

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin

Institut für Humangenetik

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

X-chromosomal vererbte Leukoenzephalopathie und Osteochondrodysplasie - vier Erkrankte, eine Familie

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Vorgelegt von:
Gabriela Banneck
aus Kiel

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 14.12.2011

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: PD Dr. S. Kindler

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: Prof. Dr. K. Kutsche

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof. Dr. A. Kohlschütter

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	2
1. Einleitung	3
1.1. Fragestellung	3
1.2. Vorstellung der Ratsuchenden.....	4
1.3. Genetische Grundlagen	4
1.4. Aufbau des zentralen Nervensystems (ZNS)	6
1.5. Aufbau des Knorpels und des Knochens	8
1.5.1. Osteochondrodysplasie	8
1.6. Ziel der Arbeit.....	11
2. Material und Methoden	12
2.1. Gewinnung von genomischer DNA	12
2.2. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)	12
2.3. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	13
2.4. Sequenzierung.....	14
3. Ergebnisse	17
3.1. Vorbefunde.....	17
3.1.1. Klinische Befunde	17
3.1.2. Diagnostische Befunde des Patienten IV.5	18
3.2. Auswertung der Kandidatengene	20
3.2.1. Spleißstellenvorhersage	29
4. Diskussion.....	35
4.1. Möglichkeiten der phänotypischen Einordnung.....	35
4.2. Die Kandidatengene	38
4.2.1. Analyse der Kandidatengene.....	38
5. Zusammenfassung.....	46
6. Literaturverzeichnis	48
7. Danksagung	53
8. Lebenslauf.....	54
9. Eidesstattliche Versicherung.....	56

1. Einleitung

1.1. Fragestellung

In der vorliegenden Arbeit wird der Fall einer Familie besprochen, bei der eine chronisch progredient verlaufende Leukodystrophie und Osteochondrodysplasie beschrieben ist. Betroffen sind in der Familie vier männliche Angehörige aus drei Generationen. Die Erkrankung ist sowohl durch neurologische als auch orthopädische Symptome gekennzeichnet. Der Stammbaum der Familie weist auf eine genetische Grundlage der Erkrankung hin. Im Jahr 2006 wurde mittels einer Kopplungsanalyse der Erkrankungslocus auf den Bereich Xq25-q27.3 festgelegt. Von den 107 Genen, die diese Region enthält, wurden 39 Kandidatengene mit insgesamt 213 Exons auf Grund ihrer Bedeutung für den Muskel- bzw. Gehirnstoffwechsel untersucht. Eine die Krankheit auslösende Genveränderung konnte hierbei nicht gefunden werden [Neubauer et al., 2006].

Das klinische Bild, gekennzeichnet durch Tetraspastiken, Gangataxien, gestörte Seh- und Hörfähigkeit sowie verdickte Hand- und Kniegelenke, und der die Demyelinisierungen und Atrophien im zentralen Nervensystem (ZNS) beschreibende histopathologische Befund lassen zunächst eine Zuordnung der neurologischen Symptomatik zu einer Krankheit aus dem Formenkreis der Leukodystrophien vermuten. Jedoch konnte die für den durch sehr ähnliche Symptome gekennzeichneten Morbus Pelizaeus-Merzbacher ursächliche Mutation des *PLP1*-Gens [Willard und Riordan, 1985] bereits ausgeschlossen werden. Auch die Eingruppierung in andere Erkrankungen des Formenkreises der Leukodystrophien ist durch die Festlegung des Erkrankungslocus ausgeschlossen, da alle bisher bekannten Gene, die bei den unterschiedlichen Formen der Leukoenzephalopathien betroffen sein können, in einer von dem hier beschriebenen Krankheitslocus abweichenden Position des Genoms liegen (siehe Tab. 1). Zudem lässt die orthopädische Symptomatik keine Zuordnung der vorliegenden Erkrankung in eine bereits bekannte Erkrankung aus der Gruppe der Osteochondrodysplasien zu. In dieser Arbeit wird nun ein Teil der bisher noch nicht näher untersuchten Gene, die im Bereich des Erkrankungslocus Xq25- q27.3 liegen, analysiert, um eine der Erkrankung zugrunde liegende genetische Veränderung identifizieren zu können.

1.2. Vorstellung der Ratsuchenden

In der Abbildung 1 sind die klinisch betroffenen Familienmitglieder dargestellt (II.7, III.7, IV.5, IV.6). Sie leiden an den Auswirkungen einer progredienten, sich früh manifestierenden Leukoenzephalopathie und Osteochondrodysplasie. Ihre Symptome gleichen sich in Ausprägung und Verlauf weitgehend.

Bei den Betroffenen handelt es sich ausschließlich um Männer. Dieses ist die Grundlage der Annahme, dass es sich um eine Erkrankung handelt, die einem X-chromosomalen Erbgang folgt. In der Arbeit von Neubauer et al. [2006] konnte diese Annahme durch eine Kopplungsanalyse bestätigt werden.

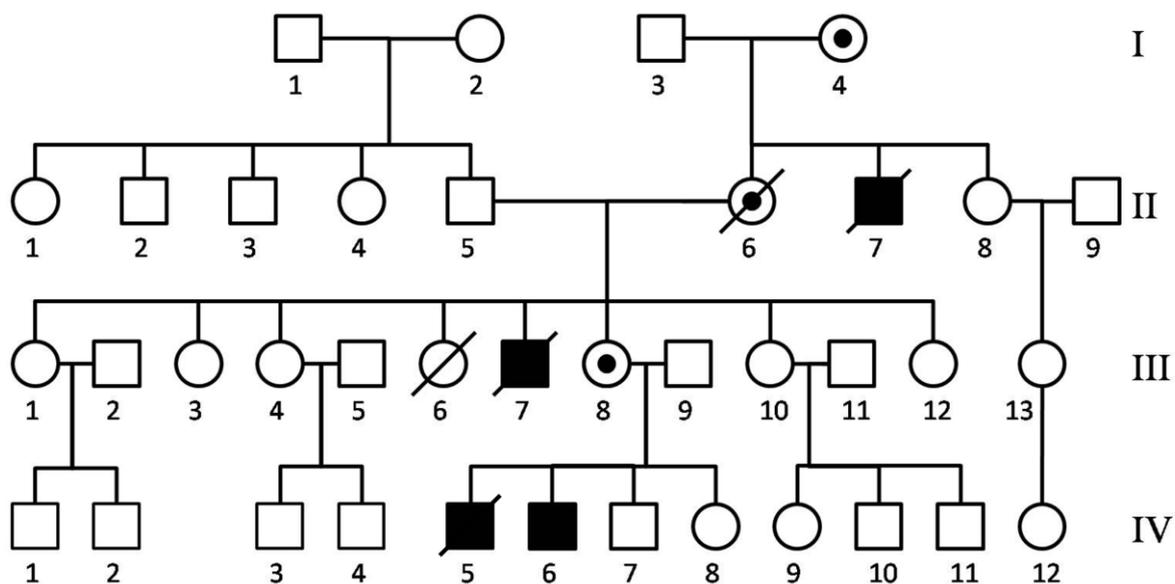


Abbildung 1: Der Stammbaum der in dieser Arbeit untersuchten Familie. □ steht für die klinisch nicht betroffenen männlichen Familienmitglieder; ○ kennzeichnet die klinisch nicht betroffenen weiblichen Familienmitglieder; ■ sind die im Fokus dieser Arbeit stehenden, von der Erkrankung betroffenen männlichen Familienmitglieder; ⊙ sind die klinisch nicht betroffenen weiblichen Familienmitglieder - Überträgerinnen der Erkrankung.

1.3. Genetische Grundlagen

Das menschliche Erbgut befindet sich im Kern der Körperzellen und besteht aus einem doppelten Satz von insgesamt 46 Chromosomen. Männer besitzen 44 Autosomen und jeweils ein X- sowie ein Y-Chromosom. Frauen tragen ihre genetische Information in 44 Autosomen und zwei X-Chromosomen.

Chromosomen bestehen aus einer doppelsträngigen DNA-Helix, deren beide Stränge über Wasserstoffbrücken miteinander verbunden sind. Hierbei entstehen zwischen den Basen Adenin und Thymin zwei und zwischen den Basen Guanin und Cytosin drei

Wasserstoffbrückenbindungen. Je drei Nukleotide bilden ein Triplet und kodieren eine Aminosäure, wobei eine Aminosäure durch unterschiedliche Basentriplets kodiert sein kann. Die Basen Adenin Uracil Guanin (AUG) bilden als RNA-Basentriplet das Startcodon für die Translation, der Prozess des Umschreibens der *messenger* RNA in das Protein; UAA, UAG, UGA beenden als Stopcodon die Translation.

Neben einer die zu kodierende Aminosäure nicht verändernden Punktmutation einer Base des Triplets, einer sogenannten stillen Mutation, und dem Entstehen eines vorzeitigen Stopcodons, kann ein Basenaustausch auch zu einer Aminosäureveränderung führen. Solche *missense* Mutationen können durch die Auswirkungen des aus der Mutation resultierenden Aminosäureaustausches auf die Proteinfunktion eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten spielen. Sie können aber auch trotz eines Aminosäureaustausches als sogenannte SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*), genetische Variationen in der Bevölkerung die zur Individualität jedes Menschen beitragen, aber keine krankheitsauslösende Wirkung haben, für eine Krankheitsentstehung völlig unbedeutend sein.

Im Aufbau der Gene unterscheidet man zwischen Exons, kodierenden Bereichen und Introns, nicht kodierenden Bereichen. Auch die nicht kodierenden Bereiche werden zunächst im Rahmen der Transkription in die sogenannte Prä-mRNA (*Prä-messenger* RNA) übersetzt. Anschließend werden die Introns durch das RNA-Spleißen wieder entfernt, so dass am Ende der Transkription eine „reife“ mRNA ohne intronische Sequenzen vorliegt. Dieser Prozess der Transkription von DNA in *messenger* RNA ist zahlreichen regulatorischen Elementen unterworfen, von denen viele heute noch nicht bekannt sind. Die Voraussetzung für einen regelrechten Verlauf des Spleißprozesses ist, dass die Grenzen zwischen Exon und Intron vom Spleißosom erkannt werden. Die Übergänge sind durch die Dinukleotide GT und AG an der 5' (Donor) und 3' (Akzeptor) Spleißstelle gekennzeichnet [Burset et al., 2000]. Zusätzlich sind „Hilfselemente“ bekannt, die die Erkennung der Spleißstellen unterstützen und regulierend wirken. Es werden exonische und intronische *Splicing Enhancer* also Unterstützer (ESE, ISE) und *Silencer* mit hemmendem Einfluß (ESS, ISS) unterschieden [Fu, 2004]. Mutationen in allen aufgeführten Elementen können deren Funktion beeinträchtigen. In der *Human Gene Mutation Database* (www.hgmd.org) [Stenson et al., 2003] werden etwa 9,5% aller durch Mutationen verursachten erblichen Erkrankungen auf eine Punktmutation in Spleißelementen zurückgeführt.

1.4. Aufbau des zentralen Nervensystems (ZNS)

Das aus Gehirn und Rückenmark bestehende zentrale Nervensystem verarbeitet Informationen und steuert die Motorik. Es setzt sich aus Nervenzellen und Gliazellen zusammen. Makroskopisch kann im Nervengewebe zwischen grauer und weißer Substanz unterschieden werden. In der grauen Substanz liegen vorwiegend die Zellkörper der Neurone. Neurone besitzen zwei Arten von Zellausläufern: Axone und Dendriten. Die von Myelin umgebenen Axone sind Hauptbestandteil der weißen Substanz. Die Myelinscheide wird von Ausläufern der Oligodendrozyten gebildet. Das Myelin isoliert die Axone und ermöglicht eine schnelle Weiterleitung elektrischer Impulse. Am Ende der Axone liegen die Synapsenendknöpfchen. Hier werden Neuro-Transmitter ausgeschüttet und so die Nervenimpulse auf andere Zellen übertragen. Der Dendrit hingegen dient primär der Reizaufnahme und Weiterleitung zum Zellkörper.

