P3 sgr | 2x Co R/G | 2x Co R/G auf Chr.1 | keine |
| 8 | WI2-1697K16 so WI2-759H6 sgr | 2x Co R/G | 2x Co R/G auf Chr.1 | keine |
| 9 | WI2-592O7 so WI2-746G16 sgr | 2x R/2x G | 2x R auf Chr.1 2x G auf Chr.14 | keine (Abb. 8B) |

so= spectrum orange; sgr= spectrum green; R= rotes Signal; G= grünes Signal; Co= Colokalisation (beide Sonden liegen direkt nebeneinander, so dass ein rot/grünes Signal (R/G) zu erkennen ist); Kontroll-Nummern 1-9= Kontroll-Nummern im Rahmen der vorliegenden Arbeit; Chr.1= Chromosom 1; Chr.14= Chromosom 14

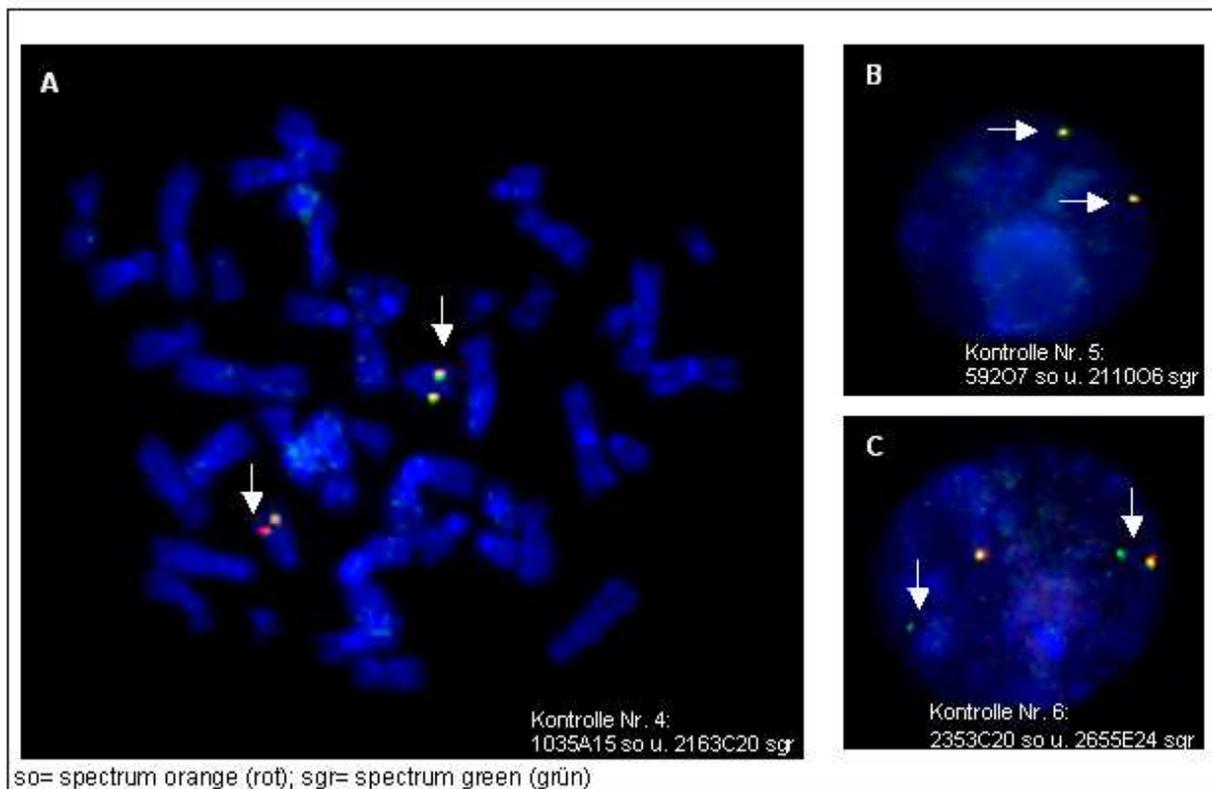


Abbildung 7: Kontrolluntersuchungen der FISH-Analyse mit Fosmid-Sonden: A: Metaphase der Kontrolle Nr. 4: Beide Sonden hybridisieren colokalisiert auf Chromosom 14 (weiße Pfeile). B: Interphase der Kontrolle Nr. 5: Es sind zwei rot/grüne Colokalisationen zu erkennen (weiße Pfeile). C: Die Interphase der Kontrolle Nr. 6 zeigt neben der erwarteten Colokalisation zwei weitere einzelne grüne Signale (weiße Pfeile). Das heißt, dass die Sonde 2655E24 chimär ist. Aus diesem Grund wurden bei den weiteren FISH-Untersuchungen mit 2655E24 nur noch Metaphasen ausgewertet. Auf die Bezeichnung „W12-“ vor den Fosmid-Sonden wurde verzichtet, um eine bessere Übersichtlichkeit zu erreichen.

3.2.3.2 Kartierung des Bruchpunktes in 1p mittels BAC- und Fosmid-Sonden

Zur Kartierung des Bruchpunktes in 1p wurden zehn BAC- und acht Fosmid-Sonden eingesetzt.

Bei den BAC-Sonden konnte mit der Sonde RP11-624P10, die bei unveränderten Chromosomen in 1p33 hybridisierte, ein eindeutiger Bruch nachgewiesen werden, was die nach Auswertung des Karyogramms vermutete Lage des Bruchpunktes korrigieren konnte. Die von RP11-624P10 weiter centromerwärts liegende Sonde RP11-742I1 wies nach Hybridisierung mit dem t(1;14)-Fall ebenfalls einen Bruch auf. Allerdings zeigte sich ein kleineres Restsignal auf dem derivativen Chromosom 14. Das größere Restsignal befand sich auf dem derivativen Chromosom 1, was den Bruchpunkt weiter eingrenzte. Alle von RP11-742I1 aus weiter centromerwärts gelegenen Sonden lagen ohne Bruch auf dem derivativen Chromosom 1. Weiter telomerwärts von RP11-624P10 liegende Sonden konnten nach Hybridisierung nur auf dem derivativen Chromosom 14 nachgewiesen werden (s. Tabelle 11 sowie Abbildung 12).

Mit den Fosmid-Sonden ließ sich in der von der Sonde WI2-592O7 überspannten Region ein Bruch nachweisen (Abbildung 8A). Alle weiter centromerwärts von WI2-592O7 liegenden Sonden hybridisierten nur auf dem derivativen Chromosom 1. Alle weiter telomerwärts von WI2-592O7 gelegenen Sonden konnten auf dem derivativen Chromosom 14 dargestellt werden, wobei die Signale von WI2-1691F22 und WI2-1697K16 (Abbildung 9A und 9B) dort kleiner erschienen als auf dem nicht von der Translokation betroffenen Chromosom 1. Die Sondenkombinationen und Ergebnisse nach der Hybridisierung mit den Fosmid-Sonden sind in Tabelle 15 (s. Anhang, 7.2) detailliert dargestellt.

Tabelle 11: Lage der bei der Kartierung des Bruchpunktes in 1p genutzten BAC- und Fosmid-Sonden nach Hybridisierung mit Patientenmetaphasen:

| BACs auf Chromosom 1: | | |
|---------------------------------|----------------------|--|
| Klon: | normale Lage: | Lage nach Hybridisierung auf Patientenmetaphasen: |
| RP11-441P20 | 1p34.2 | der (14) |
| RP11-638A18 | 1p34.1 | der (14) |
| RP11-705G19 | 1p33 | der (14) |
| RP11-624P10 | 1p33 | Split, der (1) und der (14) |
| RP11-742I1 | 1p33 | Split, kleines Restsignal auf der (14) |
| RP11-707K1 | 1p33 | der (1) |
| RP11-359D19 | 1p33 | der (1) |
| RP11-260M10 | 1p33 | der (1) |
| RP11-75N16 | 1p31.3 | der (1) |
| RP11-262K24 | 1p31.1 | der (1) |
| Fosmide auf Chromosom 1: | | |
| Klon: | normale Lage: | Lage nach Hybridisierung auf Patientenmetaphasen: |
| WI2-2353C20 | 1p33 | der (14) |
| WI2-1697K16 | 1p33 | der (14) |
| WI2-1691F22 | 1p33 | der (14) |
| WI2-592O7 | 1p33 | Split, der (1) und der (14) |
| WI2-2655E24 | 1p33 | der (1) |
| WI2-759H6 | 1p33 | der (1) |
| WI2-680P3 | 1p33 | der (1) |
| WI2-2110O6 | 1p33 | der (1) |

der (1)= derivatives Chromosom 1; der (14)= derivatives Chromosom 14; Split= Bruch in der Sonde nach der Hybridisierung

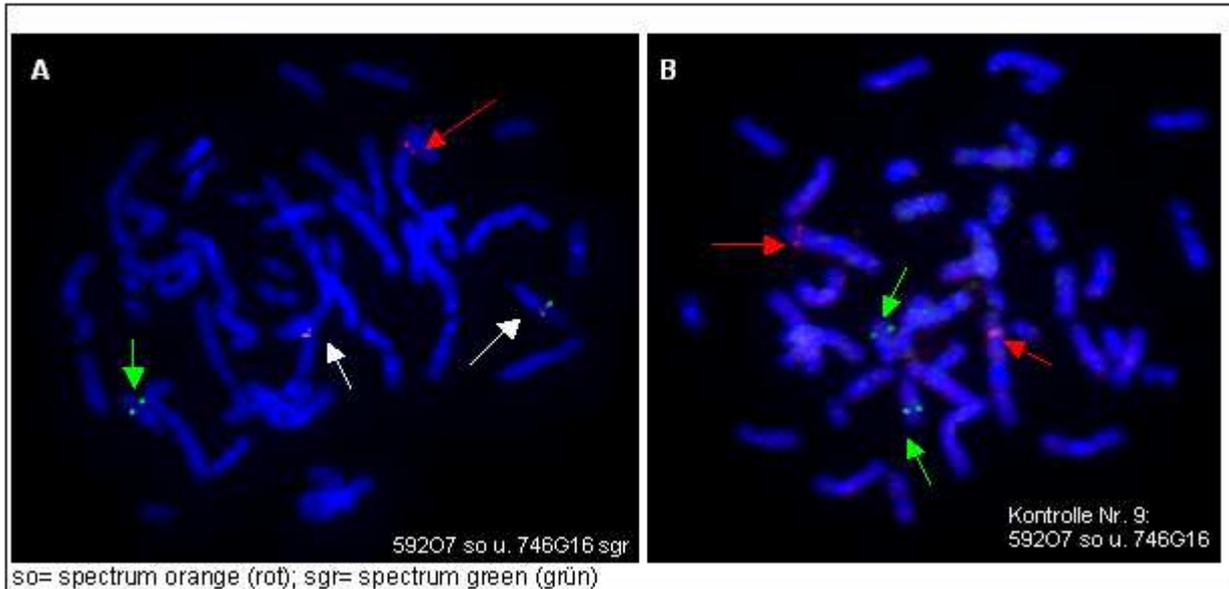


Abbildung 8: FISH mit Fosmid-Sonden: A: Metaphase des Patienten mit der Translokation t(1;14): Sowohl die rot markierte Sonde 59207 (Chr.1) als auch die grün markierte Sonde 746G16 (Chr.14) weisen einen Split auf. Die beiden derivativen Chromosomen zeigen eine Colokalisation (rot/grün, weiße Pfeile), während auf den unveränderten Chromosomen 1 (roter Pfeil) und 14 (grüner Pfeil) je ein Signal zu erkennen ist (Chr.1= rot; Chr.14= grün). B: Zum Vergleich eine Metaphase der Kontrolle Nr. 9: Die rot markierte Sonde 59207 hybridisiert auf Chr.1 (rote Pfeile) und die grün markierte Sonde 746G16 auf Chr.14 (grüne Pfeile). Auf die Bezeichnung „W12-“ vor den Fosmid-Sonden wurde verzichtet, um eine bessere Übersichtlichkeit zu erreichen.

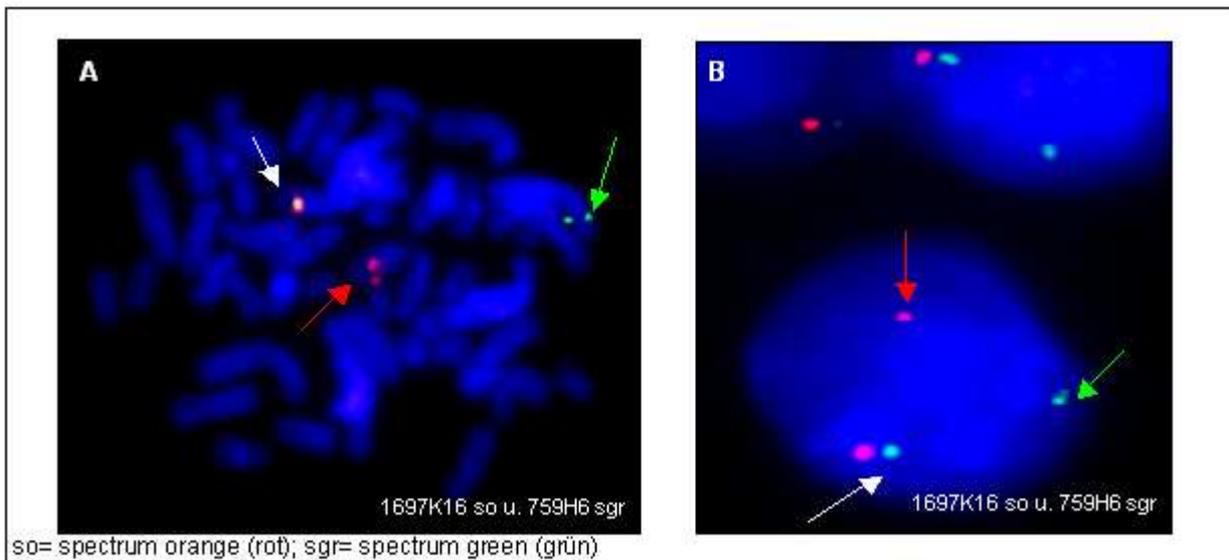


Abbildung 9: FISH mit Fosmid-Sonden: A: Metaphase des Patienten mit der Translokation t(1;14): Die rot markierte Sonde 1697K16 (Chr.1) liegt nach Hybridisierung auf dem derivativen Chromosom 14 (roter Pfeil), die grün markierte Sonde 759H6 (Chr.1) liegt auf dem derivativen Chromosom 1 (grüner Pfeil). Zudem ist eine Colokalisation (rot/grün) auf dem unveränderten Chromosom 1 zu erkennen (weißer Pfeil). B: Zum Vergleich eine Interphase mit der gleichen Sondenkombination: Es sind eine Colokalisation (rot/grün, weißer Pfeil) und jeweils ein einzelnes rotes (roter Pfeil) und ein einzelnes grünes Signal (grüner Pfeil) zu erkennen. Dabei wirkt das einzelne rote Signal der Sonde 1697K16 auf dem derivativen Chromosom 14 kleiner als das Signal vom unveränderten Chromosom 1. Um die Abbildung übersichtlicher zu machen, wurde auf die Bezeichnung „W12-“ vor den Fosmid-Sonden verzichtet.

3.2.3.3 Kartierung des Bruchpunktes in 14q mittels BAC- und Fosmid-Sonden

Um den Bruchpunkt in 14q kartieren zu können, wurden fünfzehn BAC- und sechs Fosmid-Sonden eingesetzt. So konnte auch der Bruchpunkt in 14q weiter eingegrenzt werden. Die Lage aller verwendeten Sonden nach der Hybridisierung ist in Tabelle 12 und Abbildung 12 dargestellt.

Bei den BAC-Sonden zeigte sich in der Sonde RP11-58M1 ein eindeutiger Bruch. Ebenso konnte bei der davon weiter centromerwärts liegenden Sonde RP11-50K16 ein Bruch festgestellt werden, wobei der größte Teil dieser Sonde auf dem derivativen Chromosom 14 und ein kleinerer Rest auf dem derivativen Chromosom 1 nachgewiesen wurde. Da diese Sonden in 14q24.2 liegen, konnte auch hier die zytogenetische Lokalisation dieses Bruchpunktes korrigiert werden. Alle von RP11-58M1 weiter centromerwärts liegenden Sonden wurden nach Hybridisierung nur auf dem derivativen Chromosom 14 nachgewiesen. Dagegen hybridisierten alle weiter telomerwärts von RP11-58M1 liegenden Sonden auf dem derivativen Chromosom 1.