1.4.1. Leukodystrophie

Unter Leukodystrophien versteht man eine Gruppe von Erkrankungen, bei denen es zu einer fortschreitenden Degeneration der weißen Substanz des Nervensystems kommt. Ursache für diese Degeneration sind Stoffwechselstörungen, deren Folge eine Instabilität und ein Zerfall der weißen Substanz ist. Da in der weißen Substanz vorwiegend Nervenbahnen verlaufen, resultiert aus ihrem Zerfall eine verlangsamte Weiterleitung von Nervenimpulsen, die sich bei den Patienten als Bewegungsstörung manifestiert. Die Seltenheit des Auftretens von Leukodystrophien, 3 auf 10.000 Neugeborene, und die erst seit kurzem bestehende Möglichkeit der frühen Diagnostik haben die Therapieforschungen bisher gehemmt. Leukodystrophien gelten heute nach wie vor als unheilbar. Gute Ergebnisse hat man jedoch mit Knochenmarkstransplantationen, z.B. bei der X- chromosomalen Adrenoleukodystrophie und metachromatischen Leukodystrophie erzielt [Kemp et al., 2010]. Es wird an Therapien mit Organtransplantationen, Zell- und Enzymersatztherapien und Übertragung einzelner Gene von einem Spender- auf einen Empfängerorganismus (Gentransfer) geforscht.

Zu dem Formenkreis der Leukodystrophien gehören unter anderem:

- Adrenoleukodystrophie
- Metachromatische Leukodystrophie
- Morbus Krabbe (Globoidzellleukodystrophie)
- Pelizaeus-Merzbacher-Krankheit
- Canavan-Krankheit
- CACH (*childhood ataxia with central hypomyelination*)
- Alexander-Krankheit

- Van-Bogaert-Scherer-Epstein-Syndrom

Alle diese unterschiedlichen Erkrankungen sind gekennzeichnet durch Symptome, die aus der Nervenbahnzerstörung resultieren. Die Betroffenen leiden unter Ataxien, Spasmen, Dysarthrien, Schluck- und Atemstörungen, kognitiven Defiziten sowie einer Abnahme der Hör- und Sehfähigkeit.

Die den Erkrankungen zugrunde liegenden genetischen Veränderungen wurden bereits für zahlreiche Leukodystrophien ermittelt (s. Tab.1):

Tabelle 1: [Gärtner et al., 2007]. Aufgeführt sind Erkrankungen aus dem Formenkreis der Leukodystrophien. Angegeben sind die der Erkrankung zugrunde liegende genetische Veränderung mit ihrer Lokalisation und dem von der Genveränderung betroffenen Protein. Außerdem ist der jeweils vorliegende Erbgang aufgeführt.

Erkrankung	Defektes Protein	Defektes Gen	Genlocus	Erbgang
X-chromosomale Adrenoleukodystrophie	Peroxismales Membranprotein	<i>ABCD1</i>	Xq28	X-chromosomal rezessiv
Morbus Krabbe	Galacto-Cerebrosidase	<i>GALC</i>	14q31	Autosomal-rezessiv
Metachromatische Leukodystrophie	Arylsulfatase A oder Saposin B	<i>ASA, PSAP</i>	10q22.1, 22q13.31	Autosomal-rezessiv
Peroxisomenbiogenese- (PBD-)Defekte	verschiedene Peroxine	<i>PEX</i>	1q22, 1p36.2, 2p15, 6q23-24, 7q21-q22, 12p13.3, 22q11.21	Autosomal-rezessiv
Multiple Sulfatase-Defizienz	Sulfatase modifizierendes Enzym	<i>SUMF1</i>	3p26	Autosomal-rezessiv
Morbus Pelizaeus-Merzbacher	Proteolipidprotein	<i>PLP</i>	Xq22	X-chromosomal rezessiv
Morbus Canavan	Aspartoacyclase	<i>ASPA</i>	17pter-p13	Autosomal-rezessiv

1.5. Aufbau des Knorpels und des Knochens

Knorpel ist ein festes Gewebe, das aber über eine ausgeprägte Druckelastizität verfügt. Unter Druck verformt es sich und kehrt anschließend in seine Ausgangsposition zurück. Der Träger dieser Eigenschaft ist die Extrazellulärmatrix, die aus Proteoglykanen und Kollagenfibrillen besteht. Die Zellen des Knorpels sind die Chondrozyten. Neben dem hyalinen Knorpel, der am häufigsten vorkommt, unterscheidet man noch elastischen Knorpel und Faserknorpel. Der hyaline Knorpel bildet die Gelenkknorpel, die Rippenknorpel, die Wachstumsplatten und das Primordialskelett, das im Rahmen der Ossifikation in Knochen umgewandelt wird. Die Funktion des Knorpels ist die eines Stoßdämpfers und damit Schutzpolsters für die Knochen.

Der Röhrenknochen setzt sich aus Diaphyse (Schaft), Metaphyse und Epiphyse zusammen; befindet sich der Mensch noch im Wachstum, liegt zwischen Metaphyse und Epiphyse noch die Wachstumsplatte. Das Innere des Knochens wird gebildet von der Spongiosa, einem Netzwerk aus Platten und Bälkchen. Umgeben ist sie von der Kompakta, der Rindenschicht. Das Gewebe des Knochens besteht aus verschiedenen Zelltypen und mineralisierter Extrazellulärmatrix. Die Innenhaut des Knochens wird als Endost bezeichnet, die Außenhaut wird vom Periost gebildet. Man unterscheidet Osteoblasten, die Knochenbildner, von Osteozyten, ehemaligen „eingemauerten“ Osteoblasten, und Osteoklasten, die Knochen abbauen können.

Während der Embryonalentwicklung steuern Entwicklungsgene (*patterning genes*) den Aufbau des Skeletts. Bei der Knochenbildung unterscheidet man die desmale von der chondralen Osteogenese. Während sich bei der desmalen Osteogenese Mesenchymzellen direkt in Osteoblasten umwandeln und Knochen bilden, werden bei der chondralen Osteogenese die Mesenchymzellen zunächst zu Chondroblasten. Sie bauen das Modell der späteren Knochen aus Knorpel vor (Primordialskelett). Bei der anschließenden Ossifikation wird eine Knochenmanschette um den Knorpel gebildet (perichondrale Ossifikation) und der innere Knorpel durch Knochen ersetzt (endochondrale Ossifikation). Zu welchem Zeitpunkt diese Vorgänge ablaufen, ist vom Knochentyp abhängig, abgeschlossen ist der Differenzierungsprozess mit dem Ende der Embryonalentwicklung. Bis zum Abschluss der Pubertät wächst der Knochen weiter und ist während des gesamten Lebens Umbauprozessen und Anpassungsvorgängen unterworfen.

1.5.1. Osteochondrodysplasie

Wenn es bei dem komplexen Zusammenspiel von Hormonen und Wirkstoffen, das zur regelrechten Knochenentwicklung notwendig ist, zu Abweichungen kommt, kann das zu

Störungen der Entwicklung, des Wachstums und der Homöostase des Knorpels und/oder des Knochens führen. Die Grundlage der Dysplasien ist damit eine Störung auf zellulärer Ebene. Die verschiedenen, Knorpel und Knochen betreffenden Störungen werden als Osteochondrodysplasien bezeichnet und sind in der Mehrzahl genetisch bedingt. Die Symptome sind sehr variabel. Sie reichen in der Ausprägung von sehr schweren früh letalen Verläufen über isolierten Kleinwuchs bis hin zu Betroffenen mit normaler Größe, aber Arthrose und veränderter Knochendichte.

Eine erste umfassende Klassifikation der Osteochondrodysplasien erfolgte 1992 von Spranger, basierend auf der Pariser *Nomenclature of Constitutional Disorders of Bone* von 1972. Im Unterschied zur Pariser Nomenklatur beruht die Klassifikation Sprangers ausschließlich auf radiologischen Befunden. Dies bedeutet, dass in dieser Klassifikation eine Eingruppierung der einzelnen Krankheitsbilder rein nach morphologischen Ähnlichkeiten erfolgt. Klinische Kriterien, wie z.B. das Alter des Patienten bei Erkrankungsbeginn oder pathogenetische Kriterien spielen in dieser Einteilung keine Rolle. Spranger hat sich in seiner Klassifikation auf drei „Haupterkrankungsfamilien“ beschränkt:

- Defekte des Röhrenknochens und/oder des axialen Skeletts
- Entwicklungsstörungen kartilaginärer oder fibröser Skelettanteile
- Idiopathische Osteolysen

Neuere Klassifikationen haben diese Einteilung zwar im groben beibehalten, doch sie tragen den molekulargenetischen Forschungsergebnissen der letzten Jahre Rechnung. So wurden die Osteochondrodysplasien von der *International Working Group on Bone Dysplasias* 2001 nach ihren genetischen und/oder Protein-Defekten in 33 Osteochondrodysplasien (sowie 3 genetisch verursachte Dysostosen) neu gruppiert [Hall, 2002]. Dabei zeigte sich, dass die zunächst nach rein radiologischen Aspekten gebildeten Erkrankungsfamilien auch durch Mutationen in den jeweils selben Genen gekennzeichnet waren [Superti-Furga et al., 2001; Kornak und Mundlos, 2003]. Von Mutationen betroffen sind Gene, die an der zellulären Signalübertragung beteiligt sind, genauso wie Gene, die wichtig für die Zellstruktur und -funktion sind (s. Tab.2 und Tab.3).

Tabelle 2: Erkrankungen aus dem Formenkreis der Osteochondrodysplasien, die durch Defekte des Signalübertragungsweges gekennzeichnet sind. In der Tabelle finden sich neben der Erkrankung die von der Veränderung betroffenen Gene mit ihrem Genlocus sowie das jeweils durch die Genveränderung in seiner Funktion beeinträchtigte Protein.

Erkrankung	Genlocus	Gen	Protein
Achondroplasie-Familie	4p16.3	<i>FGFR3</i>	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor
Craniosynostose-Familie	verschiedene	<i>FGFR1,2,3</i>	diverse Fibroblasten-Wachstumsfaktor-Rezeptoren (FGFR)
Dyschondroosteose	Xp22.32	<i>SHOX</i>	Homeobox-Transkriptionsfaktor
Tricho-rhino-phalangeales Syndrom Typ I	8q24.12	<i>TRPS1</i>	TRPS1-Transkriptionsfaktor
Tricho-rhino-phalangeales Syndrom Typ II	8q24.11- q24.13	<i>TRPS1</i> , <i>EXT1</i>	TRPS1-Transkriptionsfaktor, Exostosin 1
Multiple cartillaginöse Exostosen	8q23- q24.1 11p12- p11	<i>EXT1</i> , <i>EXT2</i>	Exostosin 1, Exostosin 2
Achondroplasie-Familie	4p16.3	<i>FGFR3</i>	Fibroblastenwachstumsfaktor-Rezeptor

Tabelle 3: Erkrankungen aus dem Formenkreis der Osteochondrodysplasien, die durch Defekte der Zellstruktur bzw. -funktion gekennzeichnet sind. Aufgeführt sind neben der Erkrankung die von der Veränderung betroffenen Gene mit ihrem Genlocus sowie das jeweils durch die Genveränderung in seiner Funktion beeinträchtigte Protein.

Erkrankung	Genlocus	Gen	Protein
Osteogenesis imperfecta	verschiedene	COL1A1, COL1A2	Kollagen Typ I
Stickler-Dysplasien	1p21	COL11A1, COL11A2	Kollagen Typ XI
Metaphysäre Chondrodysplasie Schmid	6q21- q22.3	COL10A1	Kollagen Typ X
Achondrogenesie 1B	5q32- q33	DTDST	Sulfat-Transporter
Chondrodysplasia punctata	Xp22.3	ARSE	Arylsulfatase E
Pyknodysostose	1q21	CTSK	Cathepsin K

1.6. Ziel der Arbeit

Das Ziel dieser Arbeit ist es, die genetische Grundlage der beschriebenen Erkrankung zu identifizieren. Zu diesem Zweck werden 21 der insgesamt 107 im Erkrankungslocus (Xq25-q27.3) lokalisierten Gene auf mögliche der Erkrankung zugrunde liegende genetische Veränderungen untersucht. Sowohl in den kodierenden Bereiche als auch in den unmittelbar angrenzenden Intronabschnitte der 21 Gene werden unter Einsatz der Polymerasekettenreaktion (PCR), gelelektrophoretischer Auftrennung und Sequenzierung der Amplifikate Sequenzabweichungen gesucht. Zum Vergleich dient die humane Referenzsequenz des NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Die Sequenzvariationen werden dann, um ihre mögliche Bedeutung für die Krankheitsentstehung einschätzen zu können, mit Hilfe verschiedener Computerprogramme analysiert. Insbesondere wird hierbei das pathogene Potential von Aminosäure- (*Mutation Taster*) und Spleißstellenveränderungen (*SpliceView, NetGene* etc.) bewertet.

2. Material und Methoden

2.1. Gewinnung von genomischer DNA

Die verwendete genomische DNA wird aus Fibroblasten der Patienten III.7 und IV.5, gewonnen. Die Zellen werden in einem Kulturmedium bei einer Inkubationstemperatur von 37°C kultiviert. Mit den im DNeasy Tissue Kit der Firma Qiagen gelieferten Chemikalien und beigelegtem Protokoll wird die genomische DNA in mehreren Schritten aus der Zelle isoliert. Die gewonnene DNA wird bei -20°C gelagert.

2.2. Die Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion ist ein Verfahren, das der Amplifikation definierter DNA-Abschnitte dient und so eine gezielte Analyse ermöglicht. Voraussetzung für die Amplifikation und spätere Sequenzierung ist es, dass zunächst mögliche Kandidatengene ausgewählt werden.

Für die kodierenden Bereiche dieser Gene werden passende flankierende *Forward*- und *Reverse*-Primer ausgewählt, die entweder die zu untersuchenden Exons komplett umklammern oder die bei längeren kodierenden Abschnitten so positioniert werden, dass sich die gebildeten Amplifikate weit überlappen, so dass dann der gesamte kodierende Abschnitt durch mehrere Primer abgedeckt ist. Die Oligonukleotide haben eine Länge von 15-25 bp. Die zu amplifizierenden Sequenzen haben eine Länge von 300 bis 700 bp.

Zur PCR werden jeweils in der Zusammensetzung identische Ansätze verwendet. Variiert werden lediglich die Primer-Paare und die *Annealing* (Abkühlungs)-Temperatur einzelner PCR-Läufe. Diese beträgt zwischen 56°C und 62°C. Die Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes und die Geräteeinstellung des Thermocyclers sehen wie folgt aus (s. Tabelle 4 und 5).

Tabelle 4: Reaktionsansatz zur Durchführung der PCR.

Reagenz	Hersteller	Volumen/Menge
Taq-Polymerase (5U/μl)	Qiagen (Hilden)	0,5 μl
PCR- Puffer (10x)	Qiagen (Hilden)	3,0 μl
Nukleotidmix (dNTP) (10 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)	1,0 μl
DNA (ca. 100 ng/μl)		1,0 μl
Primer 1 (10 pmol/μl)	Invitrogen (Karlsruhe)	0,2 μl
Primer 2 (10 pmol/μl)	Invitrogen (Karlsruhe)	0,2 μl
Aqua dest.		23,1 μl
		<u>Gesamt: 30 μl</u>

Tabelle 5: PCR-Programm zur Amplifikation kodierender Genabschnitte.

PCR- Programm	Temperatur in °C	Inkubationszeit in sec.
Initiale Denaturierung	94	300
Denaturierung	94	30
<i>Annealing</i>	56-62	30
Elongation	72	40
End-Elongation	72	420

Phasen eines Zyklus (insgesamt 38x Durchgänge)

Die drei Schritte Denaturierung, *Annealing*, und Elongation werden 38mal durchlaufen. Die PCR-Produkte werden bis zur Weiterverarbeitung bei 4°C gelagert.

2.3. Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Die Amplikate werden anschließend in einem Agarosegel (s. Tab.: 6) aufgetrennt. So kann die Größe der DNA-Moleküle und damit der Erfolg der PCR überprüft werden. Dem Gel wird

eine 0,05%-ige Ethidiumbromid-Lösung zugegeben. Das Ethidiumbromid wirkt als Farbstoff und macht die Banden unter UV-Licht bei der anschließenden Fotografie sichtbar. Um den Fortschritt der Elektrophorese bei der Auftrennung der DNA-Banden abschätzen zu können, werden die Proben mit 5 µl Ladepuffer (Orange G) als Farbmarker versetzt. Zusätzlich wird als Längenstandart in das erste Gelkissen 5 µl eines 100 bp-DNA-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe) eingefüllt. Das Agarose-Gel wird dann mit TAE (Tris-Acetat-EDTA) überspült, es wird eine Spannung von 100 V angelegt, als Laufzeit wird 20 Minuten gewählt. Dann wird das Gel unter UV-Licht fotografiert (245 nm, UVT-28M). Der Längenstandart erlaubt eine Auswertung der Größe der in die Gelkissen eingefüllten PCR-Produkte.

Tabelle 6: Ansatz für die Herstellung eines 2%igen Agarose-Gels. Dem Gel wird Ethidiumbromid hinzugefügt, das zwischen den DNA-Strängen interkaliert und die Produkte unter UV-Licht sichtbar macht.

Reagenz	Hersteller	Volumen/Menge
Agarose (Pulver)	Invitrogen (Karlsruhe)	4 mg
Tris-Acetat-EDTA Puffer (1x)	nach Maniatis	200 ml
Ethidiumbromid (10 mg/ml)	Merck (Darmstadt)	10 µl
		<u>Gesamt: 200 ml</u>

2.4. Sequenzierung

Das Ziel der DNA-Sequenzierung ist es, die Basenabfolge der Amplifikate zu bestimmen. Jeder Sequenzierungsreaktion wird ein Aufreinigungsschritt vorangestellt, in dem das jeweils zu analysierende PCR-Produkt mit dem Enzymmix ExoSAP (USB Corporation, Cleveland, USA) von Nukleotid- und Primer-Verunreinigungen befreit wird.

Für jeden DNA-Abschnitt erfolgten zwei Sequenzierungsreaktionen (kodierender und kodogener Strang). Die Sequenzierungsreaktion wurde mit dem BigDye[®] Terminator 1.1. Kit (Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Die Voraussetzung für die anschließende Auswertung ist, dass in jedem Abschnitt mindestens ein Strang für jeden zu analysierenden Sequenzabschnitt eindeutig lesbar ist.

Der genutzte Reaktionsansatz (Tab.7) und die Sequenzierungsreaktion (Tab.8) sehen wie folgt aus:

Tabelle 7: Ansatz für die Sequenzierungsreaktion.

Reagenz	Hersteller	Volumen
BigDye-Mix	Applied Biosystems (Darmstadt)	1,0 μ l
Primer (Fwd oder Rev) (10pmol/ μ l)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	0,5 μ l
Aufgereinigtes PCR-Produkt		2,0 μ l
BigDye-Puffer (2,5%)	Applied Biosystem (Darmstadt)	2,0 μ l
Aqua dest.		4,5 μ l
		<u>Gesamt: 10</u> <u>μl</u>

Tabelle 8: Ablauf der Sequenzierungsreaktion.

Temperatur in $^{\circ}$ C	Inkubationszeit in sec.
96	300
96	30
55	15
60	240
72	240

Die mittleren drei Schritte der zyklischen DNA-Sequenzierung werden 38mal durchlaufen. Nach der Sequenzierungsreaktion wird das Produkt mittels Natriumacetat-Fällung gereinigt. Die gelelektrophoretische Auftrennung und die Sequenzanalyse erfolgen dann automatisch im Sequenzierungsgerät (ABI Prism 3100 Genetic Analyser, Applied Biosystem, Foster City, USA). Am Ende des Vorgangs liegen die Sequenzdaten digitalisiert vor und werden mit Hilfe des Programmes *Gene Construction Kit 2.5* analysiert. Anschließend werden die Basenfolgen mit den Referenzsequenzen von NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) verglichen, um so Sequenzvarianten (SNPs, Duplikationen, Deletionen etc.) identifiziert zu können. Mögliche Sequenzvarianten werden dann mit den Programmen *Mutation Taster* [Schwarz et al, 2010], *Splice View* [Rogozin und Milanese, 1997], *NetGene2* [Brunak et al., 1991], *Berkeley Drosophila Genome Project* (BDGP) [Reese et al., 1997] und *Human Splicing Finder Version 2.4* (HSF) [Desmet et al., 2009] hinsichtlich ihres pathogenen Potentials untersucht.

3. Ergebnisse

3.1. Vorbefunde

3.1.1. Klinische Befunde

Patient IV.5, geboren 1985 und Patient IV.6, geboren 1987:

Bei Patient IV.5 handelt es sich um den Indexpatienten und bei IV.6 um seinen zwei Jahre jüngeren Bruder. Beide zeigen die gleiche Entwicklung. Diese stimmt in weiten Teilen mit der ihres ebenfalls betroffenen Onkels und Großonkels überein:

- Unauffällige Schwangerschaft und Geburt
- Normale frühkindliche motorische und mentale Entwicklung bis zum Alter von zwei Jahren
- Ab dem zweiten Lebensjahr einsetzende progrediente neurologische Defizite: beginnend mit Gangataxie, gesteigerten Muskeleigenreflexen, einer Streckinsuffizienz in Hüft- und Kniegelenken, positivem Babinski-Zeichen, einem Intentionstremor, Dysarthrie, einem Verlust des Visus; im Endstadium mit voll ausgeprägter spastischer Paraplegie
- Orthopädische Symptome: Lordose der Brust- und Lendenwirbelsäule, Scapula alata bds., verdickte Hand- und Kniegelenke
- Auffälligkeiten in der Gesichtsmorphologie: antevertierte Nasenspitze, verbreiterte Nasenwurzel, leichte Mittelgesichtshypoplasie, Hypertelorismus, vergrößerte Gesichtszüge
- In der neuropsychologischen Untersuchung ermittelter IQ von 65-70
- Körpergröße: auf 3. Perzentile, Körpergewicht und Kopfumfang: auf 25. Perzentile des entsprechenden Alters



Abbildung 2: Der Patient IV.5 im Alter von 12,5 Jahren. Rechts: verdickte Hand- und Kniegelenke des Patienten.

3.1.2. Diagnostische Befunde des Patienten IV.5

Radiologische Befunde:

Konventionelle Röntgenaufnahmen:

Die radiologischen Befunde zeigen die bildlichen Korrelate der vorher beschriebenen klinischen Untersuchungsergebnisse. In der konventionellen Röntgenaufnahme sind Unregelmäßigkeiten und Sklerosierungen vor allem im Bereich der distalen Ulna und des Radius nachweisbar. Die Röhrenknochen der Hand sind verkürzt und weisen im Bereich der Epiphyse Sklerosierungen auf.

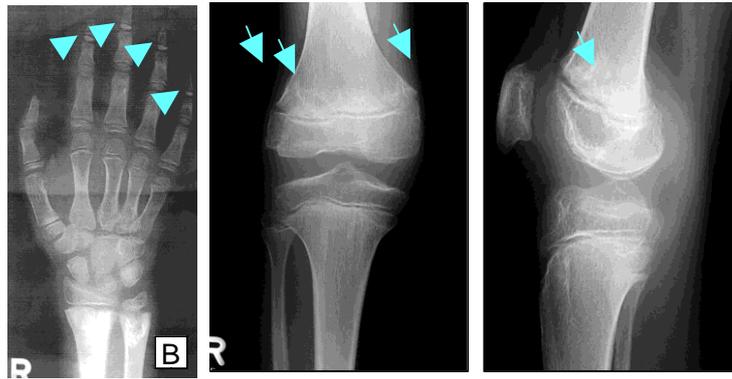


Abbildung 3: zeigt Röntgenaufnahmen verschiedener Extremitäten des Patienten IV.5: Handgelenk (Abb. 3) und Kniegelenkes in zwei Ebenen (Abb. 4-5.); B: Pfeile markieren Elfenbein-Epiphysen. Knie: Pfeile kennzeichnen unregelmäßige Knorpelstruktur, außerdem sind auf den Röntgenaufnahmen ein verbreiteter Gelenkspalt und eine Hypertrophie des Gelenkknorpels zu erkennen.

In den Bildern der Magnetresonanztomographie (MRT) zeigen sich im Bereich der Knie- und Handgelenke deutliche Hypertrophien des Knorpelgewebes, die bis zu den proximalen Diaphysen reichen. Die Aufnahmen der Wirbelsäule belegen die beschriebene Lordose der Lendenwirbelsäule.



Abbildung 4: MRT-Aufnahme der Kniegelenke des Patienten IV.5; die Pfeile markieren eine Inhomogenität der Knochenstruktur, der Stern kennzeichnet eine Region mit hypertrophen Knorpel.