Die Fosmid-Sonden konnten den Bruchpunkt in 14q24.2 noch weiter eingrenzen. Die einzelnen Sondenkombinationen und Ergebnisse nach der Hybridisierung mit den Fosmid-Sonden sind in Tabelle 15 detailliert dargestellt (s. Anhang, 7.2). Mit der Sonde WI2-746G16 ließ sich ein eindeutiger Bruch nachweisen (Abbildung 10A). Die etwas weiter centromerwärts liegende Sonde WI2-2163C20 ließ in Kombination mit WI2-2774I12 einen Bruch mit einem sehr kleinen Restsignal auf dem derivativen Chromosom 14 auch nach mehreren Wiederholungen nur vermuten (Abbildung 11B). Deswegen wurde WI2-2163C20 mit WI2-1035A15 kombiniert. In dieser Konstellation konnte die Vermutung des Bruches bestätigt und das sehr kleine Restsignal auf dem derivativen Chromosom 14 deutlicher dargestellt werden (Abbildung 11A). Alle weiter centromerwärts liegenden Sonden wurden auf dem derivativen Chromosom 14 nachgewiesen. WI2-1019H13 als weiter telomerwärts von WI2-746G16 liegende Sonde lag nach Hybridisierung nur auf dem derivativen Chromosom 1, was bedeutet, dass der Bruchpunkt im Bereich von WI2-746G16 liegt.

Ergebnisse

Tabelle 12: Lage der bei der Kartierung des Bruchpunktes in 14q genutzten BAC- und Fosmid-Sonden nach Hybridisierung mit Patientenmetaphasen:

| BACs auf Chromosom 14: | | |
|----------------------------------|----------------------|--|
| Klon: | normale Lage: | Lage nach Hybridisierung mit Patientenmetaphasen: |
| RP11-124D2 | 14q11.2 | der (14) |
| RP11-109D12 | 14q12 | der (14) |
| RP11-54H22 | 14q12 | der (14) |
| RP11-1113M10 | 14q24.1-14q24.2 | der (14) |
| RP11-300A24 | 14q24.2 | der (14) |
| RP11-50K16 | 14q24.2 | Split, aber nur sehr kleines Restsignal auf der (1) |
| RP11-58M1 | 14q24.2 | Split, der (1) und der (14) |
| RP11-910L1 | 14q24.2 | der (1) |
| RP11-448I1 | 14q24.2 | der (1) |
| RP11-696D21 | 14q24.2 | der (1) |
| RP11-892B8 | 14q24.2 | der (1) |
| RP11-611E14 | 14q24.2 | der (1) |
| RP11-289P13 | 14q24.2 | der (1) |
| RP11-714F24 | 14q24.3 | der (1) |
| RP11-715K20 | 14q24.3 | der (1) |
| Fosmide auf Chromosom 14: | | |
| Klon: | normale Lage: | Lage nach Hybridisierung mit Patientenmetaphasen: |
| WI2-1035A15 | 14q24.2 | der (14) |
| WI2-3231L8 | 14q24.2 | der (14) |
| WI2-2774I12 | 14q24.2 | der (14) |
| WI2-2163C20 | 14q24.2 | Split, kleineres Restsignal auf der (14) |
| WI2-746G16 | 14q24.2 | Split, der (1) und der (14) |
| WI2-1019H13 | 14q24.2 | der (1) |

der (1)= derivatives Chromosom 1; der (14)= derivatives Chromosom 14; Split= Bruch in der Sonde nach der Hybridisierung

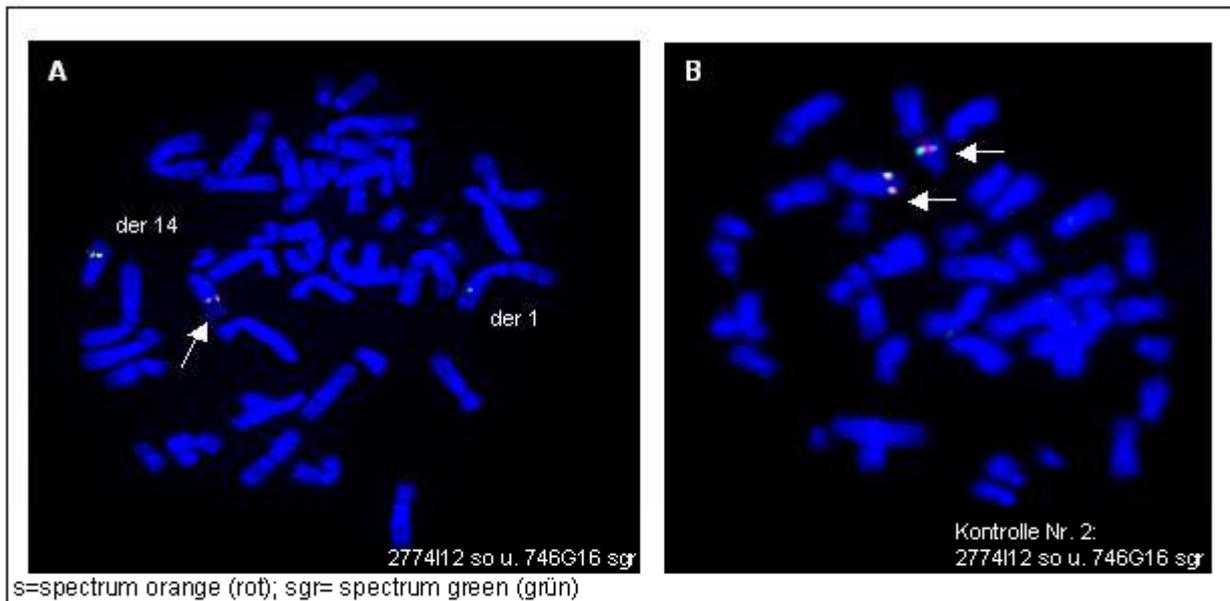


Abbildung 10: FISH mit Fosmid-Sonden: A: Metaphase des Patienten mit der Translokation t(1;14): Die grün markierte Sonde 746G16 (Chr.14) zeigt einen Bruch und liegt auf den derivativen Chromosomen 1 und 14 sowie als Colokalisation mit der rot markierten Sonde 2774I12 auf Chromosom 14 (weißer Pfeil). B: Zum Vergleich eine Metaphase der Kontrolle Nr. 2: Beide Sonden erzeugen ein colokalisiertes Signal (rot/grün) auf beiden Chromosomen 14 (weiße Pfeile). Auf die Bezeichnung „WI2-“ vor den Fosmid-Sonden wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in dieser Abbildung verzichtet.

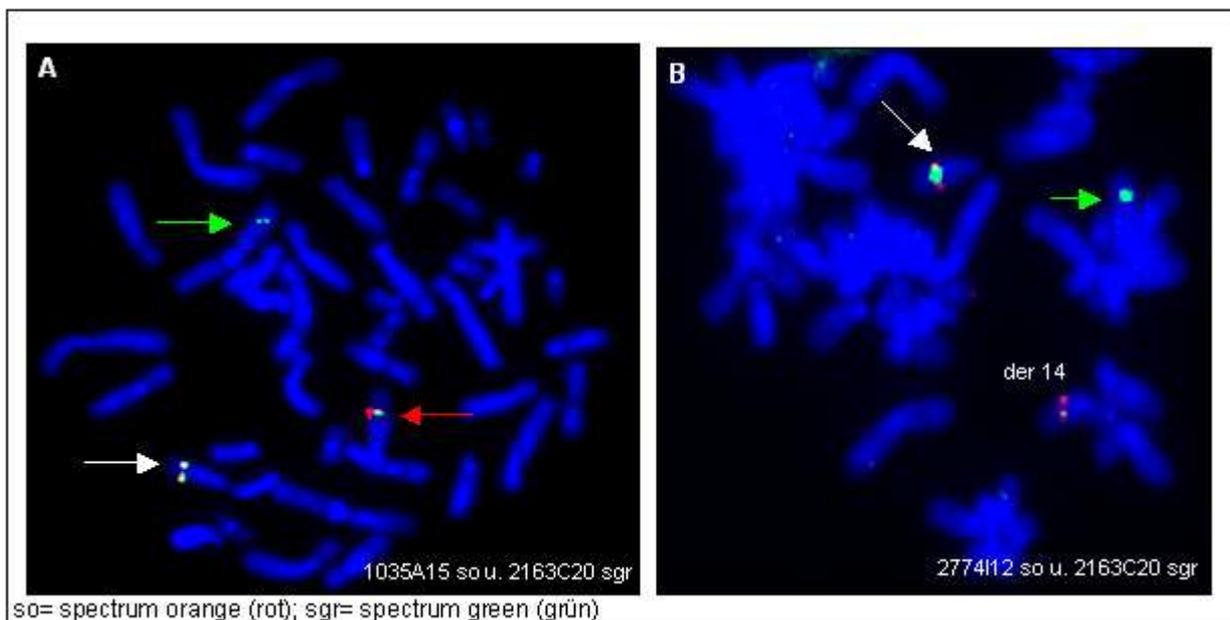


Abbildung 11: FISH mit Fosmid-Sonden: A: Metaphase des Patienten mit der Translokation t(1;14): Es ist eine Colokalisation (rot/grün) auf dem unveränderten Chromosom 14 zu erkennen (weißer Pfeil). Bei der Hybridisierung auf den derivativen Chromosomen zeigt die grün markierte Sonde einen Bruch an, denn es zeigt sich ein grünes Signal auf dem derivativen Chromosom 1 (grüner Pfeil) und ein kleineres grünes Restsignal auf dem derivativen Chromosom 14 (roter Pfeil), wo auch die rot markierte Sonde 1035A15 hybridisiert. Diese Sonde liegt also nicht innerhalb der Bruchpunkte. B: Die rot markierte Sonde 2774I12 (Chr.14) liegt auf dem derivativen Chromosom 14. In der grün markierten Sonde 2163C20 hingegen lässt sich ein Bruch nur erahnen, aber nicht eindeutig nachweisen. Ein größerer Teil der grün markierten Sonde liegt auf dem derivativen Chromosom 1 (grüner Pfeil), der Rest scheint auf dem derivativen Chromosom 14 zu liegen. Deswegen wurde 2163C20 (Chr.14) mit 1035A15 (Chr.14) kombiniert, wo sich der Bruch besser darstellen lässt. Auf dem unveränderten Chromosom 14 ist eine Colokalisation (rot/grün) zu erkennen (weißer Pfeil). Auf die Bezeichnung „WI2-“ vor den Fosmid-Sonden wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in dieser Abbildung verzichtet.

3.2.4 Ergebnisse der Long-Distance-PCRs und Auswertung der Sequenzen

Im Anschluss an die FISH-Analysen sollte versucht werden, die Bruchpunkte der Translokation t(1;14) noch genauer zu lokalisieren. Dafür wurden zahlreiche LD-PCRs durchgeführt, die die Bruchpunkte in 1p33 und 14q24.2 überspannen sollten.

Insgesamt wurden acht Rückwärtsprimer, die an eine Sequenz auf Chromosom 1 hybridisieren, mit dreizehn Rückwärtsprimern, die an eine Sequenz auf Chromosom 14 hybridisieren, in über 180 LD-PCR-Reaktionen unter verschiedenen Reaktionsbedingungen miteinander kombiniert. Die Ergebnisse der LD-PCRs mit allen durchgeführten Primerkombinationen sind in Tabelle 16 (s. Anhang, 7.3) zusammengefasst.

Die Kontrollen mit Aqua dest. waren in allen Fällen negativ. Auch die Kontrollen mit der DNA gesunder Probanden erzeugten keine spezifischen DNA-Fragmente.

In den meisten Reaktionen mit der DNA des Patienten ließen sich nach Durchführung der Agarosegelelektrophorese keine DNA-Fragmente von LD-PCR-Produkten nachweisen. In wenigen Fällen gelang es, DNA-Fragmente zu amplifizieren und diese auch zu sequenzieren.

Die insgesamt sechs erhaltenen Sequenzen wurden mit der Blat-Funktion der Datenbank des Human Genome Browser Gateway ausgewertet. Eine Sequenz, die die Bruchpunkte der Translokation t(1;14) überspannt und diese somit ganz genau lokalisieren könnte, wurde dabei nicht gefunden, auch wenn einige der Sequenzen Fragmente der untersuchten Chromosomenregionen enthielten.

Die Auswertungen der einzelnen Sequenzen sind im Anhang in Tabelle 17 und den Abbildungen 19, 20 und 21 (s. Anhang, 7.4) dargestellt.

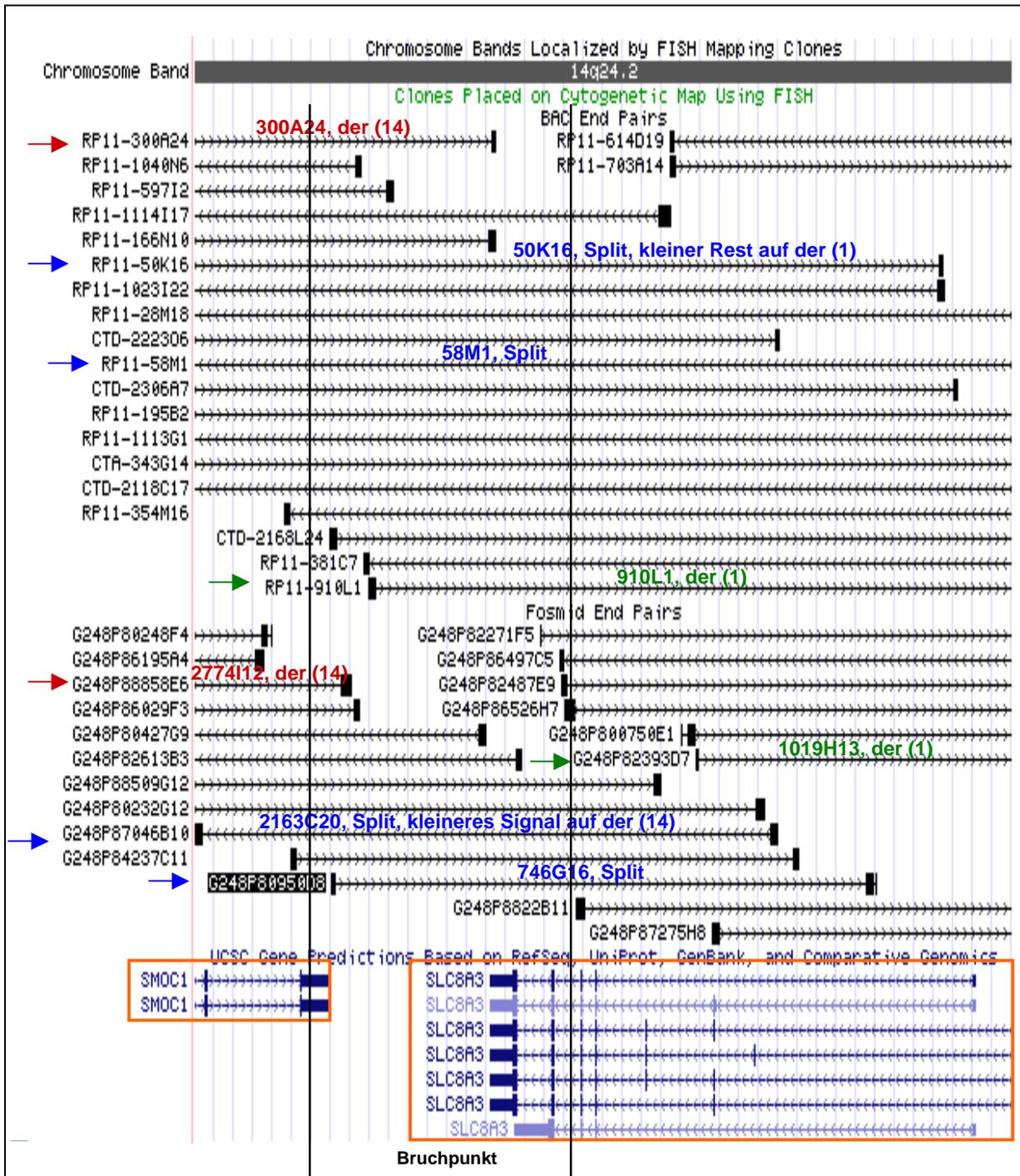


Abbildung 14: Karte der Bruchpunktregion in 14q24.2: BAC- und Fosmid-Sonden, die nach Hybridisierung auf dem derivativen Chromosom 1 (=der (1)) lagen, sind mit grünen Pfeilen, die auf dem derivativen Chromosom 14 (=der (14)) mit roten Pfeilen und die, die einen Bruch aufwiesen (=Split), mit blauen Pfeilen gekennzeichnet. Kandidatengene sind orange gekennzeichnet. Der Bereich, in dem nach den Ergebnissen der FISH-Untersuchungen der Bruchpunkt ungefähr liegt, ist mit schwarzen Strichen markiert. Auf die Bezeichnungen „RP11-“ und „WI2-“ vor den BAC- bzw. Fosmid-Sonden wurde verzichtet, um eine bessere Übersicht zu erreichen. (Erstellt mit der Datenbank des Human Genome Browser Gateway, Version: März 2006)

3.2.6 Auswertung der Array-CGH im Hinblick auf genomische Imbalancen im Bereich der eingegrenzten Kandidatengene

Nach der Identifizierung der Gene *CYP4A22* in 1p33 sowie *SMOC1* und *SLC8A3* in 14q24.2 als mögliche Kandidatengene für das De Morsier Syndrom mittels der FISH-Analysen wurden die Ergebnisse der durchgeführten Array-CGH (s. 3.2.2) im Hinblick auf genomische Imbalancen im Bereich der identifizierten Kandidatengene erneut ausgewertet. Dabei wurde besonders auf Imbalancen im Bereich der eingegrenzten Bruchpunkte geachtet, die unterhalb der institutsinternen diagnostischen Kriterien lagen, um Anhalt für submikroskopische Imbalancen zu bekommen, die so klein sind, dass sie von der Array-CGH nicht erfasst wurden.

Dabei fiel auf, dass im Bereich und der näheren Umgebung der mittels FISH-Analysen identifizierten Kandidatengene sowohl auf Chromosom 1 als auch auf Chromosom 14 einzelne Oligonukleotide außerhalb einer festgelegten Log₂ Ratio von |0,5| lagen und somit von der Software als statistisch signifikant bewertet wurden. Im Bereich der eingegrenzten Kandidatengene auf Chromosom 1 handelte es sich dabei um drei Oligonukleotide, zwischen denen ein von der Software als nicht signifikant erfasstes Oligonukleotid lag (s. Abbildung 15; Tabelle 13 (Anhang, 7.1)). Auf Chromosom 14 wichen im Bereich und der näheren Umgebung des identifizierten Kandidatengens *SLC8A3* zwei Oligonukleotide signifikant ab (s. Abbildung 16 ; Tabelle 14 (Anhang, 7.1)).

Da allerdings Signale einzelner Oligonukleotide eine hohe Variabilität zeigen können, werden nach den institutsinternen diagnostischen Kriterien Regionen erst als aberrant bewertet, wenn mehr als zehn signifikant veränderte Oligonukleotide in diesen liegen. Aufgrund der Ergebnisse der FISH-Analysen ließ sich allerdings nicht ausschließen, dass diese abweichenden Oligonukleotide im Bereich der identifizierten Kandidatengene auf eine Deletion hinweisen, die unterhalb der Auflösung der durchgeführten Array-CGH-Analyse liegt. Eine solche Deletion innerhalb eines Kandidatengens könnte dann für die Entstehung des De Morsier Syndroms bei dem Patienten mit der Translokation t(1;14) ursächlich sein.

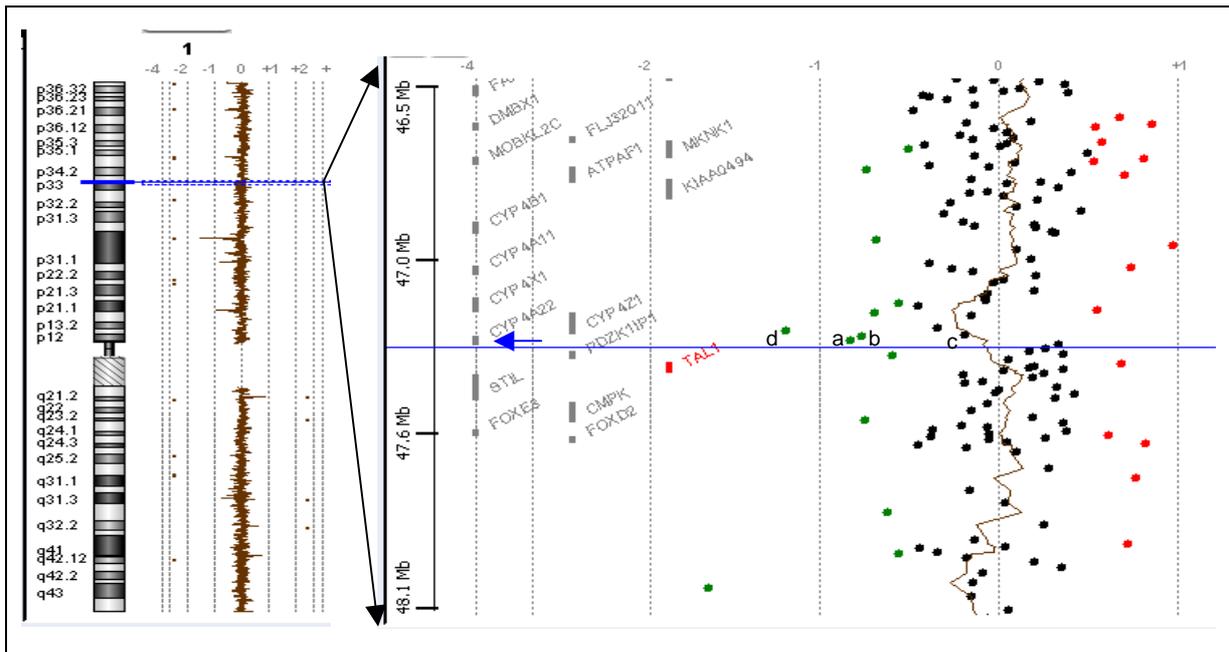


Abbildung 15: Ausschnitt der Ergebnisse der Array-CGH für das Chromosom 1: Gezeigt ist die Region im Bereich des durch die FISH-Analysen eingrenzten Bruchpunktes in 1p sowie die Lage des identifizierten Kandidatengens *CYP4A22* (blauer Pfeil). Die grünen Punkte zeigen die Oligonukleotide an, die von der Software als signifikante Verluste bewertet werden. Die roten Punkte werden als signifikante Zugewinne gewertet; die schwarzen liegen im Normbereich. Die als signifikant bewerteten Oligonukleotide im Bereich des eingegrenzten Kandidatengens *CYP4A22* sind mit Buchstaben gekennzeichnet und werden in Tabelle 13 (s. Anhang, 7.1) näher erläutert. In der Region des eingegrenzten Kandidatengens sind im Rahmen der diagnostischen Kriterien keine genomischen Imbalancen zu erkennen. Deletionen unterhalb des Auflösungsvermögens der hier durchgeführten Array-CGH lassen sich allerdings nicht ausschließen.

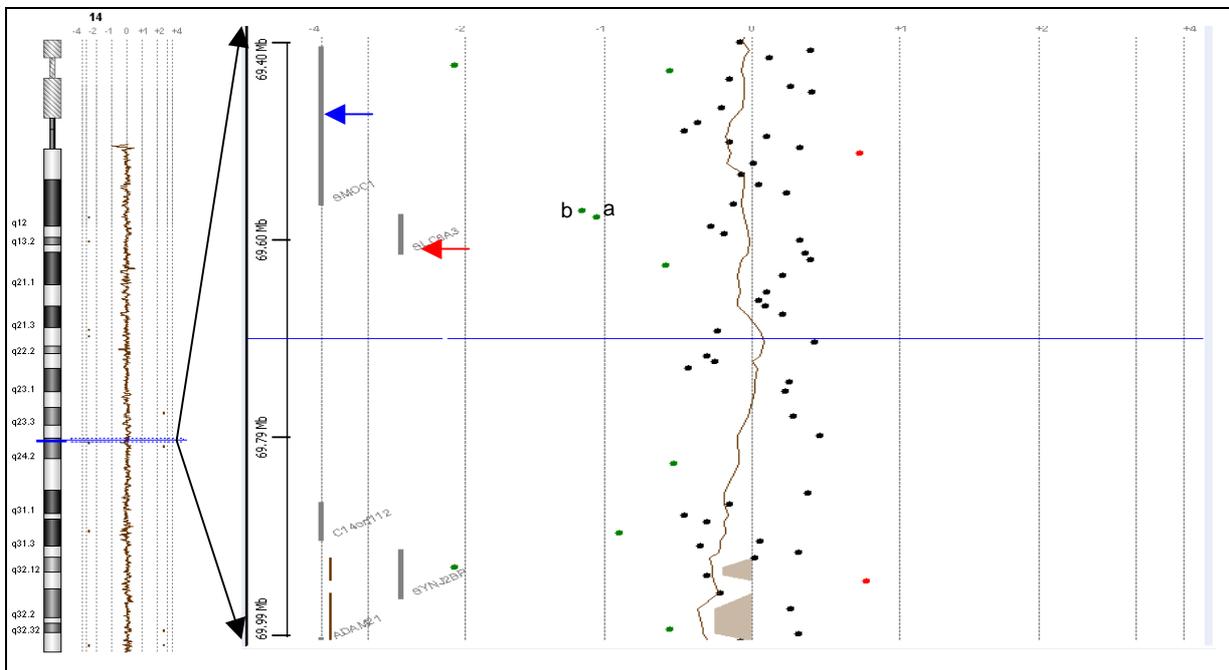


Abbildung 16: Ausschnitt der Ergebnisse der Array-CGH für das Chromosom 14: Gezeigt ist die Region im Bereich des durch die FISH-Analysen eingrenzten Bruchpunktes in 14q sowie die Lage der identifizierten Kandidatengene *SMOC1* (blauer Pfeil) und *SLC8A3* (roter Pfeil). Die grünen Punkte zeigen die Marker an, die von der Software als signifikante Verluste bewertet werden. Die roten Punkte werden als signifikante Zugewinne gewertet; die schwarzen liegen im Normbereich. Die als signifikant bewerteten Oligonukleotide im Bereich des eingegrenzten Kandidatengens *SLC8A3* sind mit Buchstaben gekennzeichnet und werden in Tabelle 14 (s. Anhang, 7.1) näher erläutert. In der Region der später eingegrenzten Kandidatengens sind im Rahmen der diagnostischen Kriterien keine genomischen Imbalancen zu erkennen. Deletionen unterhalb des Auflösungsvermögens der hier durchgeführten Array-CGH lassen sich allerdings nicht ausschließen.

3.2.7 Identifizierung von *SLC8A3* als Kandidatengen für das De Morsier Syndrom mittels eines Affymetrix GeneChip® Mapping Arrays

Da die Ergebnisse der Array-CGH Anlass zu der Vermutung gaben, dass eventuell genetische Imbalancen im Bereich der eingegrenzten Kandidatengene vorliegen (s. 3.2.6), wurde eine hochauflösende genomweite Microarray-Analyse mit dem Genome Wide Human SNP 6.0 der Firma Affymetrix durchgeführt. Ziel dieser Untersuchung war es, submikroskopische genetische Imbalancen im Bruchpunktbereich der Translokation t(1;14) zu detektieren, die mit der in dieser Arbeit verwendeten Array-CGH-Plattform aufgrund des geringeren Auflösungsvermögens im Rahmen der diagnostischen Kriterien nicht nachgewiesen werden konnten.

Die hochauflösende Array-Analyse mit dem SNP-Array zeigte eindeutig eine 10-15 kb große Deletion im Bereich des Bruchpunktes in 14q24.2, in die ausschließlich das eingegrenzte Kandidatengen *SLC8A3* involviert war (s. Abbildung 17). In der Bruchpunktregion auf Chromosom 1 zeigte sich keine Imbalance. Somit konnte *SLC8A3* in 14q24.2 in dieser Arbeit als neues Kandidatengen für das De Morsier Syndrom identifiziert werden.

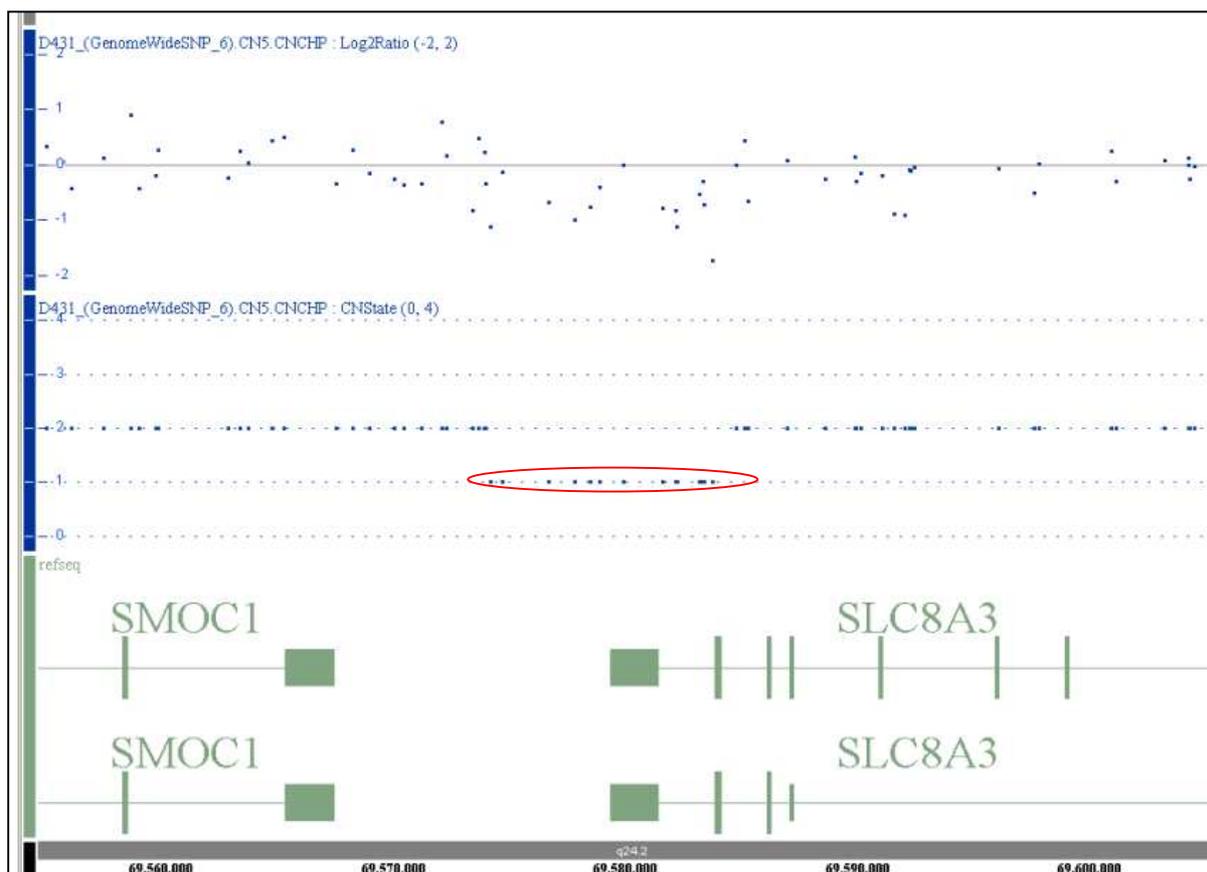


Abbildung 17: Darstellung der Copy Number Analyse des Genome-Wide Human SNP Arrays 6.0 (Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) des Falles des Patienten mit der Translokation t(1;14)(p33;q24.2) mit Hilfe der Software Genotyping Console 3.0: Zu sehen ist eine 10-15 kb große Deletion (rote Markierung) im Bereich des bereits zuvor identifizierten Kandidatengens *SLC8A3* in 14q24.2.