- MRT des Gehirns:

In der T2-Gewichtung zeigen sich homogene Signalintensitätserhöhung im Bereich der weißen Substanz und der U-Fasern. In einer durchgeführten Magnetresonanzspektroskopie (MRS) zeigte sich eine Reduktion cholinhaltiger Stoffe in der parietal gelegenen weißen Substanz.

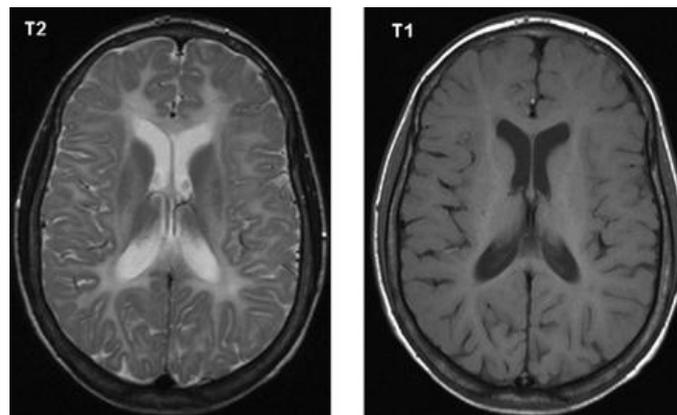


Abbildung 5: MRT des Gehirns in T2- und T1-Wichtung bei Patient IV.5 im Alter von 12,5 Jahren. In der T2-Wichtung zeigt sich eine homogene Signalintensitätserhöhung im Bereich der weißen Substanz.

Neurophysiologie:

Bei dem Patienten IV.5 wurde eine neurophysiologischen Untersuchung durchgeführt. Diese ergab eine deutlich verlängerte Latenzzeit bei verkürzter Amplitude der visuell-evozierten Potentiale. Es handelt sich hierbei um das neurophysiologische Korrelat des Visusverlustes.

Laborchemische Untersuchungen:

Alle durchgeführten Untersuchungen (Blut- Routineuntersuchungen, Diagnostik auf metabolische Erkrankungen, Liquor- Untersuchung) waren unauffällig.

Genetische Diagnostik:

Der Chromosomensatz des Indexpatienten (IV.5) war unauffällig. Eine Segregationsanalyse wurde mit intragenen polymorphen Markern für die Gene *PLP1*, zum Ausschluss der Pelizaeus-Merzbacher-Erkrankung, und *BGN* (Biglykan) durchgeführt. Dieses spielt eine wichtige Rolle in der Regulierung der Osteogenese [Inkson et al., 2009]. Eine Kopplungsanalyse legte die Region Xq25-q27.3 als den, den Erkrankungslocus beinhaltenden Bereich fest (124.178->138,133 kb, zwischen den Markern DXS8093->DXS1211) [Neubauer et al., 2006].

3.2. Auswertung der Kandidatengene

In dem ermittelten Krankheitslocus liegen insgesamt 107 Gene. 38 davon sind Pseudogene. 39 proteinkodierende Gene wurden bereits untersucht, ohne dass eine Mutation nachweisbar war [Neubauer et al., 2006]. In dieser Arbeit werden 21 der verbleibenden 37 Gene dieser Region analysiert.

In der folgenden Tabelle (Tabelle 9) sind zur Übersicht die Namen der Gene (mit *GeneID* und OMIM-Nummer (*Online Mendelian Inheritance of Man*)), ihre Lokalisation sowie falls bekannt die Funktion des kodierten Proteins und weitere Besonderheiten aufgeführt.

Tabelle 9: In der Tabelle sind alle in dieser Arbeit auf Sequenzabweichungen hin untersuchten Gene aufgeführt.

Genname <i>GeneID</i>	Lokalisation	Name des kodierten Proteins, Besonderheiten
<i>MAGEA13P</i> <i>GeneID:</i> 139363	Xq26.3	<i>Melanoma antigen family A, 13 pseudogene</i>
<i>ZIC3</i> <i>GeneID:</i> 7547 OMIM: 300265	Xq26.2	<i>Zinc finger protein of the cerebellum 3</i> , das Gen kodiert ein Zinc-Finger Protein. Dieses spielt eine entscheidende Rolle im frühen Stadien der links-rechts Körperachsendifferenzierung. Mutationen in diesem Gen verursachen X-chromosomale

		viszerale Heterotaxien, zu denen congenitale Herzfehlbildungen und links-rechts Achsendefekte in Organen zählen.
LOC100129230 GeneID: 100129230	Xq26.3	Möglicherweise proteinkodierend
CD40LG GeneID: 959 OMIM: 300386	Xq26	<i>CD40 ligand</i> , das kodierte Transmembranprotein sitzt auf der Oberfläche von T-Zellen. Es reguliert über den Kontakt mit CD40 auf der B-Zell-Oberfläche deren Funktion. Ein Defekt in diesem Gen führt zur Unfähigkeit Immunglobulinklassen zu wechseln und ist assoziiert mit dem Hyper-IgM-Syndrom.
HTATSF1 GeneID: 27336 OMIM: 300346	Xq26.1- 27.2	<i>HIV-1 TAT Stimulatory Factor 1</i> , das kodierte Protein stimuliert vorwiegend die Elongation während der Transkription und interagiert mit dem <i>trans-acting responsive</i> (TAR) RNA Element. Es ist entscheidend für die HIV-Replikation.
BRS3 GeneID: 680 OMIM: 300107	Xq26- q28	<i>Bombesin-like receptor 3</i> , das kodierte Protein beeinflusst die Modulation der glatten Muskulatur, exokrine und endokrine Prozesse, den Metabolismus und das Verhalten. Es ist ein G-Protein gekoppelter Rezeptoren und sitzt an der Zelloberfläche.
LOC100134324 GeneID: 100134324		Keine Angaben
GPR112 GeneID: 139378	Xq26.3	<i>G protein-coupled receptor 112</i> , das Gen kodiert für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor. Es ist in der fetalen Retina, in enterochromaffinen Zellen, in neuroendokrinen Tumoren und Leberkarzinomen nachweisbar.
MAP7D3 GeneID: 79649	Xq26.3	<i>MAP 7 domain containing 3</i> , das kodierte Protein gehört zur MAP7-Familie (<i>microtubule-associated protein 7</i>).

<p>SAGE1 GeneID: 55511 OMIM: 300359</p>	<p>Xq26</p> <p><i>Sarkoma Antigen 1</i>, das Gen gehört zu einer Klasse, die in Tumoren aktiviert ist. Im normalen Gewebe kommt es nicht vor, mit Ausnahme von spermatogenen Zellen und in der Plazenta. Die kodierten Proteine sind typisch für Sarkome.</p>
<p>LOC100130330 GeneID: 100130330</p>	<p>Xq26.3</p> <p>keine Angaben</p>
<p>CT45-6 GeneID: 541465</p>	<p>Xq26.3</p> <p><i>Cancer/testis antigen family 45 member 6</i>, CT45-6 gehört zur Gruppe der CT45-Antigene. Sie kommen physiologisch im Hodengewebe und pathologisch in verschiedenen Tumorgeweben vor.</p>
<p>PLAC1 GeneID: 10761 OMIM: 300296</p>	<p>Xq26.3</p> <p><i>Placenta-specific gene 1</i>, dieses Gen wird typischerweise in malignen Tumoren gefunden, u.a. im hepatozellulären Karzinom für das es auch als Marker dient. Im nicht-pathologischen Gewebe ist es nur in der Plazenta zu finden.</p>
<p>MGC16121 GeneID: 84848</p>	<p>Xq26.3</p> <p>Möglicherweise proteinkodierend</p>
<p>CCDC160 GeneID: 347475</p>	<p>Xq26.2</p> <p><i>Coiled-coil domain-containing 160</i></p>
<p>LOC100131128 GeneID: 100131128</p>	<p>Xq26.2</p> <p>Proteinkodierend, ähnlich der Translokase der inneren Mitochondrienmembran 8, homolog B (= <i>TIMM8B</i>, yeast). Mutationen in <i>TIMM8A</i> können die Ursache von Taubheit und Dystonie sein.</p>
<p>LOC100128123 GeneID: 100128123</p>	<p>Xq26.2</p> <p>Möglicherweise proteinkodierend</p>
<p>LOC100130541 GeneID: 100130541</p>	<p>Xq26.2</p> <p>Möglicherweise proteinkodierend</p>

LOC100131049		
GeneID: 100131049	Xq26.2	Keine Angaben
LOC286467		
GeneID: 286467	Xq26.2	Möglicherweise proteinkodierend
OR13H1		
GeneID: 347468	Xq26.2	<i>Olfactory receptor, family 13, subfamily H, member 1</i> , dieses Gen kodiert für ein Protein, das zur Gruppe der G-Proteingekoppelten Rezeptoren gehört. Über die Bindung von Geruchsmolekülen und Weiterleitung neuronaler Impulse ist es maßgeblich am Prozess der Geruchsgenerierung beteiligt.

Die Exons sowie die flankierenden Intronsequenzen der oben aufgeführten Gene werden mit dem Ziel der Analyse zunächst mittels Polymerasekettenreaktion vervielfältigt und anschließend sequenziert. Die Sequenzierungsergebnisse werden mit den in Datenbanken verfügbaren Referenzsequenzen verglichen. Das Gen *CT45-6* konnte nicht in die Auswertung einbezogen werden, da die Oligonukleotide sich als nicht spezifisch für dieses Gen erwiesen. Die Ursache hierfür ist, dass im Genom des Menschen viele Pseudogene mit sehr ähnlichen Sequenzen existieren.

Tabelle 10: Die untersuchten Gene mit den jeweils nachgewiesenen Sequenzabweichungen.

Genbezeichnung	untersuchte Exons	Ergebnis
<i>MAGEA13P</i>	4	Keine Sequenzveränderungen
<i>ZIC3</i>	3	Keine Sequenzveränderungen
<i>LOC100129230</i>	5	c.1228C>T (p.R408W)
<i>CD40LG</i>	5	c.347-30T>G
<i>HTATSF1</i>	8	Keine Sequenzveränderungen
<i>BRS3</i>	3	Keine Sequenzveränderungen
<i>LOC100134324</i>	1	Keine Sequenzveränderungen
<i>GPR112</i>	23	c.3638C>A (p.T1213N) c.4179T>C (p.=) c.4618T>C (p.S1540P) c.5371T>C (p.F1791L) c.5493C>T (p.=)

		c.6823-10_11delGT c.6927+64A>G c.7911+14T>A c.7969_7971delGAT c.8271T>C (p.=)
<i>MAP7D3</i>	16	Keine Sequenzveränderungen
<i>LOC100130330</i>	1	Keine Sequenzveränderungen
<i>SAGE1</i>	19	Keine Sequenzveränderungen
<i>CT45-6</i>	4	Primer sind nicht spezifisch für ein bestimmtes CT45-Gen, Ergebnisse nicht verwertbar
<i>PLAC1</i>	1	Keine Sequenzveränderungen
<i>MGC16121</i>	8	c.1037G>C (p.R343P) c.1513+35C>T
<i>CCDC160</i>	1	c.721C>T (p.=)
<i>LOC100131128</i>	1	Keine Sequenzveränderungen
<i>LOC100128123</i>	3	Keine Sequenzveränderungen
<i>LOC100131049</i>	3	Keine Sequenzveränderungen
<i>LOC100130541</i>	3	Keine Sequenzveränderungen
<i>LOC286467</i>	1	Keine Sequenzveränderungen
<i>OR13H1</i>	1	Keine Sequenzveränderungen

Bei 5 der 21 untersuchten Gene (*LOC100129230*, *CD40LG*, *GPR112*, *MGC16121*, *CCDC160*) konnten im Vergleich zur Referenzsequenz Basenabweichungen ermittelt werden. Diese Veränderungen wurden mit dem Programm *Mutation Taster* [Schwarz et al., 2010] auf ihr Krankheitspotential untersucht. Die genutzte Bayes Klassifikation gibt hierbei an, ob es sich bei der ermittelten Sequenzabweichung um eine vermutlich krankheitsverursachende Veränderung oder um einen harmlosen Polymorphismus handelt. Von einem Polymorphismus spricht man, wenn eine Sequenzvariante mit einer Häufigkeit von über 1% in der Population vorliegt. SNPs sind die häufigsten genetischen Polymorphismen im Genom. Um die Aussage, ob es sich um eine krankheitsverursachende Mutation oder einen harmlosen Polymorphismus handelt, treffen zu können wurden über 40.000 bekannte krankheitsrelevante Mutationen sowie über 500.000 Polymorphismen in die Auswertung einbezogen. Das Programm nutzt sowohl alle Daten der NCBI SNP-Datenbank (dbSNP) als auch alle Genotyp-Frequenzen des HapMap-Projektes (<http://hapmap.ncbi.nlm.nih.gov>). Das Programm gibt für jede untersuchte Veränderung einen p-Wert (von 0-1) an. Er beziffert die

Wahrscheinlichkeit der Vorhersage. Werte nahe 1 sprechen für eine hohe Sicherheit der Vorhersage. Werte unter 0,5 deuten darauf hin, dass das Programm keine sichere Vorhersage hinsichtlich der funktionellen Konsequenz einer genetischen Veränderung machen kann. Wenn ein SNP bereits bekannt ist, liefert das Programm die Referenz ID und die HapMap Genotyp Frequenzen. Von „*listed as SNP*“ und daraus folgend sicherem Polymorphismus spricht das Programm nur dann, wenn die variable Position in allen drei möglichen Genotypen (AA, AB, BB) mindestens einer HapMap-Population nachweisbar ist. Beim Gen *LOC100129230* wurde die Base Cytosin gegen Thymin im kodierenden Bereich ausgetauscht (c.1228C>T). Die kodierte Aminosäure ändert sich damit von Arginin zu Tryptophan (p.R408W). Mittels molekularbiologischer Methoden konnten bisher allerdings weder Transkripte noch Proteine für dieses Gen nachgewiesen werden. Daher ist bislang unklar, ob es sich bei dem Gen um ein Protein kodierendes handelt und *Mutation Taster* kann zu dieser Sequenzvariante keine Vorhersage treffen.

Das trifft ebenfalls auf die Sequenzvariante bei dem Gen *MGC16121* zu. Auch für dieses Gen konnten bisher keine Transkripte bzw. Proteine nachgewiesen werden. Seine Protein kodierende Funktion ist damit noch unklar. Auf DNA-Ebene wurde Guanin gegen Cytosin ausgetauscht, als Konsequenz daraus ändert sich die kodierte Aminosäure von Arginin zu Prolin (c.1037G>C, p.R343P).

Auch im Intron dieses Gens findet sich eine Sequenzabweichung von Cytosin zu Thymin (c.1513+35C>T). Für beide Sequenzvarianten kann bei der momentanen molekularbiologischen Datenlänge von dem Computerprogramm *Mutation Taster* keine Aussage über die Krankheitsrelevanz getroffen werden.

Neben den zwei aufgeführten Genen (*LOC100129230*, *MGC16121*), für die bisher noch keine Protein kodierende und damit vom Programm *Mutation Taster* auch nicht bewertbare Rolle für die Krankheitsgenese nachgewiesen werden konnte, hat das Programm 11 Sequenzabweichungen als nicht krankheitsverursachende Polymorphismen eingestuft:

Im Intron des Gens *CD40LG*, das über die Regulierung der B-Zell-Aktivität an der Immunantwort beteiligt ist, ist die Base Thymin gegen Guanin ausgetauscht (c.347-30T>G). Diese Sequenzvariante wird von dem Programm als vermutlicher SNP mit dem p-Wert 0,718 gewertet, obwohl diese Veränderung bisher weder in der NCBI- noch in der HapMap-Datenbank beschrieben ist. Daher ist es sicherlich sinnvoll, um eine Bedeutung für die Krankheitsgenese ausschließen zu können, diese Sequenzvariante auch in Hinblick auf ihre möglichen Auswirkungen auf den Spleißprozess zu untersuchen. Dies folgt im nächsten Abschnitt (s. Abschnitt 3.2.1.).

Im Gen *CCDC160* ist im kodierenden Bereich Cytosin gegen Thymin ausgetauscht (c.721C>T, p.=). Es handelt sich hierbei um einen SNP (p-Wert 0,729). Diese

Sequenzvariante ist als bekannter SNP mit der Referenz ID: rs2428577 in der NCBI-Datenbank aufgeführt.

Das Gen *GRP112* ist das größte in dieser Arbeit untersuchte Gen. Es kodiert einen G-Protein-gekoppelten-Rezeptor. Es wurden die 23 kodierenden Exons dieses Gens untersucht, 10 Sequenzabweichungen wurden gefunden, davon sind 7 als bereits bekannte SNPs in den genutzten Datenbanken (dbSNP, HapMap) aufgeführt:

An der Position 3638 der kodierenden DNA ist Cytosin durch Adenin ersetzt. Die im Rahmen der Transkription und Translation ins Protein eingebaute Aminosäure ändert sich damit von Threonin zu Asparagin (c.3638C>A, p.T1213N). Für diesen Austausch ermittelt *Mutation Taster* einen p-Wert von 0,999. Es handelt sich um einen bekannten Polymorphismus mit der Referenz ID: rs4829830.

Die nächste Veränderung (c.4179T>C) ist ein Austausch der Base Thymin gegen Cytosin. Dieser Basenaustausch hat keine Konsequenz für das synthetisierte Protein. Es handelt sich auch hierbei um einen bekannten SNP (p-Wert 0,711) mit der Referenz ID: rs877761.

Ähnlich wird von dem Programm *Mutation Taster* der nächste Basenaustausch gewertet. Hier ist Thymin durch Cytosin ersetzt (c.4618T>C, p.S1540P). Zwar hat diese Sequenzvariante einen Effekt auf das gebildete Protein, denn in dieses wird statt Serin Prolin eingefügt, doch ist der ermittelte p-Wert dieser Mutation 0,969. Sie ist ebenfalls bereits bekannt (Referenz ID: rs912002).

Bei den beiden folgenden ermittelten Basenaustauschen c.5371T>C (p.F1791L) sowie c.5493C>T (p.=) (Thymin zu Cytosin, Phenylalanin zu Leucin, p-Wert 0,999 und Cytosin zu Thymin ohne Aminosäureaustausch, p-Wert 0,711) handelt es sich ebenfalls um bekannte SNPs (Referenz ID: rs5930932 und Referenz ID: rs5930933).

Im folgenden Intronbereich fehlen die Basen Guanin und Thymin (c.6823-10_11delGT). Diese Sequenzvariante ist nicht als bereits bekannter SNP mit Referenz ID in den Datenbanken aufgeführt. Der Verlust der zwei Basen wird von *Mutation Taster* als ein SNP (p-Wert 0,729) eingestuft. Eine genauere Betrachtung der Auswirkungen der Sequenzvariante auf den Spleißprozess ist aber sicherlich aufgrund der Lokalisation in unmittelbarer Nähe der Exon-Intron-Grenze sinnvoll und folgt im nächsten Abschnitt (s. Abschnitt 3.2.1.)

Ebenfalls im Intron des Gens *GPR112* ist Adenin gegen Guanin ausgetauscht (c.6927+64A>G). Diese Mutation ist als bekannter SNP bereits gelistet (p-Wert 0,729, Referenz ID: rs6635268).

In einem folgenden Intronabschnitt ist Thymin durch Adenin ersetzt (c.7911+14T>A). Dieser Basenaustausch wird als Polymorphismus mit dem p-Wert 0,711 gewertet. Bereits bekannt und mit einer Referenz ID versehen ist er aber nicht. Daher erfolgt auch für diese

Sequenzvariation eine eingehendere Betrachtung im Abschnitt „Spleißstellenvorhersage“ (s. 3.2.1.).

Als letzter in diesem Gen auftretender bereits bekannter SNP ist Thymin durch Cytosin ersetzt worden. Einen Einfluss auf die ins Protein eingebaute Aminosäure (c.8271T>C, p.=) hat dieser Basenaustausch nicht. Der p-Wert ist 0,723, die Referenz ID: rs5974595.

Durch *Mutation Taster* wurde für die Sequenzabweichung c.7969_7971delGAT die Vorhersage „*disease causing*“ getroffen. Der Deletion der Basen Guanin, Adenin, Thymin an Position 7969 bis 7971 der kodierenden DNA des Gens *GPR112* wird trotz der Aufführung in der NCBI-Datenbank als bekannter SNP eine Krankheitsrelevanz mit dem p-Wert 1,000 zugesprochen. Die Referenz ID ist rs3030295. Die Ursache für diese sich widersprechenden Aussagen „*disease causing*“ und gleichzeitig bekannter SNP ist ein Auswertungsfehler des *Mutation Taster* Programms. Es gibt automatisch bei einer Sequenzabweichung mit dem Verlust dreier Basen die Wertung „*disease causing*“ an. Als bekannter SNP ist aber eine Krankheitsrelevanz dieser Sequenzabweichung unwahrscheinlich.

Die Sequenzabweichungen, die zu einem Aminosäureaustausch führen, die aber nicht als bekannte SNPs mit Referenznummer in der Datenbank vorhanden sind bzw. denen als putativ Protein kodierende Gene kein Transkript zugeordnet werden konnte, werden, um einen möglichen Einfluss des Aminosäureaustausches auf die Proteinfunktion und damit auf die Krankheitsgenese bewerten zu können, in weitere Datenbanken eingesehen. Dies betrifft den Austausch der Basen Cytosin zu Thymin beim Gen *LOC100129230* und den Basenaustausch Guanin zu Thymin beim Gen *MGC16121*.

Tabelle 11: Vom Programm Mutation Taster ermittelte Ergebnisse.

Gen	Mutation	Auswertung Mutation Taster
LOC100129230	c.1228C>T (p.R408W)	Gen wird kein Transkript zugeordnet
CD40LG	c.347-30T>G	SNP (p-Wert: 0,718)
	c.3638C>A (p.T1213N)	SNP (p-Wert: 0,999) Referenz ID: rs4829830
	c.4179T>C (p.=)	SNP (p-Wert: 0,711) Referenz ID: rs877761
	c.4618T>C (p.S1540P)	SNP (p-Wert: 0,969) Referenz ID: rs912002
	c.5371T>C (p.F1791L)	SNP (p-Wert: 0,999) Referenz ID: rs5930932
GPR112	c.5493C>T (p.=)	SNP (p-Wert: 0,711) Referenz ID: rs5930933
	c.6823-10_11delGT	SNP (p-Wert: 0,729)
	c.6927+64A>G	SNP (p-Wert: 0,729) Referenz ID: rs6635268
	c.7911+14T>A	SNP (p-Wert: 0,711)
	c.7969_7971delGAT	Disease causing (p-Wert: 1,000) Referenz ID: rs3030295
MGC16121	c.8271T>C (p.=)	SNP (p-Wert: 0,723) Referenz ID: rs5974595
	c.1037G>C (p.R343P)	Gen wird kein Transkript zugeordnet
	c.1513+35C>T	Gen wird kein Transkript zugeordnet
CCDC160	c.721C>T (p.=)	SNP (p-Wert: 0,729), Referenz ID: rs2428577

Es wurden die Programme PolyPhen [Ramensky et al., 2002], PANTHER [Thomas et al., 2003], SNAP [Bromberg und Rost, 2007] und PhD-SNP [Capriotti et al., 2006] gewählt. Die Wertungen „benigne“ und „neutral“ weisen darauf hin, dass der Aminosäureaustausch die Proteinfunktion nicht beeinflusst. Die angegebenen Prozentwerte (*accuracy*) bei SNAP geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der die getroffene Vorhersage korrekt ist. Die bei PANTHER genutzte Abkürzung na steht für *not applicable*, d.h. die eingegebene Position lässt sich nicht mit dem Hidden Markov Model in Übereinstimmung bringen. Der Wert RI (*Reliability Index*, Bereich 0-10) bei PhD-SNP beziffert die Wahrscheinlichkeit der Richtigkeit

der Aussage. Nach Tian et al. [2007] wurden 66% der in ihrer Arbeit untersuchten *non-synonymous* SNPs von PhD-SNP ein $RI \geq 6$ zugeordnet; damit wurden etwa 88% korrekt als Polymorphismen vorausgesagt wurden.

Die Sequenzabweichung beim Gen *LOC100129230* (c.1228C>T, p.R408W), der bei *Mutation Taster* kein Transkript zugeordnet werden konnte, wird bei PolyPhen als benigne bewertet. PhD-SNP bewertet die Mutation mit einem RI von 7 ebenfalls deutlich als neutral. Diesen Bewertungen steht die Vorhersage von SNAP gegenüber, die den Aminosäureaustausch als *non-neutral* und damit die Proteinfunktion beeinflussend einstuft, die Genauigkeit der Vorhersage aber mit 58% als niedrig bewertet.