4. Diskussion

Die Ätiologie des De Morsier Syndroms ist bis heute nicht umfassend geklärt. Es wird eine multifaktorielle Genese diskutiert: Einerseits werden äußere Einflüsse als mögliche Ursache beschrieben (Rainbow et al., 2005; Patel et al., 2006; Mc Nay et al., 2007). Andererseits konnten in sehr seltenen Fällen Mutationen nachgewiesen werden (meist: Mutationen im *HESX1*-Gen) (Kelberman und Dattani, 2007a).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine *de novo* aufgetretene Translokation t(1;14) bei einem Jungen mit einem De Morsier Syndrom mit molekularzyto- und molekulargenetischen Methoden untersucht werden. Ziel war es, die Translokation genau zu charakterisieren und neue Kandidatengene für das De Morsier Syndrom zu identifizieren. Mittels einer Array-CGH ergab sich kein Anhalt für größere genomische Imbalancen im Genom des Jungen. Mit Hilfe zahlreicher FISH-Untersuchungen mit BAC- und Fosmid-Sonden konnte die Translokation als t(1;14)(p33;q24.2) charakterisiert werden. Durch LD-PCRs, die das Ziel hatten, den Bruchpunkt zu überspannen, konnten die Bruchpunkte zwar nicht kloniert werden, aber aufgrund der Ergebnisse der FISH-Untersuchungen konnten die Gene *CYP4A22* auf Chromosom 1 sowie *SMOC1* und *SLC8A3* auf Chromosom 14 als mögliche neue Kandidatengene für das De Morsier Syndrom identifiziert werden. Letztendlich wurde mittels einer abschließenden hochauflösenden Microarray-Analyse mit dem Genome-Wide Human SNP 6.0 Array der Firma Affymetrix unter besonderer Berücksichtigung des Bruchpunkt-bereiches eine Deletion im Bereich des *SLC8A3*-Gens in 14q24.2 detektiert. So konnte das *SLC8A3*-Gen von den drei aufgrund der FISH-Analysen eingegrenzten möglichen Kandidatengenen als neues wahrscheinliches Krankheitsgen für das De Morsier Syndrom identifiziert werden.

4.1 Einsatz des Genome-Wide Human SNP 6.0 Arrays zur Detektion submikroskopischer Imbalancen im Bruchpunktbereich

Nach der Identifizierung der drei Gene *CYP4A22*, *SMOC1* und *SLC8A3* als mögliche neue Kandidatengene für das De Morsier Syndrom wurde mit Hilfe eines Affymetrix GeneChip® Mapping-Arrays (Genome-Wide Human SNP 6.0 Array) eine ca. 10-15 kb große Deletion im Bereich des *SLC8A3*-Gens des Jungen mit der Translokation t(1;14) identifiziert. Durch das Vorliegen dieser Deletion lässt sich die Auswertung der Ergebnisse der anderen durchgeführten Untersuchungen genauer erklären:

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Array-CGH ermöglichte den Ausschluss submikroskopischer Deletionen und Duplikationen sowohl im Bereich der Bruchpunkte als auch in den restlichen Bereichen des Genoms des Patienten mit der Translokation t(1;14) in

einer Größenordnung von etwa 100 kb. Allerdings ließ sich nicht ausschließen, dass andere strukturelle Chromosomenveränderungen (z.B. Deletionen) unterhalb der angewandten Auflösung der Array-CGH vorhanden sind. Einen Hinweis auf derartige Veränderungen gaben zwei Oligonukleotide im Bereich des Bruchpunktes in 14q24.2, die als signifikant bewertet wurden (s. 3.2.6). Diese liegen im Bereich der mit dem Genome-Wide Human SNP 6.0 Array nachgewiesenen Deletion in 14q24.2, wurden aber im Rahmen der durchgeführten Array-CGH nicht als aberrant bewertet. Nach den institutsinternen diagnostischen Kriterien werden Regionen erst als signifikant aberrant bewertet, wenn mehr als zehn signifikant veränderte Oligonukleotide vorliegen. Da das Auflösungsvermögen des durchgeführten Affymetrix GeneChip® Mapping-Arrays mit ca. 17 kb deutlich höher ist als das Auflösungsvermögen der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Array-CGH mit ca. 100 kb, war es möglich, eine Deletion im Bruchpunktbereich in 14q24.2 nachzuweisen, auf die die Ergebnisse der Array-CGH hinweisen.

Auch die auf den ersten Blick widersprüchlichen Ergebnisse mit einigen FISH-Sonden können durch den Nachweis der Deletion in 14q24.2 erklärt werden: So konnte mit der Fosmid-Sonde WI2-746G16 eindeutig ein Bruch identifiziert werden. Auch mit der Fosmid-Sonde WI2-2163C20 konnte ein Bruch nachgewiesen werden. Dabei wurde in der Sonde WI2-2163C20 ein großes Restsignal auf dem derivativen Chromosom 1 nachgewiesen, während das Restsignal auf dem derivativen Chromosom 14 sehr viel kleiner war (s. Abbildungen 10 und 11). Aufgrund der Ergebnisse mit den anderen benachbarten BAC- und Fosmid-Sonden (RP11-300A24, RP11-50K16, RP11-910L1, WI2-2774I12 und WI2-1019H13, s. Abbildung 14) und der im Vergleich zu WI2-746G16 weiter centromerischen Lage auf Chromosom 14, würde man eigentlich einen größeren Rest der Sonde WI2-2163C20 auf Chromosom 14 erwarten. Da die nachgewiesene Deletion in 14q24.2 genau in einem Teil der Fosmid-Sonde WI2-2163C20 liegt, lässt sich das kleinere Signal auf Chromosom 14 sowie die Notwendigkeit mehrerer Sondenkombinationen mit WI2-2163C20 zur Darstellung des Bruches erklären (s. Abbildungen 11A und 11B). Bei der Sonde WI2-746G16 (14q24.2) fiel die Deletion bei der mikroskopischen Auswertung der FISH-Untersuchungen allerdings aufgrund der etwas weiter telomerischen Lage dieser Sonde nicht auf, obwohl auch sie aufgrund ihrer Lage von der Deletion betroffen ist. Die schließlich identifizierte submikroskopische Deletion in 14q24.2 war wahrscheinlich auch der Grund für die intensitätsreduzierten Signale der Fosmid-Sonden WI2-1691F22 und WI2-1697K16 (s. 3.2.3.2).

Des Weiteren stellt die nachgewiesene Deletion im *SLC8A3*-Gen in 14q24.2 wahrscheinlich auch die Erklärung dafür dar, dass mit Hilfe der LD-PCRs keine Bruchpunkt überspannenden Sequenzen amplifiziert werden konnten, da ein Teil der Primerbindungsstellen innerhalb der deletierten Region lag.

4.2 Einsatz der Long-Distance-PCR zur Klonierung der Bruchpunkte der Translokation t(1;14)

Eine Amplifikation der Bruchpunkte mittels einer LD-PCR gelang nicht. Auch dafür waren, wie oben beschrieben, wahrscheinlich die strukturellen Veränderungen im Bereich der Bruchpunkte schuld (s. 4.1).

Ein anderer Grund für die wenigen unspezifischen Ergebnisse der LD-PCRs könnte sein, dass die Reaktionsbedingungen bei den durchgeführten LD-PCRs trotz der modifizierten PCR-Programme für die einzelnen Primer letztendlich nicht optimal waren.

Auf einen weiteren Faktor dafür, dass die LD-PCRs nicht das gewünschte Ergebnis lieferten, weisen zwei der ausgewerteten Sequenzen hin, die ein Long Interspersed Nucleotide Element (LINE) zeigten (Abbildung 20, Anhang 7.4). LINE-Sequenzen sind transponierbare Elemente, die auf allen Chromosomen vorkommen (Ostertag et Kazazian, 2001). Einige LINEs haben die Fähigkeit, sich durch autonome Retrotransposition an verschiedene Stellen des Genoms zu verlagern (Sassaman et. al., 1997). Die Detektion von einigen LINEs beim Versuch der Bruchpunkt überspannenden LD-PCRs könnte einerseits dadurch bedingt sein, dass LINE-Elemente sich oft innerhalb von Bereichen einlagern, an denen DNA-Doppelstrangbrüche auftreten (Morrish et al., 2002; Eickbush, 2002). Genau das ist bei der Entstehung von Translokationen der Fall. Zudem liegen im Bereich des zytogenetisch eingegrenzten Bruchpunktes in 1p33 LINE-Elemente (s. Abbildung 18). So könnte andererseits auch ein LINE-Element die Entstehung der Translokation t(1;14) überhaupt erst induziert haben.

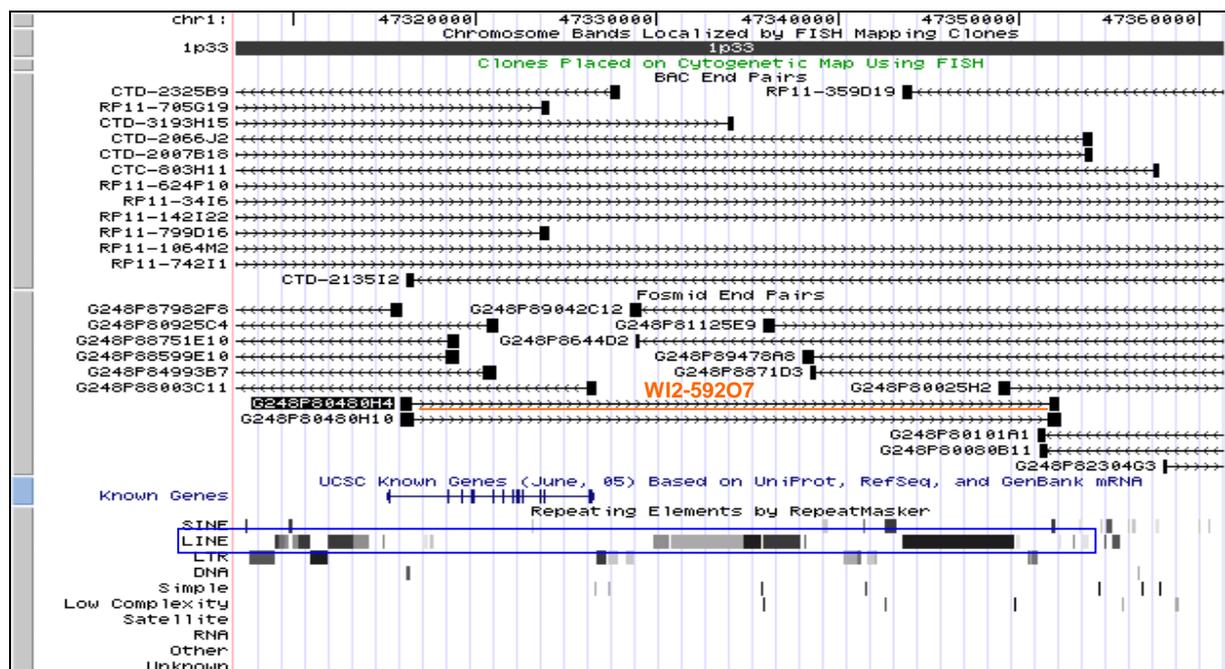


Abbildung 18: Darstellung der Lage der Sonde W12-592O7 in 1p33 (orange markiert), die nach der Hybridisierung einen Split zeigte, und der LINE-Elemente (blau markiert) innerhalb des Bereichs, den diese Sonde in 1p33 überspannt. (Erstellt mit der Datenbank des Human Genome Browser Gateway, Version Mai 2004)

4.3 Identifizierte Kandidatengene und ihre Funktion im Hinblick auf die Entstehung eines De Morsier Syndroms

Wenn auch die Deletion im Bereich des *SLC8A3*-Gens dieses zum herausragenden Kandidatengen für das De Morsier Syndrom macht, so könnten doch auch die beiden anderen durch die FISH-Analysen im Bereich der Bruchpunkte identifizierten Gene z.B. im Sinne eines Positionseffektes eine Rolle bei der Entstehung des De Morsier Syndroms spielen. Somit stellt sich die Frage, ob diese Gene und die entsprechenden Proteine Funktionen aufweisen, die bei Änderung, Abschwächung oder Verlust mit der Ausbildung eines De Morsier Syndroms in Zusammenhang gebracht werden können.

4.3.1 Das *CYP4A22*-Gen

Das *CYP4A22*-Gen liegt in 1p33, besteht aus 12 Exons und ist ein Gen aus der Cytochrom P 450 Familie (Family 4, Subfamily A, Polypeptide 22). Diese besteht aus über 100 Genen im humanen Genom, die in verschiedene Familien, Subfamilien und Polypeptide gegliedert werden. Die Gene der Cytochrom P 450 Familie kodieren für membranassoziierte Monooxygenasen. Das sind Enzyme, die eine Rolle bei der Biosynthese von Steroiden und Gallensäuren, beim Aminosäureabbau, bei der Metabolisierung von Arzneimitteln und anderen Fremdstoffen sowie beim Metabolismus der Fettsäuren und Eicosanoide spielen (Palmer et al., 1993).

Innerhalb der *CYP4A*-Subfamilie konnte man bei den Genen einiger Polypeptidgruppen starke Homologien feststellen (Capdevila et al., 2000). So ist bekannt, dass die Sequenzen der Gene *CYP4A11* und *CYP4A22* zu 95% identisch sind (Palmer et al., 1993; Kawashima et al., 1994; Bellamine et al., 2003).

Die Gene der *CYP4A*-Subfamilie werden vor allem in der Leber und der Niere exprimiert. In ihrer Funktion als $\omega/\omega-1$ -Hydroxylase verstoffwechseln die Mitglieder der *CYP4A*-Subfamilie die Arachidonsäure zu 20-HETE (20-hydroxyeicosatetraenoic acid). Ein ganz wichtiges Enzym für diesen Prozess ist *CYP4A11*. 20-HETE ist als Eicosanoid bekannt, das als potenter renaler Vasokonstriktor und Inhibitor von vaskulären Kalzium-aktivierten Kaliumkanälen wirkt und an der Regulation des Blutdrucks beteiligt ist (Capdevila et al., 1981; Capdevila et al., 2000; Bellamine et al., 2003). Betrachtet man *CYP4A22* im Hinblick auf eine mögliche Funktion bei der Entstehung eines De Morsier Syndroms, kann man aufgrund dessen, was bis jetzt über *CYP4A22* bekannt ist, keine Verbindung zu dem Phänotyp des Jungen mit der Translokation t(1;14) herstellen. Im Hinblick auf assoziierte Erkrankungen wurden bei der japanischen Bevölkerung Polymorphismen im *CYP4A22*-Gen gefunden. Es

wird vermutet, dass diese wie auch einige Polymorphismen des *CYP4A11*-Gens Einfluss auf die Regulation des Blutdrucks haben könnten (Hiratsuka et al., 2006; Gainer et al., 2005).

Über genetische Syndrome oder einzelne Fehlbildungen, die mit *CYP4A22* assoziiert sind, existieren keinerlei Berichte. Da aber auch nichts über Funktionen von *CYP4A22* im Hinblick auf die Embryonalentwicklung bekannt ist, ist es heute kaum möglich Mutationen von *CYP4A22* mit der Entstehung eines De Morsier Syndroms in Verbindung zu bringen.

4.3.2 Das *SMOC1*-Gen

Das *SMOC1*-Gen (*SMOC1* = *SPARC-Related-Modular-Calcium-Binding1* (*SPARC*= *Secreted Protein, Acidic, Cysteine-Rich*)) konnte in 14q24.2 lokalisiert werden und umfasst 150 kb. Die kodierende Region umfasst zwölf Exons. Das *SMOC1*-Protein ist ein Glykoprotein, das vor allem in Membranen verschiedenster Gewebe (Ovar, Gehirn, Thymus, Herz, Leber, Lunge, Skelettmuskulatur, innere Meningen, Zona pellucida der Oozyte und tubuläre und glomeruläre Strukturen der Niere) nachgewiesen werden konnte (Vannahme et al., 2002).

Das *SMOC1*-Protein besteht aus fünf Domänen: Einer FS Domäne (Follistatin-like), zwei TY Domänen (Thyroglobulin-like), einer EC Domäne (EF-hand calcium binding) und einer für *SMOC1* charakteristischen Domäne. Aufgrund dieser Struktur lässt sich *SMOC1* der BM-40 Familie zuordnen (Vannahme et al., 2002). BM-40 ist ein mit der Extrazellulärmatrix assoziiertes Protein, das auch als *SPARC* (Secreted Protein, Acidic, Cysteine-Rich) oder Osteonectin bekannt ist (Lane und Sage, 1994).

Ein Zusammenhang von genetischen Syndromen und *SMOC1*-Aberrationen ist bis heute nicht bekannt. Im Hinblick auf mögliche Zusammenhänge zwischen *SMOC1* und Erkrankungen existiert nur eine Publikation, die zeigt, dass eine erhöhte Expression von *SMOC1* mit astrozytären Tumoren (Grad II und III) assoziiert sein kann (Boon et al., 2004).