Der Austausch der Aminosäure Arginin durch Prolin beim vom Gen *MGC16121* kodierten Protein wird von allen Programmen als benigner Polymorphismus gewertet.

Tabelle 12: Ergebnisse der Programme zur ergänzenden Bewertung der Auswirkungen der Aminosäureaustausche auf Proteinebene.

Gen	Aminosäure- austausch	PolyPhen		PhD-SNP		PANTHER	SNAP	
		score	prediction	RI	prediction	Score Pdeleterious	accuracy	prediction
<i>LOC</i> <i>100129230</i>	p.R408W	N/A	<i>benign</i>	7	<i>neutral</i>	na	58%	<i>non- neutral</i>
<i>MGC</i> <i>16121</i>	p.R343P	N/A	<i>benign</i>	6	<i>neutral</i>	na	53%	<i>neutral</i>

Die dargestellten Ergebnisse lassen eine bedeutende Rolle der aus den Sequenzvariationen resultierenden Aminosäureveränderungen auf die Krankheitsgenese unwahrscheinlich erscheinen. Es ist dennoch sinnvoll zusätzlich den Einfluss der Sequenzveränderungen auf den Spleißprozess zu betrachten.

3.2.1. Spleißstellenvorhersage

Da neben einem Aminosäureaustausch auch eine Veränderung der Donor- bzw. Akzeptor-Spleißstelle zu einer Veränderung der *messenger* RNA und damit auch zu einer möglichen Beeinträchtigung des „Endproduktes“ Protein führen kann, wurden alle Teilbereiche der Gene, die nicht eindeutig als SNPs mit bekannter Referenz ID verzeichnet waren, mit der von der Veränderung betroffenen Sequenz in vier verschiedene Spleißstellen-Vorhersage-Programme eingelesen. Es wurden die Programme *Splice View* [Rogozin und Milanese, 1997], *NetGene2* [Brunak et al., 1991], *Berkeley Drosophila Genome Project* (BDGP) [Reese

et al., 1997] und *Human Splicing Finder Version 2.4* (HSF) [Desmet et al., 2009] gewählt. Angegeben werden jeweils die Werte der Donor-/Akzeptor-Spleißstellen des Wildtyps und die der Sequenzvariation, bezeichnet als mutierte Sequenz. Hohe Werte sprechen dabei für eine mit einer hohen Wahrscheinlichkeit vorliegende Spleißstelle, niedrige für eine unsichere. Bei dem Programm HSF 2.4 werden durch die HSF-Matrices ermittelten Werte von über 80 als starke Spleißstellen bewertet. Nur wenige aktive Spleißstellen haben Werte zwischen 65 und 70 [Desmet et al., 2009]. Von einer *New Site* wird gesprochen, wenn im Wildtyp mit einem Wert von unter 65 eine schwache/wenig wahrscheinliche Spleißstelle angegeben ist und die Wertigkeit der Spleißstelle mit der Sequenzvariation dann über dem Wert von 65 steigt und damit die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer Spleißstelle nach Basenaustausch deutlich erhöht ist. *Site broken* wird angegeben, wenn der Wert der Spleißstelle des Wildtyps über 65 und der des Abschnittes mit Sequenzveränderung dann unter 65 liegt. Als Grenzwert für aufzuführende Werte bei dem Programm HSF 2.4 fungiert damit 65. Bei dem Programm BDGP ist der Grenzwert 0,4 bei einer Spanne der Werte von 0 bis 1.

In die vier genannten Computerprogramme werden die sechs Sequenzvarianten eingelesen, die nicht eindeutig als bekannter SNPs mit Referenz-ID in den genutzten Datenbanken aufgeführt sind, da bei ihnen die Möglichkeit der Relevanz der Sequenzabweichung für die Krankheitsgenese besteht (s. Tab 13):

Tabelle 13: Software generierte Vorhersage der Auswirkungen der Basenmutationen auf die Spleißstellen. A: Akzeptor Site, D: Donor Site; CV: consensus value; WT: Wildtyp, Mut: mutierte Sequenz; CV Var.%: Abweichung zwischen Wildtyp und mutierter Sequenz in Prozent; SB: Site broken, NS: New Site, -: Software ordnet keine Splice Site zu.

Gen mit Basenaustausch	Splice Site	SpliceView (Range 0-100)			NetGene2 (Range 0-1)			BDGP (Range 0-1)			HSF 2.4 (Range 0-100)		
		CV	CV	CV	CV	CV	CV	CV	CV	CV	CV	CV	
		WT	Mut	Var.%	WT	Mut	Var.%	WT	Mut	Var.%	WT	Mut	Var.%
<i>LOC100129230</i> c.1228C>T	A/D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
<i>CD40LG</i> c.347-30T>G	A	78,0	78,0	0	-	-	-	0,53	-	SB	74,61	74,64	+0,05
<i>GPR112</i> c.6813- 10_11gelGT	A	-	-	-	0	0	0	0,96	0,97	+1,04	54,66	89,45	NS (+63,66)
<i>GPR112</i> c.7911+14T>A	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	85,79	21,37	SB (-75,09)
<i>MGC16121</i> c.1037G>C	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	71,51	71,44	-0,1
<i>MGC16121</i> c.1513+35C>T	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	70,25	82,42	+17,31
	A	-	-	-	-	-	-	-	-	-	54,2	83,14	NS (+53,41)
	D	-	-	-	-	-	-	-	0,52	NS	-	-	-
	A	-	84,0	NS	-	0,15	NS	-	-	-	76,02	86,32	+13,54
											78,45	80,35	+2,43
											58,92	85,75	NS (+45,55)
	D	-	84,0	NS	-	0	-	-	0,85	NS	66,82	64,84	SB (-2,96)
											69,62	70,32	+1,02

Durch die Sequenzvariante c1228C>T des Gens *LOC100129230* kommt es zu keiner Spleißstellenveränderung.

Bei dem Gen *CD40LG* (c.347-30T>G) wird das Vorliegen einer Akzeptor-Spleißstelle von dem Programm *SpliceView* und HSF 2.4. mit hohen Werten bestätigt, jedoch nur BDGP gibt den Verlust dieser Spleißstelle durch den Basenaustausch an. Es gibt die Wahrscheinlichkeit einer Akzeptorstelle beim Wildtyp mit dem Wert 0,53 als relativ gering und damit unwahrscheinlich an.

Beim Gen *GPR112* kommt es 14 Basen nach der Position 7911 im Intronbereich zum Austausch der Base Thymin gegen Adenin mit der Folge des Entstehens eines neuen Akzeptors. Dies scheint bei der Lokalisation der Sequenzabweichung aber unwahrscheinlich. Diese Spleißstellenveränderung wird auch ausschließlich von dem Programm HSF ermittelt. BDGP gibt an der gleichen Position das Entstehen einer Donorstelle mit dem geringen Wert von 0,52 an. Diese Sequenzabweichung spielt damit auf der Ebene der Spleißstellenveränderung wahrscheinlich ebenfalls keine bedeutende Rolle für die Krankheitsentstehung.

Im Intronbereich des Gens *GPR112* kann eine Sequenzvariation nachgewiesen werden (c.6813-10_11delGT). Es liegt eine Deletion zweier Basen vor (s. Abb. 6.). Nur die Programme BDGP und HSF 2.4. sehen in diesem Bereich Spleißstellen. BDGP gibt eine Akzeptorstelle mit hoher Wahrscheinlichkeit an. Diese wird aber als durch den Basenverlust nahezu unbeeinflusst gewertet (WT 0,96, Mut 0,97). HSF bestätigt zwar das Vorliegen einer Akzeptorstelle, ermittelt aber, dass es durch die Sequenzvariante zur Zerstörung des ursprünglichen Akzeptors kommt und gleichzeitig eine zwei Basen stromaufwärts liegende neue Stelle entsteht. Die daraus resultierenden Folgen können einen Einfluss auf die Krankheitsgenese haben.

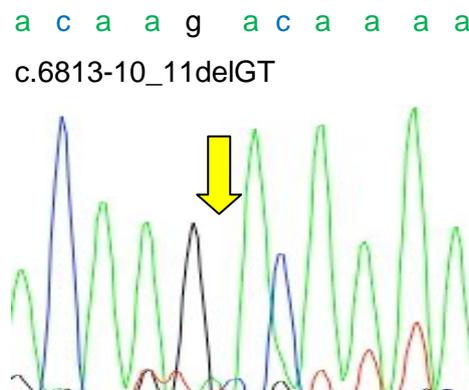


Abbildung 6: Teil des Sequenzchromatogramms des Patienten IV.5 mit der Sequenzvariation c.6813-10_11delGT in einem Intron des Gens *GPR112*. Die Position des Verlustes der Basen Guanin und Thymin ist durch den gelben Pfeil gekennzeichnet. Jede Base entspricht einem farbigen Buchstaben (grünes a-Adenin, blaues c-Cytosin, schwarzes g-Guanin). Klein geschriebene Buchstaben entsprechen im Intron liegenden Basen.

Bei dem Gen *MGC16121* kommt es zum Basenaustausch im Intronbereich (c.1513+35C>T) (s. Abb. 7). In weitgehender Übereinstimmung sehen drei der vier Programme, mit Ausnahme von *NetGene2*, das Entstehen einer neuen Donorstelle mit hohen Werten (*SpliceView* 85,0, BDGP 0,85, HSF 2.4 85,75). HSF ermittelt zusätzlich die Zerstörung einer

um vier Basen vorgelagerten Donorstelle, die allerdings im Wildtyp mit einem Wert von 66,82 als sehr schwach einzustufen ist. Auch diese Sequenzabweichung kann damit zu einem abweichenden Transkript mit möglicher Bedeutung für die Krankheitsgenese führen.

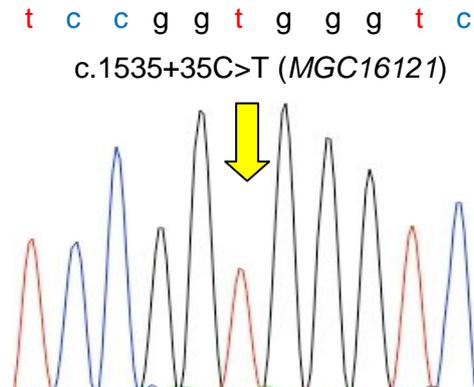


Abbildung 7: Teil des Sequenzchromatogramms des Patienten IV.5 mit der Sequenzabweichung c.1513+35C>T in einem Intron des Gens MGC16121. Die Position des Austausches der Base Cytosin gegen Thymin ist mit einem gelben Pfeil gekennzeichnet. Jede Base entspricht einem farbigen Buchstaben (rotes t-Thymin, blaues c-Cytosin, schwarzes g-Guanin). Klein geschriebene Buchstaben entsprechen im Intron liegenden Basen.

Im Gen MGC16121 kommt es außerdem durch den Austausch von Guanin gegen Cytosin (c.1037G>C, p.R343P) im fünften Exon des Gens (s. Abb. 8) laut *SpliceView* und *NetGene* zu der Entstehung eines neuen Akzeptors. HSF 2.4 gibt in der Region zwar auch zwei Akzeptorstellen an, diese bestehen aber auch schon in der Wildtyp-Sequenz. Ihre Wertigkeit wird durch den Basenaustausch erhöht.

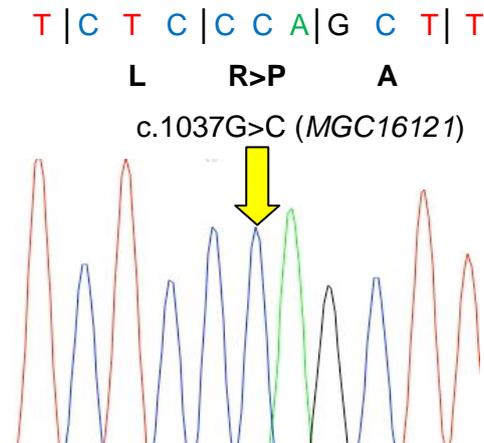


Abbildung 8: Teil des Sequenzchromatogramms des Patienten IV.5 mit der Sequenzabweichung c.1037G>C (p.R343P) im fünften Exon des Gens MGC16121. Die Position des Austausches der Base Guanin gegen Cytosin ist mit einem gelben Pfeil

gekennzeichnet. Jede Base entspricht einem farbigen Buchstaben (rotes T-Thymin, blaues C-Cytosin, grünes A-Adenin, schwarzes G-Guanin). Großbuchstaben entsprechen im Exon liegenden Basen. Die Tripletts sind durch senkrechte Striche voneinander getrennt. Die schwarzen dick gedruckten Buchstaben entsprechen der jeweiligen kodierten Aminosäure im Einbuchstabencode.

Auch durch diese Sequenzabweichung mittig im Exon gelegen, die zur Entstehung einer neuen Spleißstelle führt, sind schwerwiegende Abweichungen bei der Prozessierung des primären Transkripts und damit eine krankheitsverursachende Wirkung möglich.

4. Diskussion

Die in dieser Arbeit aufgeführten klinisch-diagnostischen und genetischen Befunde ergeben das Bild einer X-chromosomal vererbten Leukodystrophie und Chondrodysplasie. Die Beurteilung der Vorbefunde zeigte, dass die Ausprägung der in drei Generationen einer Familie auftretenden Krankheit nur leicht unter den Betroffenen variiert. Eine von Neubauer [2006] durchgeführte Kopplungsanalyse ergibt einen Erkrankungslocus im Bereich Xq25-q27.3. Diese Region enthält 107 Gene, davon sind 38 Gene Pseudogene. In der gleichen Arbeit wurden bereits 39 in dieser Region lokalisierte Gene mit 213 Exons auf krankheitsverursachende Sequenzvarianten untersucht. Es konnten keine pathogenen Genmutationen identifiziert werden [Neubauer et al., 2006]. Es wurden nun in dieser Arbeit 21 weitere in dem Erkrankungslocus liegende Gene mit ihren Protein kodierenden Regionen sowie unmittelbar benachbart liegenden Intronabschnitten auf Sequenzvarianten untersucht.

4.1. Möglichkeiten der phänotypischen Einordnung

Das klinische Bild der in dieser Arbeit geschilderten Patienten ist geprägt von einer zunächst normal verlaufenden frühkindlichen Entwicklung und ab dem zweiten Lebensjahr einsetzender chronisch progredient verlaufender neurologisch/orthopädischer Symptomatik. Im Vordergrund der neurologischen Symptome steht sowohl bei dem Indexpatienten (IV.5.) als auch bei seinem Bruder eine Kleinhirndegeneration mit Ataxie, Intentionstremor, Dysarthrie und Auswirkungen der Demyelinisierung mit gesteigerten Muskeleigenreflexen, positiven Pyramidenbahnzeichen und einem Visusverlust. Die nachgewiesenen histopathologischen Veränderungen sind ein atrophiertes, fast myelinfreies Cerebrum und Cerebellum, dünne Nervi optici, eine deutliche Reduzierung der Oligodendrozytenzahl und eine Hypoplasie des Corpus callosum.

Es stellt sich die Frage, ob die Möglichkeit einer Zu- bzw. Einordnung in ein neurologisches Krankheitsbild besteht:

Ein neurologisch vergleichbares klinisches Bild bieten andere Leukodystrophien. Einige von diesen werden ebenfalls X-chromosomal vererbt wie etwa die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie und der Morbus Pelizaeus-Merzbacher. Der Morbus Pelizaeus-Merzbacher bietet ein sehr ähnliches phänotypisches Bild. Die Ergebnisse einer Segregationsanalyse mit intragenen polymorphen Markern für das Gen *PLP1*, welches als krankheitsverursachend gilt, schließen bei dem vorliegenden Patienten diese Erkrankung aus [Willard und Riordan 1985; Mattei et al. 1986]. Die X-chromosomale Adrenoleukodystrophie wird durch Defekte im Gen *ABCD1*, das im Bereich Xq28 liegt, verursacht. Die Folge ist eine Anhäufung von gesättigten sehr langen Fettsäureketten im Plasma, in Fibroblasten und im Gewebe, vor allem in der Nebennierenrinde und in der

weißen Gehirns substanz. Gleichzeitig kommt es zu Demyelinisierungen im peripheren und zentralen Nervensystem und zu einer adrenalen Insuffizienz. Die Folgen der adrenalen Insuffizienz (Morbus Addison) manifestieren sich oft als erste Symptome [Aubourg, 2007]. Der in dieser Arbeit beschriebene Patient leidet nicht unter den Zeichen der adrenalen Insuffizienz wie niedrigem Blutdruck, allgemeiner Schwäche und einem Gewichtsverlust; die laborchemischen und histopathologischen Untersuchungen zeigten auch keinen erhöhten Spiegel an sehr langen Fettsäureketten.

Die orthopädischen Beschwerden des vorliegenden Patienten manifestieren sich phänotypisch in einer Lordose der Brust- und Lendenwirbelsäule, einer beidseitigen Scapula alata und verdickten Hand- und Kniegelenken. Außerdem liegt die Körpergröße des Indexpatienten auf der 3. Perzentile. In der Bildgebung zeigen sich Sklerosierungen und Unregelmäßigkeiten im Aufbau und der Mineralisation der Unterarm-, Unterschenkel-, Becken- und Rippenknochen. Der Überbegriff dieser Symptome ist Osteochondrodysplasie. Bei Osteochondrodysplasien handelt es sich um eine Gruppe von Erkrankungen, in der es genetisch bedingt zu einer Störung der Bildung und des Wachstums des Skeletts kommt, die sich in unterschiedlichsten Erscheinungsformen darstellen können. Der klinisch auffälligste Befund ist der disproportionierte Minderwuchs, aber auch Verformungen der Röhrenknochen, Skoliose, typische Gesichtsphysiognomien, Herzfehler, Fehlbildungen der Harnwege und zahlreiche andere Symptome werden beobachtet.

Ebenso wie bei den neurologischen Symptomen folgt auch bei den orthopädischen Beschwerden der Versuch einer Einordnung in die bestehenden Erkrankungen aus dem Formenkreis der Osteochondrodysplasien:

Die genetischen Ursachen der Osteochondrodysplasien sind bei einem Teil der zu diesem Formenkreis zählenden Erkrankungen bekannt. Bei einigen wurde ebenfalls wie bei dem vorliegenden Patienten der Erkrankungslocus auf dem X-Chromosom nachgewiesen. Zu dieser Gruppe gehören die Chondrodysplasia punctata mit dem Conradi-Hünemann-Syndrom und die Chondrodysplasia mit Brachytelephalangie. Bei beiden ist die genetische Ursache bekannt. Bei dem Conradi-Hünemann-Syndrom ist es eine das *EBP*-Gen betreffende Mutation, ein zentrales Gen für den Cholesterinstoffwechsel, lokalisiert im Bereich Xp11.22-23 [Traupe und Has, 2000]. Die Vererbung ist X-chromosomal dominant. Die die Erkrankungen charakterisierenden Hauptsymptome sind neben den skeletalen Dysplasien mit Minderwuchs, die Chondrodysplasia punctata, punktförmige Kalzifizierungen von Knorpelgewebe, eine transiente Ichthyosis und ein Katarakt. Da keine punktförmigen Kalzifizierungen bei dem vorliegenden Patienten nachgewiesen wurden, ist eine Zuordnung der in dieser Arbeit beschriebenen Erkrankung zu der Gruppe der Chondrodysplasia punctata nicht möglich.

Eine weitere Erkrankung aus dem Kreis der Osteochondrodysplasien, die Dysostosis multiplex Typ Mukopolysaccharidois II (Synonym: Hunter Syndrom), zeichnet sich durch eine enorme Variationsbreite der klinischen Befunde aus. Außerdem entspricht ihr Erkrankungslocus (Xq23.7-q28) [Le Guern et al., 1990] weitestgehend dem für den vorliegenden Fall ermittelten Locus (Xq25-q27). Jedoch schließt der Test auf Glykosaminoglykane im Urin unseres Patienten zur Diagnose der Mukopolysaccharidosen diese Erkrankung aus.

Es ist bei denen in dieser Arbeit geschilderten Symptomen demnach zwar eine durch die Befunde begründete Einordnung der Erkrankung unter die klinisch beschreibenden Oberbegriffe Leukoenzephalopathie und Osteochondrodysplasie möglich, doch kann keine weitere Einordnung in eine bisher bekannte bestehende Untergruppen erfolgen.

In der Literatur sind einige weitere dem hier beschriebenen Fall ähnliche Befundkonstellationen aus neurologischen und orthopädischen Symptomen bei einzelnen Patienten beschrieben:

Zanni et al. stellen 2008 eine amerikanische Familie norwegischen Ursprungs mit einer X-chromosomalen kongenitalen Ataxie vor. In dieser Arbeit werden außerdem elf weitere Fälle X-chromosomaler Ataxien tabellarisch zusammengefasst. Von den insgesamt zwölf vorgestellten Familien ist bei neun eine kongenitale Form der Ataxie beschrieben [Bertini et al., 2000; Illarioshkin et al., 1996; Pettigrew et al., 1991 etc.]. Diese angeborene Form der Ataxie unterscheidet sich deutlich von der als normal beschriebenen frühkindlichen Entwicklung bis zum zweiten Lebensjahr der hier beschriebenen Patienten. Einzig ein von Turner 1938 dokumentierter Fall einer Familie mit der Erstmanifestation der dort vorliegenden Symptome (zerebellärer Ataxie, mentale Retardierung und Skoliose) im fünften Lebensjahr, scheint zunächst dem hier vorliegenden Fall zu gleichen. Jedoch ist zusätzlich ein Nystagmus vermerkt, der bei unseren Patienten, wie in den medizinischen Befunden belegt, nicht vorliegt. Eine genetische Analyse fand in dem von Turner beschriebenen Fall nicht statt.

Auch die weitere Recherche in medizinischen Datenbanken ergab in keinem der vermerkten Fälle eine vollständige Übereinstimmung mit allen charakterisierenden Merkmalen und Hauptsymptomen der hier beschriebenen Erkrankung: X-chromosomaler Erbgang, normale frühkindliche Entwicklung, im zweiten Lebensjahr einsetzende progrediente Leukoenzephalopathie und Osteochondrodysplasie.

Es handelt sich also um ein neues Erkrankungsbild mit bislang unbekannter genetischer Ursache. Eine Analyse der im Erkrankungslocus liegenden Gene ist daher ein wichtiger Schritt zur Identifizierung der der Erkrankung zu Grunde liegenden Mutation.

4.2. Die Kandidatengene

In dieser Arbeit wurden 21 der 107 im Erkrankungslocus (Xq25-27.3) liegenden Gene mit Hilfe von PCR, gelelektrophoretischer Auftrennung und anschließender Sequenzierung auf Abweichungen in der Basenfolge untersucht. Bei 5 dieser Gene wurden insgesamt 15 Sequenzabweichungen von der humanen Referenzsequenz festgestellt. Zusammengefasst handelt es sich bei 13 der Sequenzvariationen um Basenaustausche, 9 in Exonen und 4 in angrenzenden Intronabschnitten. Bei zwei in einem Gen (*GPR112*) liegenden Variationen handelt es sich jeweils um eine Deletion zweier bzw. dreier Nukleotide. Die detaillierte Darstellung und Analyse der Sequenzabweichungen mit ihren Auswirkungen auf die Krankheitsgenese und möglichen Spleißstellenveränderungen folgt im nächsten Abschnitt.

4.2.1. Analyse der Kandidatengene

Die Kandidatengene wurden zum einen mit Hilfe des Programms *Mutation Taster* und anderen den Einfluss von Aminosäureveränderungen bewertenden Programmen auf mögliche Konsequenzen der Basenaustausche auf die Proteinfunktion und damit Krankheitsgenese untersucht. Wobei die Ergebnisse dieser Analysen keinerlei Hinweise darauf lieferten, dass die Mutationen in den untersuchten Genen als krankheitsverursachend zu werten sind. Zum anderen wurden die Kandidatengene auch mit Hilfe von Computerprogrammen auf mögliche durch Sequenzvariationen bedingte Veränderungen im Spleißprozess untersucht.

Als erster Auswertungsschritt wurden alle ermittelten Sequenzvarianten unter Nutzung des Programmes *Mutation Taster* analysiert, um die biologische Bedeutung der beobachteten genetischen Veränderung einschätzen zu können. Dies ermöglichte zunächst eine Identifizierung der bereits bekannten in Datenbanken aufgeführten SNPs. Das Programm vergleicht den eingegebenen Basenaustausch automatisch mit den Daten der NCBI SNP-Datenbank [Sherry et al., 2000] und liefert bei Übereinstimmung die entsprechende Referenz-ID (Identifikationsnummer). Im Oktober 2008 waren bereits mehr als 14 Millionen Sequenzvariationen mit Referenz-ID in der Datenbank vorhanden.