Einen Hinweis auf eine mögliche Beteiligung des *SMOC1*-Gens an der Entstehung eines De Morsier Syndroms gibt der Nachweis einer Expression von *SMOC1* während der Embryonalentwicklung von Mäusen im ZNS und der Nachweis von *SMOC1*-mRNA in Membranen des Neuroektoderms, des Plexus choroideus und der Rathke-Tasche (Gersdorff et al., 2006). So wäre es denkbar, dass es bei Veränderungen des *SMOC1*-Gens zu Fehlbildungen in Strukturen kommen könnte, die das De Morsier Syndrom betreffen. Allerdings wurde *SMOC1* während der Embryonalentwicklung von Mäusen auch in Membranen diverser anderer Gewebe und Organe (z.B.: Kapillaren, Skelettmuskulatur und Epidermis) nachgewiesen (Gersdorff et al., 2006). Deshalb wäre es ebenfalls vorstellbar, dass im Falle einer Mutation im *SMOC1*-Gen noch andere Fehlbildungen auftreten könnten.

Insgesamt gibt es bis heute nur sehr wenige Daten über *SMOC1* und seine Funktion, so dass im Grunde genommen nicht vorhergesagt werden kann, welche phänotypischen Veränderungen eine Mutation in diesem Gen beim Menschen auslösen könnte.

4.3.3 Das *SLC8A3*-Gen als neues Kandidatengen für das De Morsier Syndrom

Durch den Nachweis einer Deletion im *SLC8A3*-Gen (*SLC8A3* = Solute Carrier Family 8, Member 3, Synonym: *NCX3*) mittels einer hochauflösenden Microarray-Analyse konnte das *SLC8A3*-Gen eindeutig als neues Kandidatengen für das De Morsier Syndrom identifiziert werden.

Es liegt in 14q24.2, besteht aus neun Exons und umspannt eine Region von ca. 150 kb (Gabellini et al., 2002). Innerhalb der *SLC8*-Genfamilie unterscheidet man die drei Gene *SLC8A1*, *SLC8A2* und *SLC8A3*. Sie kodieren für die drei Isoformen der während der Evolution gut konservierten Natrium-/Kalziumionen-Austauscher *NCX1*, *NCX2* und *NCX3* (Sodium-Calcium-Exchanger 1, 2 und 3). Diese sind in der Plasmamembran lokalisiert und regulieren die Homöostase des Kalziums, indem sie bei physiologischen Bedingungen in einem Natrium-abhängigen Transport ein Kalziumion aus der Zelle aus- und im Gegenzug drei Natriumionen in die Zelle einschleusen. Bei einer Umkehr des elektrochemischen Gradienten für Natrium bei pathophysiologischen Bedingungen kann dieser Transport auch in der entgegengesetzten Richtung stattfinden (Jeffs et al., 2007).

SLC8A1, *SLC8A2* und *SLC8A3* werden in unterschiedlichen Geweben exprimiert. *NCX1* wurde unter anderem vor allem im Herzmuskelgewebe, aber auch im Gehirn und in vielen anderen Geweben nachgewiesen. Die Expression von *NCX2* und *NCX3* findet vor allem in Hirn- und Muskelgewebe statt (Komuro et al., 1992; Nicoll et al., 1996; Quednau et al., 1997). Im Gehirn von Ratten wurde *NCX3* hauptsächlich im Hippokampus, im Thalamus, in der Amygdala und im Kleinhirn nachgewiesen (Papa et al., 2003). Bei Untersuchungen der zellulären Lokalisation von *NCX1-3* im Kortex und Hippokampus von Ratten wurden *NCX1-3* in Somata und Dendriten von Neuronen sowie in Astrozyten und endothelialen Zellen nachgewiesen. *NCX2* und *NCX3* wurden häufig im Bereich von Blutgefäßen identifiziert (Minelli et al., 2007). Der Nachweis von *NCX3* im Gehirn, vor allem im Thalamus, könnte ein Hinweis auf eine Beteiligung an der Entstehung des De Morsier Syndroms sein, da Betroffene mit einem De Morsier Syndrom vor allem Fehlbildungen im Mittellinienbereich des Gehirns aufweisen.

Allerdings wurden derartige Fehlbildungen, insbesondere Fehlbildungen im Bereich der Mittellinienstrukturen des Gehirns, oder andere phänotypische Merkmale, die man mit einem De Morsier Syndrom in Verbindung bringen könnte, im Zusammenhang mit *NCX3* bisher nicht beschrieben. Bei homozygoten Knockout-Mäusen für *Ncx3* wurden Nekrosen in

Skelettmuskelfasern sowie eine fehlerhafte neuromuskuläre Übertragung nachgewiesen. Im Vergleich zu nicht manipulierten Mäusen hatten die Knockout-Mäuse insgesamt eine reduzierte muskuläre Aktivität. Sie waren zudem lebensfähig, fertil, normal groß und normal schwer (Sokolow et al., 2004). Hinweise auf eine Beteiligung an der Entstehung eines De Morsier Syndroms liefert diese Beschreibung der Knockout-Mäuse eher nicht. Denn die normale Größe der Knockout-Mäuse spricht zum Beispiel gegen das Vorliegen einer hypophysären Wachstumsstörung, die bei einem De Morsier Syndroms in den meisten Fällen zu finden ist.

Wie in der Einleitung beschrieben existieren Hypothesen über eine vaskuläre Ursache für das De Morsier Syndrom (Lubinsky, 1997; Stevens und Dobyns, 2004). In diesem Zusammenhang ist bekannt, dass NCX3 nach zerebralen Ischämien in seiner Funktion als Ionentransportprotein eine wichtige Rolle spielt. Es wird berichtet, dass die Aktivität von NCX-Proteinen einen positiven protektiven Effekt auf Neurone nach zerebralen Ischämien hat. Das Herunterregeln der Aktivität von NCX-Proteinen dagegen führt zu einer erhöhten fokal neurologisch ischämischen Anfälligkeit (Pignataro et al., 2004a/b). So weisen homozygote Knockout-Mäuse für *Ncx3* nach globalen zerebralen Ischämien höhere neuronale Verluste im Bereich des Hippokampus auf als nicht manipulierte Mäuse (Jeffs et al., 2008). Also spielt NCX3 eine positive Rolle beim Aufrechterhalten der intrazellulären Homöostase des Kalziums nach zerebralen Ischämien und hat einen protektiven Effekt auf die Neurone (Jeffs et al., 2008; Jeffs et al., 2007).

Im Hinblick auf das De Morsier Syndrom wäre es deswegen denkbar, dass Mutationen im *SLC8A3*-Gen und Funktionsstörungen von NCX3 eine vaskuläre Genese während der Embryonalentwicklung begünstigen könnten. Allerdings ist nicht bekannt, ob NCX3 eine Rolle bei der Embryonalentwicklung spielt. So lässt sich letztendlich nur vermuten, dass die Deletion des *SLC8A3*-Gens und ein eventuell damit verbundener Funktionsverlust von NCX3 für die Entstehung eines De Morsier Syndroms bei dem Jungen mit der Translokation t(1;14) ursächlich ist. Aufgrund der bis zum heutigen Zeitpunkt fehlenden Daten lassen sich so nur Vermutungen über eine Beteiligung des *SLC8A3*-Gens an der Genese des De Morsier Syndroms aufstellen.

4.4 Patient mit der Translokation t(1;14) und andere Risikofaktoren

Bei dem in dieser Arbeit untersuchten Patienten mit der Translokation t(1;14) muss man neben eventuell genetischen Ursachen für das De Morsier Syndrom auch andere, nicht genetisch bedingte Risikofaktoren in Betracht ziehen:

Ein beschriebener Risikofaktor für das Auftreten eines De Morsier Syndroms ist das maternale Alter, denn es werden mehr Kinder mit einem De Morsier Syndrom von Müttern

geboren, die signifikant jünger sind als der Durchschnitt (Murray et al., 2004). Das trifft auch für den Patienten mit der Translokation t(1;14) zu, da dessen Mutter bei der Geburt erst achtzehn Jahre alt war. Zudem handelte es sich um die erste Schwangerschaft der Mutter, was als Risikofaktor für Hypoplasien des N. opticus beschrieben wird (Tornqvist et al., 2002). Weitere mögliche Risikofaktoren bei dem Patienten mit der Translokation t(1;14) sind nicht bekannt.

Insgesamt kann hier nur vermutet werden, ob auch einer dieser beiden Risikofaktoren oder ihre Kombination und nicht die Translokation t(1;14) die Ursache für das De Morsier Syndrom sein könnte.

4.5 Fazit

Insgesamt wurden in der vorliegenden Arbeit:

- 1.) Die Bruchpunkte einer Translokation t(1;14) eines Patienten mit einem De Morsier Syndrom mittels FISH eingegrenzt und die Translokation als t(1;14)(p33;q24.2) kartiert.
- 2.) Die Gene *CYP4A22*, *SMOC1* und *SLC8A3* durch die FISH-Analysen als neue mögliche Kandidatengene für das De Morsier Syndrom identifiziert.
- 3.) Eine Deletion im Bereich des *SLC8A3*-Gens in 14q24.2 mittels einer hochauflösenden Microarray-Analyse mit einem Affymetrix GeneChip® Mapping-Array nachgewiesen, die *SLC8A3* eindeutig als neues Kandidatengen für das De Morsier Syndrom identifiziert.

4.6 Ausblick

Die Ergebnisse der in dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen geben Anlass zur Annahme einer Beteiligung des *SLC8A3*-Gens an der Entstehung eines De Morsier Syndroms.

In weiterführenden Arbeiten könnte das *SLC8A3*-Gen bei anderen Patienten mit einem De Morsier Syndrom auf Mutationen untersucht werden. Dafür könnten Sequenzierungen bzw. MLPA-Untersuchungen (MLPA = Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) zum Nachweis größerer Deletionen oder Duplikationen vorgenommen werden. So könnte herausgefunden werden, ob Veränderungen des *SLC8A3*-Gens auch bei anderen Patienten für das Auftreten eines De Morsier Syndroms ursächlich sein können.

Außerdem wären weiterführende Untersuchungen im Hinblick auf die Funktion des *SLC8A3*-Gens und des entsprechenden Proteins während der Embryonalentwicklung von Interesse. Ebenfalls könnte z.B. bei weiteren Untersuchungen von Knockout-Mäusen für das *SLC8A3*-Gen besonders auf Strukturen geachtet werden, die bei dem De Morsier Syndrom verändert sind. So wären bei solchen Untersuchungen die Mittellinienstrukturen des Gehirns, die Nn. optici und die Hypophyse von besonderem Interesse. Veränderungen dieser Strukturen bei Knockout-Mäusen würden weitere Hinweise auf eine Beteiligung des *SLC8A3*-Gens an der Entstehung des De Morsier Syndroms geben.

Es könnten zudem weitere LD-PCRs mit anderen Primern durchgeführt werden. Diese Primer können mit der Kenntnis der Deletion in 14q24.2 gezielter ausgewählt werden. Auf diese Weise könnte versucht werden, die Bruchpunkte der Translokation t(1;14) des Patienten mit dem De Morsier Syndrom eventuell ganz genau zu lokalisieren, um auch *CYP4A22* und *SMOC1* als Kandidatengene weitgehend ausschließen zu können, obwohl Positionseffekte auch hier eine Rolle spielen könnten.

Zurzeit sind die Optikushypoplasie und die Fehlbildungen der Mittellinienstrukturen des Gehirns nicht therapierbar. Die Therapie des hypophysären Hormonmangels erfolgt durch Hormonsubstitution. Es ist beschrieben, dass besonders häufig Patienten mit Auffälligkeiten an Septum pellucidum und/oder hypothalamo-hypophysärer Achse endokrine Problematiken entwickeln (Birkebæk et al., 2003). Zudem wird über Patienten mit einem De Morsier Syndrom berichtet, die im Rahmen eines viralen Infektes an einer adrenalen Krise verstarben (Brodsky et al., 1997). So ist eine frühe Diagnosestellung und eine rechtzeitige Hormonsubstitution essentiell für eine gute Prognose. Die Kenntnis über weitere beteiligte Gene würde die diagnostischen Möglichkeiten verbessern. Ebenso könnte eine rechtzeitige prä- oder postnatale Diagnostik späteren Komplikationen durch den Mangel an hypophysären Hormonen vorbeugen, denn die hormonelle Diagnostik könnte gezielter erfolgen. Des Weiteren könnte die Kenntnis weiterer Kandidatengene zu einem besseren Verständnis der Pathogenese des De Morsier Syndroms führen. Das wiederum könnte zukünftig vielleicht helfen, einen besseren Therapieansatz zu finden.

5. Zusammenfassung

Das De Morsier Syndrom ist ein kongenitales Fehlbildungssyndrom, dessen Phänotyp sich durch eine hohe Variabilität auszeichnet. Typisch für das De Morsier Syndrom sind Fehlbildungen im Mittellinienbereich des Gehirns, eine Hypoplasie oder Dysplasie der Sehnerven und Fehlbildungen der Hypophyse sowie ein Mangel an hypophysären Hormonen.

Die Ätiologie des De Morsier Syndroms ist bis heute nicht vollständig geklärt. So wird eine multifaktorielle Genese angenommen, die sowohl von Umweltfaktoren als auch von genetischen Faktoren beeinflusst wird. Während das De Morsier Syndrom in den meisten Fällen scheinbar sporadisch auftritt, sind seltene Fälle mit familiärem Auftreten bekannt. Bei einigen dieser Fälle konnten Mutationen in wenigen Genen nachgewiesen werden (meist: Homöobox-Gen *HESX1*). Da allerdings nur in seltenen Fällen solche Mutationen nachgewiesen werden konnten, ist anzunehmen, dass es noch weitere Gene gibt, die an der Entstehung eines De Morsier Syndroms beteiligt sind. Für die Identifizierung solcher Krankheitsgene eignen sich Patienten mit *de novo* aufgetretenen strukturellen Chromosomenaberrationen.

In dieser Arbeit wurde eine *de novo* Translokation t(1;14) bei einem Jungen mit einem De Morsier Syndrom sowohl mit molekularzytogenetischen als auch mit molekulargenetischen Methoden charakterisiert. Bei dem Jungen liegen die für das De Morsier Syndrom typischen Fehlbildungen aber keine Mutation des *HESX1*-Gens vor: eine Optikushypoplasie, eine Hypoplasie des Corpus callosum sowie eine Agenesie des Septum pellucidum und Fehlbildungen der Hypophyse mit begleitendem Mangel an hypophysären Hormonen. Ziele dieser Arbeit waren das Ausschließen möglicher submikroskopischer Deletionen und Duplikationen im Patientengenom als Ursache für das De Morsier Syndrom, eine Kartierung der Bruchpunkte der Translokation t(1;14) sowie die Identifizierung neuer Kandidatengene für das De Morsier Syndrom.

Mit Hilfe einer Array-CGH konnte das Vorliegen von Deletionen oder Duplikationen im Genom des Patienten mit der Translokation t(1;14) bei einer Auflösung von 0,1 Mb ausgeschlossen werden. Die Translokation t(1;14) konnte durch umfangreiche FISH-Untersuchungen mit 25 BAC- und 14 Fosmid-Sonden als t(1;14)(p33;q24.2) charakterisiert werden. Durch über 180 LD-PCRs mit insgesamt 21 Primern konnten die Bruchpunkte allerdings nicht kloniert werden, was durch die Ergebnisse einer später durchgeführten GeneChip-Analyse erklärt werden kann. Anhand der Ergebnisse der FISH-Untersuchungen gelang es, drei neue mögliche Kandidatengene für das De Morsier Syndrom zu identifizieren: *CYP4A22* in 1p33 sowie *SMOC1* und *SLC8A3* in 14q24.2. Mittels einer hochauflösenden GeneChip-Analyse konnte eine ca. 10-15 kb große Deletion im Bereich des *SLC8A3*-Gens im Bruchpunktbereich der Translokation in 14q24.2 nachgewiesen werden. Diese identifiziert

SLC8A3 eindeutig als neues Kandidatengen für das De Morsier Syndrom. Anhand der heutigen Kenntnisse über die Funktion von *SLC8A3* ist es allerdings zu diesem Zeitpunkt weder möglich, einen Zusammenhang mit dem De Morsier Syndrom herzustellen noch auszuschließen. Die Identifizierung von *SLC8A3* als neues Kandidatengen für das De Morsier Syndrom würde am ehesten die Hypothese einer vaskulären Genese des De Morsier Syndroms während der Embryonalentwicklung stützen. Allerdings wären weitere Untersuchungen des *SLC8A3*-Gens bei anderen Betroffenen mit einem De Morsier Syndrom und weitere Analysen im Hinblick auf die Funktionen von *SLC8A3* nötig.

6. Literaturverzeichnis

Acers TE (1981): Optic nerve hypoplasia: septo-optic-pituitary dysplasia syndrome. *Trans Am Ophthalmol Soc.* 79: 425-457

Arslanian SA; Rothfus WE; Foley Jr TP; Becker DJ (1984): Hormonal, metabolic, and neuroradiologic abnormalities associated with septo-optic dysplasia. *Acta Endocrinol (Copenh).*107(2): 282-288

Barkovich AJ; Norman D (1989): Absence of the septum pellucidum: a useful sign in the diagnosis of congenital brain malformations. *Am J Roentgenolog.* 152(2): 353-360

Bellamine A; Wang Y; Waterman MR; Gainer JV; Dawson EP; Brown NJ; Capdevila JH (2003): Characterization of the CYP4A11 gene, a second CYP4A gene in humans. *Arch Biochem Biophys.* 409(1): 221-227

Birkebæk NH; Patel L; Wright NB; Grigg JR; Sinha S; Hall CM; Price DA; Lloyd IC; Clayton PE (2003): Endocrine status in patients with optic nerve hypoplasia: relationship to midline central nervous system abnormalities and appearance of the hypothalamic-pituitary axis on magnetic resonance imaging. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(11): 5281-5286

Boon K; Edwards JB; Eberhart CG; Riggins GJ (2004): Identification of astrocytoma associated genes including cell surface markers. *BMC Cancer* 4: 39

Brandt I (1986): *Human Growth. A Comprehensive Treatise.* 2. Ed. Vol. 1. Hrsg. F. Falkner und J. M. Tanner, Plenum Press. New York

Brickmann JM; Clements M; Tyrell R; McNay D; Woods K; Warner J; Stewart A; Beddington RS; Dattani M (2001): Molecular effects of novel mutations in *Hesx1/HESX1* associated with human pituitary disorders. *Development* 128(24): 5189-5199

Brodsky MC; Glasier CM (1993): Optic nerve hypoplasia. Clinical significance of associated central nervous system abnormalities on magnetic resonance imaging. *Arch Ophthalmol.* 111(1): 66-74

Brodsky MC; Conte FA; Taylor D; Hoyt CS; Mrak RE (1997): Sudden death in septo-optic dysplasia. Report of 5 cases. *Arch Ophthalmol.* 115(1): 66-70

Brook CG; Sanders MD; Hoare RD (1972): Septo-optic dysplasia. *Br Med J.* 3(5830): 811-813

Capdevila JH; Falck JR; Harris RC (2000): Cytochrome P450 and arachidonic acid bioactivation: molecular und functional properties of the arachidonate monooxygenase. *J Lipid Res.* 41(2): 163-181

Capdevila J; Chacos N; Werringloer J; Prough RA; Estabrook RW (1981): Liver microsomal cytochrome P-450 and the oxidative metabolism of arachidonic acid. *Proc Natl Acad Sci USA.* 78(9): 5362-5366

Carvalho LR; Woods KS; Mendonca BB; Marcal N; Zamparini AL; Stifani S; Brickman JM; Arnhold IJ; Dattani MT (2003): A homozygous mutation in *HESX1* is associated with evolving hypopituitarism due to impaired repressor-corepressor interaction. *J Clin Invest.* 112(8): 1192-1201

- Chou SJ; Hermes E; Hatta T; Feltner D; El-Hodiri HM; Jamrich M; Mahon K (2006): Conserved regulatory elements establish the dynamic expression of Rpx/Hesx1 in early vertebrate development. *Dev Bio.* 292(2): 533-545
- Cohen RN; Cohen LE; Botero D; Yu C; Sagar A; Jurkiewicz A; Radovick S (2003): Enhanced repression by HESX1 as a cause of hypopituitarism and septo-optic dysplasia. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(10): 4832-4839
- Coya R; Vela A; Pérez de Nanclares G; Rica I; Castaño L; Busturia MA; Martul P (2007): Panhypopituitarism: genetic versus acquired etiological factors. *J Pediatr Endocrinol Metab.* 20(1): 27-36
- Dasen JS; Martinez-Barbera JP; Herman TS; O'Connell S; Olson L; Ju B; Tollkuhn J; Baek SH; Rose DW; Rosenfeld MG (2001): Temporal regulation of a paired-like homeodomain repressor/TLE corepressor complex and a related activator is required for pituitary organogenesis. *Genes Dev.* 15(23): 3193-3207
- Dattani MT; Martinez-Barbera JP; Thomas PQ; Brickman JM; Gupta R; Mårtensson IL, Toresson H; Fox M; Wales JK; Hindmarsh PC; Krauss S; Beddington RS; Robinson IC (1998): Mutations in the homeobox gene HESX1/Hesx1 associated with septo-optic dysplasia in human and mouse. *Nat Genet.* 19(2): 125-133
- Dattani MT (2001): Septo-optic dysplasia: From mouse to man. *Clin Pediatr Endocrinol.* 10(1): 89-95
- De Morsier G (1956) : Études sur les dysraphies crânio-encéphaliques III. Agénésie du septum lucidum avec malformation du tractus optique. La dysplasie septo-optique. *Schweiz Arch Neurol Psychiatr.* 77(1-2): 267-292
- De Smedt S; Demaerel P; Casaer P; Casteels I (2000): Septo-optic dysplasia in combination with pigmented skin lesion: a case report with nosological discussion. *Eur J Paediatr Neurol.* 4(4): 189-193
- Donahue SP; Lavina A; Najjar J (2005): Infantile infection and diabetes insipidus in children with optic nerve hypoplasia. *Br J Ophthalmol.* 89(10): 1275-1277
- Eickbush TH (2002): Repair by retrotransposition. *Nat Genet.* 31(2): 126-127
- Gabellini N; Bortoluzzi S; Danieli GA; Carafoli E (2002): The human SLC8A3 gene and the tissue-specific Na⁺/Ca²⁺ exchanger 3 isoforms. *Gene* 298(1): 1-7
- Gainer JV; Bellamine A; Dawson EP; Womble KE; Grant SW; Wang Y; Cupples A; Guo CY; Demissie S; O'Donnell CJ; Brown NJ; Waterman MR; Capdevila JH (2005): Functional variant of CYP4A11 20-hydroxyecosatetraenoic acid synthase is associated with essential hypertension. *Circulation* 111(1): 63-69
- Gersdorff N; Müller M; Schall A; Miosge N (2006): Secreted modular calcium-binding protein-1 localization during mouse embryogenesis. *Histochem Cell Biol.* 126(6): 705-712
- Harrison IM; Brosnahan D; Phelan E; Fitzgerald RJ; Reardon W (2004): Septo-optic dysplasia with digital anomalies – a recurrent pattern syndrome. *Am J Med Genet A.* 131(1): 82-85

- Hermesz E; Mackem S; Mahon KA (1996): Rpx: a novel anterior-restricted homeobox gene progressively activated in the prechordal plate, anterior neural plate and Rathke's pouch of the mouse embryo. *Development* 122(1): 41-52
- Hermesz E; Williams-Simons L; Mahon KA (2003): A novel inducible element, activated by contact with Rathke's pouch, is present in the regulatory region of the Rpx/Hesx1 homeobox gene. *Dev Biol.* 260(1): 68-78
- Hiratsuka M; Nozawa H; Katsumoto; Moteki T; Sasaki T; Konno Y; Mizugaki M (2006): Genetic polymorphisms and haplotype structures of the CYP4A22 gene in a Japanese population. *Mutat Res.* 599(1-2): 98-104
- Jeffs G; Meloni BP; Bakker AJ; Knuckey NW (2007): The role of the Na(+)/Ca(2+) exchanger (NCX) in neurons following ischaemia. *J Clin Neurosci.* 14(6): 507-514
- Jeffs G; Meloni BP; Sokolow S; Herchuelz A; Schurmans S; Knuckey NW (2008): NCX3 knockout mice exhibit increased hippocampal CA1 and CA2 neuronal damage compared to wild-type mice following global cerebral ischemia. *Exp Neurol.* 210(1): 268-273
- Kawashima H; Kusunose E; Kikuta Y; Kinoshita H; Tanaka S; Yamamoto S; Kishimoto T; Kusunose M (1994): Purification and cDNA cloning of human liver CYP4A fatty acid ω -hydroxylase. *J Biochem.* 116(1): 74-80
- Kelberman D; Rizzoti K.; Avilion A; Bitner-Glindzicz M; Cianfarani S; Collins J; Chong WK; Kirk JM; Aschermann JC; Ross R; Carmingnac D; Lovell-Badge R; Robinson IC; Dattani MT (2006): Mutations within Sox2/SOX2 are associated with abnormalities in the hypothalamo-pituitary-gonadal axis in mice and humans. *J Clin Invest.* 116(9): 2442-2455
- Kelberman D; Dattani MT (2007a): Genetics of septo-optic dysplasia. *Pituitary* 10(4): 393-407
- Kelberman D; Dattani MT (2007b): Hypothalamic and pituitary development: novel insights in the aetiology. *Eur J Endocrinol.* 157(1): 3-14
- Komuro I; Wenninger KE; Philipson KD; Izumo S (1992): Molecular cloning and characterization of the human cardiac Na⁺/Ca²⁺ exchanger cDNA. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89(10): 4769-4773
- Lane TF; Sage EH (1994): The biology of SPARC, a protein that modulates cell-matrix interactions. *FASEB J.* 8(2): 163-173
- Lubinsky MS (1997): Hypothesis: septo-optic dysplasia is a vascular disruption sequence. *Am J Med Genet.* 69(3): 235-236
- McNay DE; Turton JP; Kelberman D; Woods KS; Brauner R; Papadimitriou A; Keller E; Keller A; Haufs N; Krude H; Shalet SM; Dattani MT (2006): HESX1 mutations are an uncommon cause of septo-optic dysplasia and hypopituitarism. *J Clin Endocrinol Met.* 92(2): 691-697
- Melo ME; Marui S; Carvalho LR; Arnhold IJ; Leite CC; Mendonça BB; Knoepfelmacher M (2007): Hormonal, pituitary magnetic resonance, LHX4 and HESX1 evaluation in patients with hypopituitarism and ectopic posterior pituitary lobe. *Clin Endocrinol (Oxf).* 66(1): 95-102
- Miller SP; Shevell MI; Patenaude Y; Poulin C; O`Gorman AM (2000): Septo-optic dysplasia plus: a spectrum of malformations of cortical development. *Neurology* 54(8):1701-1703

- Minelli A; Castaldo P; Gobbi P; Salucci S; Magi S; Amoroso A (2007): Cellular and subcellular localization of Na⁺-Ca²⁺ exchanger protein isoforms, NCX1, NCX2, and NCX3 in cerebral cortex and hippocampus of adult rat. *Cell Calcium*. 41(3): 221-234
- Mitchell LA; Thomas PQ; Zacharin MR; Scheffer IE (2002): Ectopic posterior pituitary lobe and periventricular heterotopia: cerebral malformations with the same underlying mechanism? *Am J Neuroradiol*. 23(9): 1475-1481
- Morishima A; Aranoff GS (1986): Syndrome of septo-optic-pituitary dysplasia: the clinical spectrum. *Brain Dev*. 8(3): 233-239
- Morrish TA; Gilbert N; Myers JS; Vincent BJ; Stamato TD; Taccioli GE; Batzer MA; Moran JV (2002): DNA repair mediated by endonuclease-independent LINE-1 retrotransposition. *Nat Genet*. 31(2): 126-127
- Murray PG; Paterson WF; Donaldson MD (2005): Maternal age in patients with septo-optic dysplasia. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 18(5): 471-476
- Nicoll DA; Quednau BD; Qui Z; Xia YR; Lusic AJ; Philipson KD (1996): Cloning of a third mammalian Na⁺-Ca²⁺ exchanger, NCX3. *J Biol Chem*. 271(40): 24914-24921
- Orrico A; Galli L; Zappella M; Monti L; Vatti GP; Venturi C; Hayek G (2002): Septo-optic dysplasia with digital anomalies associated with maternal multidrug abuse during pregnancy. *Euro J Neurol*. 9(6): 679-682
- Ostertag EM; Kazazian HH (2001): Biology of mammalian L1 retrotransposons. *Annu Rev Genet*. 35: 501-538
- Palmer CN; Richardson TH; Griffin KJ; Hsu MH; Muerhoff AS; Clark JE; Johnson EF (1993): Characterization of a cDNA encoding a human kidney, cytochrome P-450 fatty acid ω -hydroxylase and the cognate enzyme expressed in *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*. 1172(1-2): 161-166
- Papa M; Canitano A; Boscia F; Castaldo P; Sellitti S.; Porzig H; Tagliatela M; Annunziato L (2003): Differential expression of the Na⁺-Ca²⁺ exchanger transcripts and proteins in rat brain regions. *J Comp Neurol*. 461(1): 31-48
- Patel L; McNally RJ; Harrison E; Lloyd IC; Clayton PE (2006): Geographical distribution of optic nerve hypoplasia and septo-optic dysplasia in Northwest England. *J Pediatr*. 148(1): 85-88
- Pignataro G; Tortiglione A; Scorziello A; Giaccio L; Secondo A; Severino B; Santagada V; Caliendo G; Amoroso S; Di Renzo G; Annunziato L (2004a): Evidence for a protective role played by the Na⁺/Ca²⁺ exchanger in cerebral ischemia induced by middle cerebral artery occlusion in male rats. *Neuropharmacology* 46(3): 439-448
- Pignataro G; Gala R; Cuomo O; Tortiglione A; Giaccio L; Castaldo P; Sirabella R; Matrone C; Canitano A; Amoroso S; Di Renzo G; Annunziato L (2004b): Two sodium/calcium exchanger gene products, NCX1 und NCX3, play a major role in the development of permanent focal cerebral ischemia. *Stroke* 35(11): 2566-2570
- Polizzi A; Pavone P; Iannetti P; Manfré L; Ruggieri M (2006): Septo-optic dysplasia complex: a heterogeneous malformation syndrome. *Pediatr Neurol*. 34(1): 66-71

- Quednau BD; Nicoll DA; Philipson KD (1997): Tissue specificity and alternative splicing of the Na⁺/Ca²⁺ exchanger isoforms NCX1, NCX2, and NCX3 in rat. *Am J Physiol.* 272(4):1250-1261
- Rainbow LA; Rees SA; Shaikh MG; Shaw NJ; Cole T; Barrett TG; Kirk JM (2005): Mutation analysis of POUF-1, PROP-1 and HESX-1 show low frequency of mutations in children with sporadic forms of combined pituitary hormone deficiency and septo-optic dysplasia. *Clin Endocrinol (Oxf)*. 62(2): 163-168
- Reeves DL (1941): Congenital absence of the septum pellucidum. *Bull Johns Hopkins Hosp.* 69: 61-71
- Roessmann U; Velasco ME; Small EJ; Hori A (1987): Neuropathology of "septo-optic dysplasia" (de Morsier syndrome) with immunohistochemical studies of the hypothalamus and pituitary gland. *J Neuropathol Exp Neurol.* 46(5): 597-608
- Sassaman DM; Dombrowski BA; Moran JV; Kimberland ML; Naas TP; DeBerardinis RJ; Gabriel A; Swergold GD; Kazazian HH (1997): Many human L1 elements are capable of retrotransposition. *Nat Genet.* 16(1): 37-43
- Schuelke M; Krude H; Finckh B; Mayatepek E; Janssen A; Schmelz M; Trefz F; Trijbels F; Smeitink J (2002): Septo-optic dysplasia associated with a new mitochondrial cytochrome b mutation. *Ann Neurol.* 51(3): 388-392
- Sobrier NL; Netchine I; Heinrichs C; Thibaud N; Vié-Luton MP; Van Vliet G; Amselem S (2005): Alu-element insertion in the homeodomain of HESX1 and aplasia of the anterior pituitary. *Hum Mutat.* 25(5): 503-511
- Sobrier ML; Maghnie M; Vie-Luton MP; Secco A; di Iorgi N; Lorini R; Amselem S (2006): Novel HESX1 mutations associated with a life-threatening neonatal phenotype, pituitary aplasia, but normally located posterior pituitary and no optic nerve abnormalities. *J Clin Endocrinol Metab.* 91(11): 4528-4536
- Sokolow S; Manto M; Gailly P; Molgó J; Vandebrouck C; Vanderwinden JM; Herchuelz A; Schurmans S (2004): Impaired neuromuscular transmission and skeletal muscle fiber necrosis in mice lacking Na/Ca exchanger 3. *J Clin Invest.* 113(2): 265-273
- Stangel M; Vogeley KT; Jandek C; Boegner F; Marx P; Koch HC (1998): Septootische Dysplasie (de-Morsier-Syndrom). *Nervenarzt* 69(4): 352-356
- Stevens CA; Dobyns WB (2004): Septo-optic dysplasia and amniotic bands: further evidence for a vascular pathogenesis. *Am J Med Genet A.* 125(1): 12-16
- Tajima T; Hattorri T; Nakajima T; Okuhara K; Sato K; Abe S; Nakae J; Fujieda K (2003): Sporadic heterozygous frameshift mutation of HESX1 causing pituitary and optic nerve hypoplasia and combined pituitary hormone deficiency in a Japanese patient. *J Clin Endocrinol Metab.* 88(1): 45-50
- Thomas PQ; Johnson BV; Rathjen J; Rathjen PD (1995): Sequence, genomic organization, and expression of the novel homeobox gene *Hesx1*. *J Biol Chem.* 270(8): 3869-3875
- Thomas PQ; Beddington R (1996): Anterior primitive endoderm may be responsible for patterning the anterior neural plate in the mouse embryo. *Curr Biol.* 6(11): 1487-1496

Thomas PQ; Dattani MT; Brickman JM; McNay D; Warne G; Zacharin M; Cameron F; Hurst J; Woods K; Dunger D; Stanhope R; Forrest S; Robinson IC; Beddington RS (2001): Heterozygous HESX1 mutations associated with isolated congenital pituitary hypoplasia and septo-optic dysplasia. *Hum Mol Genet.* 10(1): 39-45

Tönnies H (2002): Modern molecular cytogenetic techniques in genetic diagnostics. *Trends Mol Med.* 8(6): 246-250

Tornqvist K; Ericsson A; Källén B (2002): Optic nerve hypoplasia: risk factors and epidemiology. *Acta Ophthalmol Scand.* 80(3): 300-304

Vannahme C; Smyth N; Miosge N; Gösling S; Frie C; Paulsson M; Maurer P; Hartmann U (2002): Characterization of SMOC-1, a novel modular calcium-binding protein in basement membranes. *J Biol Chem.* 277(41): 37977-37986

Willnow S; Kiess W; Butenandt O; Dorr HG; Enders A; Strasser-Vogel B; Egger J; Schwarz HP (1996): Endocrine disorders in septo-optic dysplasia (De Morsier syndrome) – evaluation and follow-up of 18 patients. *Eur J Pediatr.* 155(3): 179-184

Woods KS; Cundall M; Turton J; Rizotti K; Mehta A; Palmer R; Wong J; Chong WK; Al-Zyoud M; El-Ali M; Otonkoski T; Martinez-Barbera JB; Thomas PQ; Robinson IC; Lovell-Badge R; Woodward KJ; Dattani MT (2005): Over- and underdosage of SOX3 is associated with infundibular hypoplasia and hypopituitarism. *Am J Hum Genet.* 76(5): 833-849

7. Anhang

7.1 Übersicht der Lage einzelner Oligonukleotide bei der Array-CGH

Tabelle 13: Darstellung der außerhalb der festgelegten Log2 Ratio von |0,5| liegenden Oligonukleotide im Bereich des später eingegrenzten Bruchpunktes auf Chromosom 1

| Bezeichnung in der Abbildung 15/Bemerkung | Name des Markers (Oligonukleotid) | Lage in Bezug auf das später eingegrenzte Kandidatengen | Start (telomerisch in 1p) | Stop (centromerisch in 1p) |
|--|-----------------------------------|---|---------------------------|----------------------------|
| a | A_16_P15108816 | CYP4A22 (Lage in 1p: 47315127- 47326546) | 47318138 | 47318197 |
| b | A_16_P00059224 | --- | 47307427 | 47307486 |
| c / nicht als signifikant gewertet, schwarzer Punkt, Lage zwischen b und d | A_16_P35115589 | --- | 47302895 | 47302954 |
| d | A_16_P00059216 | CYP4Z1 (kein Kandidatengen) | 47290689 | 47290748 |

Erstellt mit der Datenbank des Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> Version: Mai 2004)

Tabelle 14: Darstellung der außerhalb der festgelegten Log2 Ratio von |0,5| liegenden Oligonukleotide im Bereich des später eingegrenzten Bruchpunktes auf Chromosom 14

| Bezeichnung in der Abbildung 16/ Bemerkung | Name des Markers (Oligonukleotid) | Lage in Bezug auf die später eingegrenzten Kandidatengene | Start (centromerisch in 14q) | Stop (telomerisch in 14q) |
|--|-----------------------------------|---|------------------------------|---------------------------|
| a | A_16_P20086754 | SLC8A3 (Lage in 14q: 69580687- 69725540) | 69581247 | 69581306 |
| b | A_16_P40230996 | --- | 69575323 | 69575382 |

Erstellt mit der Datenbank des Human Genome Browser Gateway (<http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway> Version: Mai 2004)

7.2 Signalkonstellationen der Fosmid-Sonden

Tabelle 15: Signale und Lage der Fosmid-Sonden nach Hybridisierung mit den Metaphasen des Patienten mit der Translokation t(1;14)

| Sondenkombination und Markierung | Signale nach Hybridisierung | Lage der Fosmide beim t(1;14)-Fall | Anmerkungen |
|-----------------------------------|--|---|---|
| 2774I12 so 2163C20 sgr | 1x Co R/G auf Chr.14 1x R auf der (14) <u>1x Split:</u> starkes, grünes Signal auf der (1), fragliches, schwaches, grünes Restsignal auf der (14) | 2774I12 – der (14) 2163C20 – Split, kleines Restsignal auf der (14), größeres Signal auf der (1) | Split in 2163C20 kaum erkennbar, daher: Hybridisierung mit 1035A15 so (Abb. 11B) |
| 1035A15 so 2163C20 sgr | 1x Co R/G auf Chr.14 1x R auf der (14) <u>1x Split:</u> sehr kleines, grünes Restsignal auf der (14) | 1035A15 – der (14) 2163C20 – Split, kleines Restsignal auf der (14), größeres Signal auf der (1) | Split in 2163C20 bei dieser Sondenkombination deutlicher zu erkennen (Abb. 11A) |
| 2774I12 so 746G16 sgr | 1x Co R/G auf Chr.14 1x R auf der (14) <u>1x Split:</u> grüne Signale auf der (1) und der (14) | 2774I12 – der (14) 746G16 – Split, Signale auf der (1) und der (14) | keine (Abb. 10A) |
| 3231L8 so 1019H13 sgr | 1x Co R/G auf Chr.14 1x R auf der (14) 1x G auf der (1) | 3231L8 – der (14) 1019H13 – der (1) | grünes Signal nur schwach erkennbar |
| 59207 so 2110O6 sgr | 1x Co R/G auf Chr. 1 1x G auf der (1) <u>1x Split:</u> eventuell kleines, rotes Restsignal auf der (14), größeres, rotes Signal auf der (1) | 2110O6 – der (1) 59207 – Split fraglich, in dieser Hybridisierung und in den Wiederholungen auch nicht eindeutig zu erkennen | Split in 59207 nicht eindeutig erkennbar, daher: Hybridisierung mit 746G16 (eindeutiger Split, siehe unten) |
| 59207 so 746G16 sgr | 1x R auf Chr.1 1x G auf Chr.14 <u>2x Split:</u> Split im roten und im grünen Signal: 1x Co R/G auf der 1, 1x Co R/G auf der (14), kleines rotes Restsignal auf der (14) | 59207 – Split, kleineres Restsignal auf der (14) 746G16 – Split, Signale auf der (1) und der (14) | Split in 59207 bei dieser Sondenkombination eindeutig zu erkennen (Abb. 8A) |
| 1697K16 so 759H6 sgr | 1x Co R/G auf Chr.1 1x R auf der (14) 1x G auf der (1) | 1697K16 – der (14) 759H6 – der (1) | Signale von 1697K16 auf der (14) eventuell kleiner als auf unverändertem Chr.1 (Abb. 9A u. 9B) |
| 2353C20 so 2655E24 sgr | 1x Co R/G auf Chr.1 1x R auf der (14) 1x G auf der (1) 2x G | 2353C20 – der (14) 2655E24 – der (1) | Es wurden insgesamt nur 7 Meta- und keine Interphasen ausgewertet, weil die Sonde 2655E24 chimär ist. |
| 1691F22 so 680P3 sgr | 1x Co R/G auf Chr.1 1x R auf der (14) 1x G auf der (1) | 1691F22 – der (14) 680P3 – der (1) | Signale von 1691F22 auf der (14) eventuell kleiner als auf unverändertem Chr.1 |

so= spectrum orange; sgr= spectrum green; R= rotes Signal; G= grünes Signal; Co= Colokalisation (beide Sonden liegen direkt nebeneinander, so dass ein rot/grünes Signal (R/G) zu erkennen ist); Split= Bruch in einem Signal; Chr.1= Chromosom 1; Chr.14= Chromosom 14; der (1)= derivatives Chromosom 1; der (14)= derivatives Chromosom 14; Insgesamt wurden immer 100 Interphasen und möglichst viele Metaphasen ausgewertet (Ausnahme: Die Sondenkombination 2353C20 und 2655E24). Auf die Bezeichnung „WI2-“ vor den Fosmid-Sonden wurde aus Gründen der Übersichtlichkeit in dieser Tabelle verzichtet.

7.3 Ergebnisse der LD-PCRs mit den verschiedenen Primerkombinationen

| Chr.14 | 4488 | 4741 | 4489 | 4742 | 4490 | 4743 | 4491 | 4744 | 4492 | 4745 | 4493 | 4746 | 4494 |
|-------------------|-------------------------------------|------------|-------------------------------------|---|-----------------------|------------|------------------|------------|---|--|-----------|---|----------------------------|
| Chr.1 | C14_26653r | C14_24942r | C14_22197r | C14_20238r | C14_18253r | C14_16261r | C14_14035r | C14_12331r | C14_10165r | C14_8107r | C14_6143r | C14_4273r | C14_2229r |
| 4495 C1_15167r | schwache Banden, nicht wiederholbar | x | schwache Banden, nicht wiederholbar | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 4496 C1_13115r | x | x | x | Bande, ca. 400 bp, nicht wiederholbar, Sequenz nicht lesbar | x | x | x | x | x | x | x | bei PCR aus PCR: versch. Banden (400-1000 bp), Sequenzen nicht lesbar | x |
| 4497 C1_11160r | schwache Banden, nicht wiederholbar | x | Sequenz 1 | x | x | x | x | x | x | bei PCR aus PCR: schwache Banden, Sequenzen nicht lesbar | x | Sequenz 2 | viele unspezifische Banden |
| 4498 C1_9064r | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | Sequenz 3 |
| 4499 C1_7028r | x | x | x | x | x | x | x | x | Sequenz 4 | x | x | Banden (zw. 200-1000 bp), Sequenzen nicht lesbar | x |
| 4500 C1_5111r | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | bei PCR aus PCR: viele, unspezifische Banden | x |
| 4501 C1_3045r | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x | x |
| 4502 C1_1185r | viele schwache Banden | x | viele schwache Banden | x | viele schwache Banden | x | Sequenz 5 | x | Bande (ca. 1000 bp), bei versch. Bedingungen nicht wiederholbar | x | x | nach PCR aus PCR: Klonierung: Sequenz 6 | x |

Tabelle 16: C1= Chromosom 1 (Chr.1); C14= Chromosom 14 (Chr.14); r= Rückwärtsprimer; bp= Basenpaare (die ungefähren Längenangaben der PCR-Produkte wurden anhand des verwendeten Standards abgeschätzt); versch. = verschieden; Sequenz 1-6: siehe Auswertung der Sequenzen (7.4).

7.4 Darstellung der Auswertung der Sequenzen

Tabelle 17: Sequenzen 1-6 aus den Produkten der LD-PCRs und Ergebnisse nach Auswertung mit der Datenbank des Human Genome Browser Gateway

| Nummer | Primerpaar | Sequenzierung mit Primer: | lesbare Sequenz | Auswertung |
|--------|------------|---|---|---|
| 1 | 4497/4489 | 4489 (Chr.14), direkt aus dem PCR-Produkt sequenziert, Sequenz nur mit einem Primer lesbar | tccttggcttt ACTCCAGCTTCCTTGGCT TTactccagcttccttggctttactccac cgcttccttggctttactccagcttcctt ggctttactccagcttccttggctttact ccagcttccttggctttactccagcttcct ttggctttactccagcttccttggcttta ctccagcttccttggctttactccagctt accttggctgtactaaagctacctggctt | Diese Sequenz liegt in 14q24.2 und entspricht genau dem Primer der PCR (siehe schwarze Markierung in der Sequenz), <u>Sequenz des Primers: 5'ACTCCAGCTTCCTTGGCTTT3'</u> Die Amplifikation ist unspezifisch und der Primer liegt inmitten von T-Repeats. |
| 2 | 4497/4746 | 4497 (Chr.1), direkt aus dem PCR-Produkt sequenziert, Sequenz nur mit einem Primer lesbar | tttagaatagtttcagaggaacggtacca gctcctcttgtactctgttagaattca actgtgaatccatctggctcctggctttt tttggttgatagctattaactgctcct caatttcagaactgttatcaatctattc aggggattcaactctctcctggcttcgct tttggagggtgatatagtccaggaattta tccatttttctagattttctagttagat ttgcatagagggttcttagtattctctga tggaaagtttgatttctgggggac | Hierbei handelt es sich um ein LINE (<u>L</u> ong <u>I</u> nterspersed <u>N</u> ucleotide <u>E</u> lement), das es auf allen Chromosomen gibt. (Abbildung 20) |
| 3 | 4498/4494 | 4498 (Chr.1), Sequenz aus ausgeschnittener Bande, Sequenz nur mit einem Primer lesbar | ttcttagcttccttgcattgggttagaac atgctccttagcttggaggagttagtta ttaccacacctctgaagcctactctgtc aattcgtcaaaactcattctccatccaggt ttgttccttgcctggcaaggagctgtgat ccttggaggacaacaggcattctggctt ttggaattttcagccttttggcctgggt ctcccatctttgtggatgtgtctacct ctgtatttgatgttgggacacctccgat ggggtcttgagtggatgtgacctcctt tatgttagtagtttccctctaacagaac aagccctctgctgcaagtctgctggagt ttgcaagaggtccactccagacctgtg cctgggatcaccagcgggaagctgcacaac agcaaaaactgctgctgttttccctctgga agcttcgtccaga | Bei dieser Sequenz zeigt die Blat-Funktion der Datenbank des Human Genome Browser Gateway erneut ein LINE (<u>L</u> ong <u>I</u> nterspersed <u>N</u> ucleotide <u>E</u> lement) auf den verschiedensten Chromosomen an. |
| 4 | 4499/4492 | 4492 (Chr.14), Sequenz aus ausgeschnittener DNA-Bande 4499 (Chr.1), Sequenz aus ausgeschnittener DNA-Bande | tctcaaaggcacaagggttaagcatgaca cggcacagtcaggaatggcagcagtaag catggctaggatagaggccaagaggaagg ctaagggttaagtggatcctacctgtggcc ccactgtgacctctgctgaggtttagaag gtgtctgcagtagggtcctgggcttaaac ttatggcctaaaattggggctgataaagca gcatcaggaacacaatctcctaccatgga ggctaagaacaagatgtcaatggaatttt gtgagtgaacaggattagcacaagca ggcagggaaaatgggtggactaaaagcct cattcag gacatgctccaagagaatggattgttagt gggggcatctaactagtaaccagggttc agaattcctgggatgaattcctcaattct cctcctatggttcattccagcttctgttt tgacaaagcctaacacctggataaccag aaaggactcagaaaatgggagcgatgatg gacacaaatggattttggatatttggat tttgcactaccatttaatctgctaaaag gtttttt | Beide Sequenzen liegen in 14q24.2, was daran liegt, dass ein Teil der Sequenz in 14q24.2 in 5'-Richtung vom Rückwärtsstrang entfernt eine Homologie mit dem Primer 4499 aufweist. (Abbildung 19). Das könnte bedeuten, dass in diesem Fall ungewollt ein Rückwärtsprimer und ein zweiter Rückwärtsprimer, der wie ein Vorwärtsprimer wirken kann, für diese Reaktion eingesetzt wurden. Das erklärt auch, dass die Sequenz sowohl mit dem einen als auch mit dem anderen Primer von Chromosom 14 stammt. Allerdings war die Kontrolle mit der DNA eines gesunden Probanden aus ungeklärten Gründen negativ. |
| 5 | 4502/4491 | 4491 (Chr.14), Sequenz aus ausgeschnittener DNA-Bande, Sequenz nur mit einem Primer lesbar | ctcgccctaggacccaagagccaacttt agcatgttgttttacctcccgggagtct gcactctagagtgaccagacaggggacg gggaccagttatttcttgcatttatctg tgactgggagcaatcctcattatactg ccttgtgagacattctccaagctcccagc aaaagcacaggctcatgagcaggacagcat tgcacctgctggaacaaaagaatgtcag | Hierbei handelt es sich um eine unspezifische Amplifikation auf Chromosom 20. |

Fortsetzung Tabelle 17

| | | | | |
|---|-----------|---|---|--|
| | | | agctagaaggagccttgaacatctggat ccagggggccattcgggggctagacaggct agacagacattatagatgcaatggggaaa accctcccc | |
| 6 | 4502/4746 | 4502 (Chr.1), Sequenz nach Klonierung, lesbar mit dem vektorspezifischen Primer 461 Die Sequenz mit dem Primer 4746 ist nicht im einzelnen aufge- führt, da auch sie ein unspezifisches Ergebnis zeigt. | tggtgggttagggaaaggatagtgaat atacctgacaaggcagtgaaatgaggtag agatagagtgatgggatgcacatgccatt gcaaaaagcattatgatgcgggctgtatg atggagttgtaacttctggaggaaagcta aaaatggaggaacagattaatatcagcag caaatcacatggtctggcaggaaagtca ggccagtgacagagaaactactacagg agtcttcagcctggttttctatgaacta gctgtgtgaccttgagccattggcttcac ctctctgggctccttgggtgtttttgcac caggagtctcacctgtatgtcaacattt gctaagcctgttatctcatgaataattgc aacaactctatatggtgttcagaaatct cctgctaccccatctggagccattcttc ccccttctcacctgctgagtgtctgccc tggggactacttttatgcatgcatcaat gga | Hierbei handelt es sich um eine unspezifische Amplifikation in 14q24.2, wobei man eine gewisse Ähnlichkeit mit dem Primer und dem Beginn der Sequenz (rote Markierung) erkennen kann. (Abbildung 21A) <u>Sequenz des Primers:</u> 5'-tgtcattgggcaagacagaa-3' Außerdem ergab die Auswertung ein SINE (Short Interspersed Nucleotide Element) in 1p36.11 als weiteres unspezifisches Ergebnis (Abbildung 21B). Die Auswertung der Sequenz mit dem anderen Primer (4746) ergab ebenfalls eine unspezifische Amplifikation in 14q24.2. |

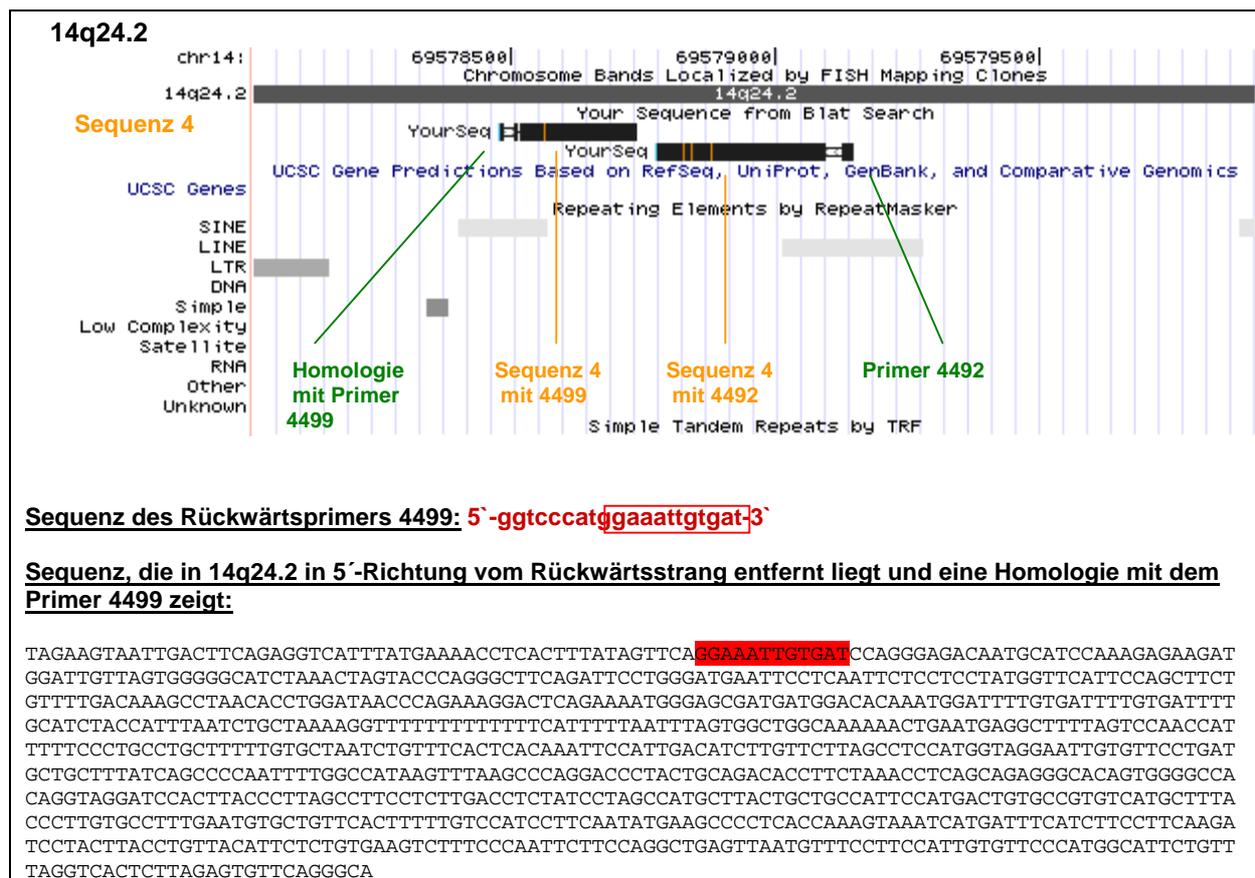


Abbildung 19: Schematische Darstellung der Auswertung der mit der Primerkombination 4492/4499 erzeugten Sequenz 4. Zu sehen ist sowohl die Lage der Sequenz 4 (sequenziert mit beiden Primern) als auch die Lage der Primer 4492 (14q24.2) und 4499 (1p33), welcher in diesem speziellen Fall nicht nur in 1p33 sondern aufgrund einer Homologie in 14q24.2 auch dort hybridieren kann. Die rot markierte Sequenz zeigt die Homologie des Rückwärtsprimers 4499 mit einem Abschnitt einer Sequenz in 14q24.2, durch welche die erzeugte Sequenz 4 in 14q24.2 entstehen konnte. (Erstellt mit der Blat-Funktion der Datenbank des Human Genome Browser Gateway)

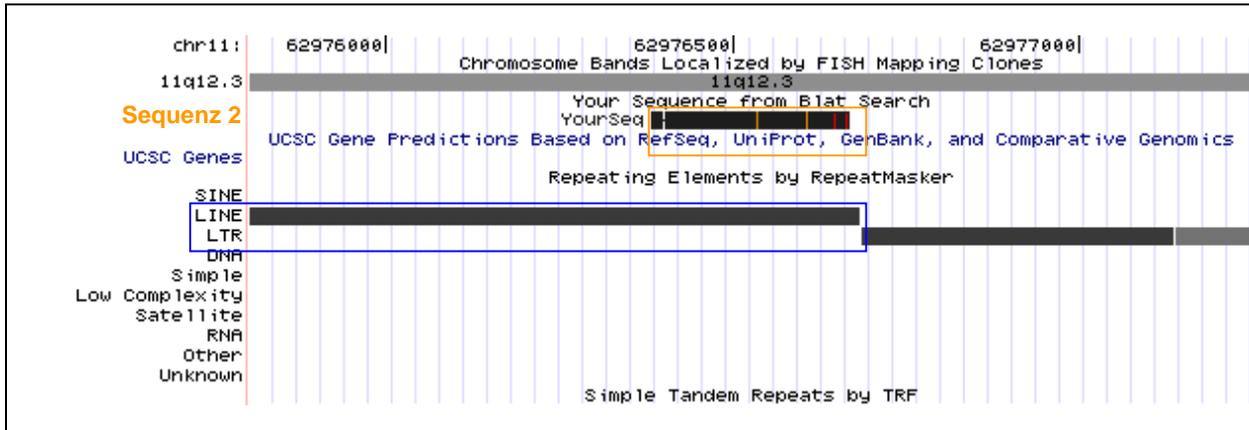


Abbildung 20: Auswertung der mit der Primerkombination 4497/4746 erzeugten Sequenz 2 (Lage der Sequenz ist orange markiert). Die Sequenz zeigt Teile der Sequenz eines LINE (Long Interspersed Nucleotide Element) (blaue Markierung), das auf allen Chromosomen vorkommt. Dieses LINE in 11q12.3 dient als Beispiel zur graphischen Darstellung des Ergebnisses. Ähnliches gilt für die Auswertung der Sequenz 3, die auch ein LINE ergab. (Erstellt mit der Blat-Funktion der Datenbank des Human Genome Browser Gateway)

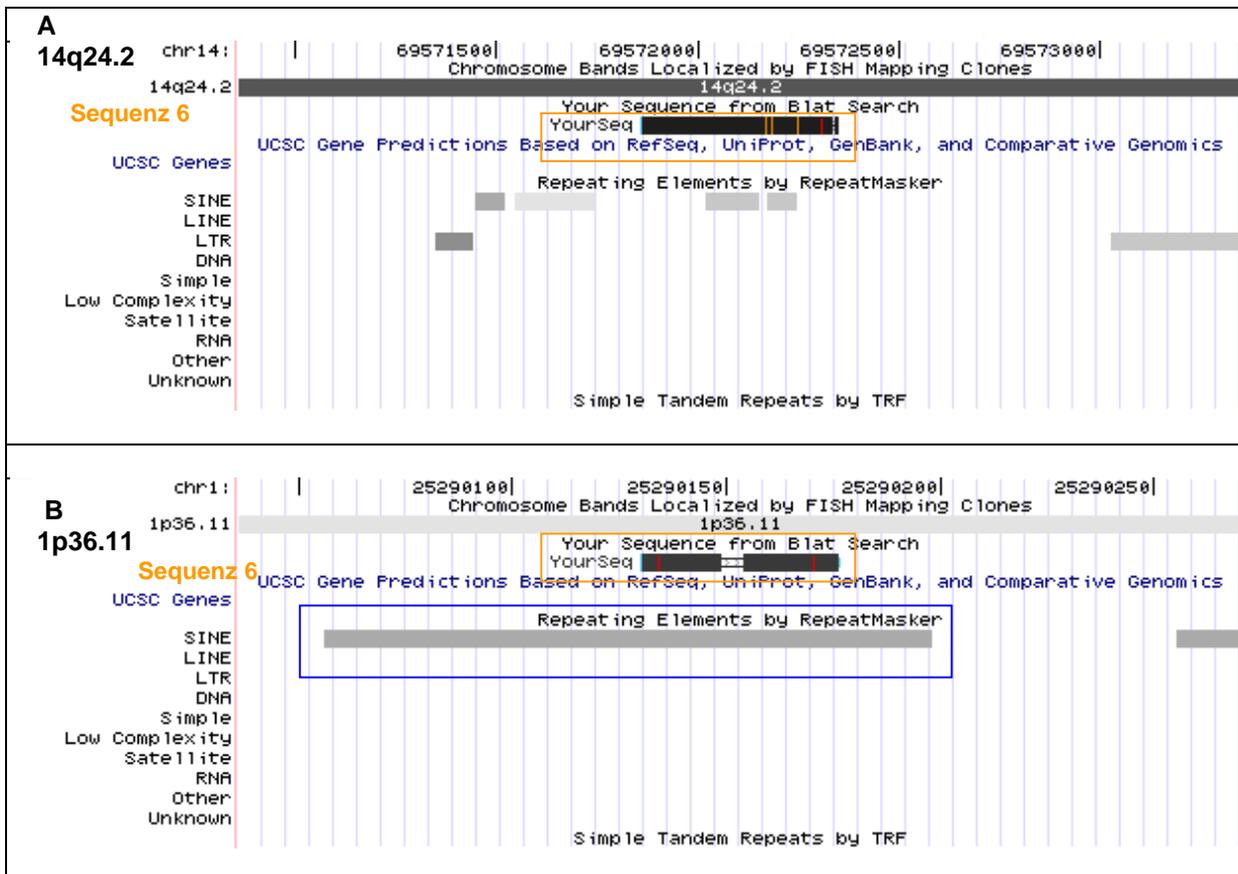


Abbildung 21: Auswertung der mit der Primerkombination 4502/4746 erzeugten Sequenz 6. A: Die Sequenz liegt vollständig in 14q24.2 (Lage der Sequenz 6 ist orange markiert). Auch die mit dem anderen Rückwärtsprimer 4746 lesbare Sequenz liegt in 14q24.2. B: Als weiteres Ergebnis bei der Auswertung zeigte die Blat-Funktion der Datenbank des Human Genome Browser Gateway ein SINE (Short Interspersed Nucleotide Element) in 1p36.11, das aber zu weit von der eigentlichen Lokalisation des Primers in 1p33 entfernt liegt, um spezifisch zu sein (Lage der Sequenz 6 ist orange und die Lage der SINE-Sequenz blau markiert). (Erstellt mit der Blat-Funktion der Datenbank des Human Genome Browser Gateway)

8. Danksagung

Zuerst möchte ich Herrn Professor Dr. med. Reiner Siebert für die Möglichkeit danken, am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Schleswig-Holstein (Campus Kiel) zu promovieren. Ganz besonders bedanke ich mich für die interessante Themenstellung und die immer neuen Vorschläge, Ratschläge und konstruktiven Kritiken, die sehr zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben. Außerdem bedanken möchte ich mich für die zu jedem Zeitpunkt der Arbeit hervorragende Betreuung und das freundliche Arbeitsklima innerhalb des gesamten Institutes.

Mein Dank gilt ebenfalls Frau Gabi Riesen, Frau Claudia Becher, Frau Elke Heiden, Frau Margret Ratjen und Frau Dorit Schuster für das nette Arbeitsklima im Labor und die Hilfestellungen bei der Einführung in die verschiedenen Labormethoden und Arbeitstechniken.

Des Weiteren danke ich Herrn Claus Peter Blohm für die Hilfe beim Anfertigen einiger Abbildungen.

Zudem bedanke ich mich sehr bei Dr. med. Stefan Gesk für die Unterstützung und die Hilfestellungen bei der Durchführung der FISH-Analysen.

Frau Dr. med. Almuth Caliebe und Herrn Dr. rer. nat. Holger Tönnies danke ich für die thematische Einführung und anschließende Unterstützung beim Anfertigen und Auswerten der Array-CGH. Außerdem bedanke ich mich bei Frau Dr. med. Almuth Caliebe für die Ratschläge und Hilfestellungen beim Erstellen dieser Arbeit.

Ich danke zudem Frau Dr. rer. nat. Inga Vater für die Unterstützung bei der hochauflösenden Microarray-Analyse.

Weiterer herzlicher Dank geht an Frau MSc Stefanie Bug, Frau Dipl. Biol. Julia Richter und Frau Christine Padberg für all die unentbehrlichen Ratschläge, Erklärungen und Hilfestellungen im Labor und beim anschließenden Erstellen dieser Arbeit.

Zuletzt möchte ich meiner Familie danken, die jederzeit ganz selbstverständlich für mich da ist und mich unterstützt.

9. Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Annika Basner
Geburtsdatum: 11.07.1983
Geburtsort: Itzehoe
Anschrift: Holtenauer Straße 111, 24105 Kiel
Telefonnummer: 0162/6885505
E-Mail: AnnikaBasner@Svenna.de
Familienstand: ledig
Nationalität: deutsch

Schulbildung:

1990-1994 Grundschule Kellinghusen
1994-2003 Kaiser-Karl-Schule, Gymnasium Itzehoe
Abschluss: Allgemeine Hochschulreife

Studium der Humanmedizin:

Seit Wintersemester 2003 Christian-Albrechts-Universität zu Kiel
19.08.2005 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
Ab August 2008 Praktisches Jahr