Abgesehen von den Sequenzvarianten der Gene *LOC100129230* (c.1228C>T) und *MGC16121* (c.1037G>C (p.R343P), c.1513+35C>T), denen das Programm kein Transkript zuordnen konnte, konnten alle anderen gefunden Abweichungen in der Basenabfolge von *Mutation Taster* bewertet werden; damit fließen 12 der 15 Sequenzvarianten in die Auswertung ein.

Es konnten acht dieser zwölf Sequenzvarianten eine Referenz-ID zugeordnet werden. Sie werden von dem Programm als Polymorphismus klassifiziert mit der aufgeführten Begründung „*classification due to existence of all alleles in HapMap*“. Dies bedeutet, dass in

den drei möglichen Genotypfrequenzen (AA, AB, BB) gesunder Individuen, aufgeführt in der HapMap-Datenbank, diese Sequenzvariante nachgewiesen werden konnte. Es handelt sich dabei um folgende Abweichungen beim Gen *GPR112*: c.3638C>A (p.T1213N), c.4179T>C (p.=), c.4618T>C (p.S1540P), c.5371T>C (p.F1791L), c.5493C>T (p.=), c.6927+64A>G, c.7969_7971delGAT, c.8271T>C (p.=), sowie den Basenaustausch c.721C>T (p.=) beim Gen *CCDC160*. Diese Veränderungen können damit als krankheitsverursachend ausgeschlossen werden.

Die nicht bereits als bekannte SNPs in Datenbanken aufgeführten Sequenzvarianten wurden dann im nächsten Auswertungsschritt in Hinblick auf ihre möglichen Auswirkungen auf Spleißstellen untersucht. Hierbei ist zu beachten, dass der Spleißvorgang ein hoch komplexer Ablauf aus hemmenden und unterstützenden Einflüssen intronischer und exonischer Signalsequenzen ist, der noch nicht vollständig entschlüsselt ist. Durch Sequenzveränderung von Steuerregionen im Intron oder Exon kann es neben dem „Überspringen“ von Exons zu der Aktivierung von kryptischen Spleißstellen oder der fehlerhaften Entfernung von Introns kommen mit zum Teil gravierenden Folgen, wie der Entstehung einer Erkrankung [Baralle D. und M., 2005].

92%-94% aller menschlichen Gene unterliegen einem alternativen Spleißprozess, 50% aller krankheitsverursachenden Mutationen betreffen den Spleißvorgang [Wang, E.T. et al., 2008; López-Bigas et al., 2005]. Etwa 10% aller krankheitsverursachenden Punktmutationen sind im Bereich der Intron-/Exongrenze lokalisiert [Krawczak et al., 1992]. Anhand dieser Zahlen wird deutlich, dass eine beträchtliche Anzahl an Mutationen, die einen Einfluss auf eine Krankheitsentstehung haben, im Bereich um die Grenz-Dinukleotide (AG/GT) herum liegen; sie führen etwa in *Enhancern*, *Silencern* oder bisher noch nicht bekannten aber für den Spleißvorgang relevanten Regionen zu Veränderungen.

Eine Auswertung der Sequenzvariationen in Hinblick auf ihre möglichen Auswirkungen auf Spleißstellen ist daher für alle nicht eindeutig als SNPs und damit als nicht krankheitsverursachende Polymorphismen gekennzeichnete Sequenzabweichungen sinnvoll. Die Analyse der Sequenzabweichungen in Bezug auf ihre Relevanz für die Spleißstellen erfolgt also für die drei Basenabweichungen, die vom Programm *Mutation Taster* zwar als SNPs gewertet wurden, denen aber über die NCBI SNP-Datenbank keine Referenz ID zugeordnet werden konnte (c.347-30T>G des Gens *CD40LG*, c.6823-10_11delGT und c.7911+14T>A des Gens *GPR112*), sowie für die drei Abweichungen in der Basenreihenfolge, denen kein Transkript zugeordnet werden konnte (c.1228C>T des Gens *LOC100129230*, c.1037G>C und c.1513+35C>T des Gens *MGC16121*). Alle genannten Sequenzabweichungen wurden in vier Spleißstellen vorhersagenden Programmen analysiert: *SpliceView*, *NetGene2*, *BDGP* und *HSF 2.4*. Auffallend war insgesamt die

mangelnde Übereinstimmung der in den Programmen ermittelten Ergebnisse für die jeweils eingegebenen Sequenzabweichungen.

Drei Mutationen, alle in Intronbereichen, wurden von *Mutation Taster* als Polymorphismen allerdings ohne Referenz-ID gewertet (c.347-30T>G des Gens *CD40LG*, c.6823-10_11delGT und c.7911+14T>A des Gens *GPR112*) mit p-Werten zwischen 0,711 und 0,718. Der p-Wert ist in diesem Fall die Wahrscheinlichkeit der korrekten Vorhersage. Ein p-Wert nahe 1 spricht dabei für eine hohe Wahrscheinlichkeit der korrekten Vorhersage. Auf Grund der Lage der Basenaustausche im Intronbereich erscheint es aber nötig, die Sequenzveränderungen auch in Hinblick auf die möglichen Auswirkungen auf das Spleißverhalten der entsprechenden prä-mRNA genauer zu untersuchen.

Für die Sequenzabweichung *CD40LG* (c.347-30T>G) geben sowohl *SpliceView* als auch HSF das Vorliegen eines Akzeptor an, der durch die Mutation relativ unbeeinflusst bleibt. Nur BDGP sieht diesen Akzeptor zerstört. Das Programm beziffert die Bedeutung des Akzeptors für den Spleißvorgang beim Wildtyp mit einem Wert von 0,53 aber als so gering, dass schon eine leichte Spleißstellenabschwächung den Wert unter 0,4 und damit in den nicht mehr angezeigten Bereich verändern kann, denn das Programm BDGP setzt einen Wert von 0,4 als Grenzwert zur Darstellung an. Vom Programm werden dann eventuell nur leichten Abschwächungen, die zu einem Absinken des Wertes unter den Grenzwert 0,4 führen, automatisch als *Site Broken* bzw. bei geringer Stärkung über 0,4 als *New Site* angegeben. In diesem Programm können damit Werte, die sich um den Grenzwert 0,4 bewegen, als nur bedingt aussagekräftig gewertet werden. Diese durch den Basenaustausch verursachte Modifikation kann damit als wahrscheinlich nicht relevant für die Krankheitsgenese eingestuft werden.

Für die Krankheitsentstehung eventuell bedeutender erscheint die Folge der Deletion der Basen Guanin und Thymin an Position c.6813 10 bzw. 11 Basen vor dem Exon gelegen, die beim Gen *GPR112*, das für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor kodiert, auftritt. Nach Hellen [2009] liegt die Mehrheit der pathologischen Mutationen im Intron 1 bis 10 Nukleotide von der Intron/Exon-Grenze entfernt. Dieser vulnerable Bereich wäre in diesem Fall betroffen. BDGP gibt hier mit dem Wert von 0,96 (Mutant 0,97) eine gleichbleibend starke Akzeptorstelle an, die von HSF 2.4 bestätigt wird. Dort wird aber durch die Sequenzveränderung der alte Akzeptor durch einen zwei Basen früher beginnenden ersetzt. Die ersten beiden Basen der kodierenden Region würden damit in den Akzeptorbereich integriert. Der Leserahmen würde sich durch den Wegfall zweier kodierender Basen verschieben. In unserem Fall hätte das entweder den Verlust des kompletten fünften Exons (22 Aminosäuren) oder die Kodierung anderer Aminosäuren zur Folge. In beiden Fällen wären Auswirkungen auf Proteinebene zu erwarten. Es könnte zu einem kompletten Ausfall

des Proteins kommen, zu einer verminderten Produktion oder einer Veränderung seiner Funktion. Die klinische Relevanz für die Patienten durch diese Verschiebung ist schwer vorherzusagen. Außerdem bleibt zu beachten, dass nur ein Programm diese Verschiebung der Akzeptorstelle überhaupt vorhergesagt hat. Wenn Analyseprogramme verwendet werden, ist, damit eine sinnvolle Interpretation getroffen werden kann, eine Übereinstimmung von mindestens drei Vorhersageprogrammen nötig [*Best practice guidelines for the interpretation and reporting of Unclassified Variants (UVs)*. Bell et al., 2007].

Als auch eher unsichere Aussage ist die Vorhersage für den Basenaustausch T>A 14 Basen nach dem dreizehnten Exon an Position c.7911 des Gens *GPR112* zu werten. HSF sagt hier das Entstehen eines neuen Akzeptors voraus, was bei der Lage 14 Basen nach aber 4342 Basen vor dem nächsten Exon unwahrscheinlich erscheint. Die von BDGP vorhergesagte Donorstelle ist zwar passender, jedoch ist der Wert mit 0,52 niedrig und kein anderes Programm ermittelt diese Spleißstelle, was die Aussage wenig valide macht.

Die einzige Sequenzveränderung, der von *Mutation Taster* die Vorhersage „*disease causing*“ mit einem p-Wert von 1 zugeordnet wurde, ist die Deletion der Basen Guanin, Adenin und Thymin im Exonbereich des Gens *GPR112*. Dieses Gen ist mit 23 Exons das größte in dieser Arbeit untersuchte. Es kodiert für einen G-Protein gekoppelten Rezeptor und ist damit ein wichtiger Bestandteil der Signalübertragung in menschlichen Zellen. Dieser Rezeptor ist sowohl in „normalen“ enterochromaffinen Zellen als auch in gastrointestinalen neuroendokrinen Karzinomzellen nachweisbar [Leja et al., 2009]. Die Mutation c.7969_7971delGAT führt zum Ausfall der Aminosäure Asparaginsäure im vom Gen *GPR112* kodierten Protein. Diese Sequenzvariation wird aber gleichzeitig als bekannter SNP angegeben mit der Referenz-ID rs3030295. Ursache für die Aussage „*disease causing*“ ist in diesem Fall eine Ungenauigkeit in der Auswertung des Programmes. *Mutation Taster* deklariert Sequenzveränderungen automatisch als krankheitsverursachend, wenn sie zu einer Positionsveränderung des Stopcodons führen. Alle Sequenzvariationen denen ein Verlust dreier Basen zu Grunde liegt, werden somit als „*disease causing*“ gewertet. Als endgültige Bewertung bleibt dann bei dieser Mutation die Einordnung als bekannter Polymorphismus mit angegebener Referenz-ID.

Für zwei putativ Protein kodierende Gene betroffen von drei Sequenzabweichungen ist dem Programm *Mutation Taster* kein entsprechendes Transkript bekannt. Dies ist dann der Fall, wenn in der *Ensembl Genome Browser* Datenbank kein Transkript aufgeführt ist bzw. das zugeschriebene Transkript noch nicht in die neueste Version des *Mutation Taster* Programmes übernommen wurde (die Ensembl-Datenbank liegt in der Version 56 vor, *Mutation Taster* nutzt die Version 55 der Ensembl-Datenbank). Die erste Möglichkeit trifft auf das Gen *LOC100129230* mit dem Austausch der Base Cytosin gegen Thymin und der

daraus folgenden Änderung der ins Protein eingebauten Aminosäure von Arginin zu Tryptophan zu. Das Gen ist in der Ensembl-Datenbank nicht vorhanden. Die Datenbank beruht auf den Informationen der EMBL-Daten (*European Molecular Bioinformatic Laboratory*), der UniProt (*Universal Protein Resource*) und der NCBI-RefSeq (*Reference Sequence*)-Datenbank. Die EMBL- und UniProt-Programme liefern zu dem Gen keine Ergebnisse und NCBI beschreibt das Genprodukt von *LOC100129230* zwar noch als „*hypothetical protein*“. Jedoch gibt das Programm datiert auf den Juni 2009 an: „*This record was discontinued.*“ Es handelt sich also um ein putatives Protein kodierendes Gen, dessen Genprodukt bisher noch nicht nachgewiesen werden konnte. Passend dazu gibt auch diese Datenbank ebenso wie EMBL und UniProt keine dieses Gen betreffenden Resultate an, wenn man die Suchmaske auf das Anzeigen aktueller Ergebnisse (*current records*) beschränkt. Zieht man ergänzend die Ergebnisse der PolyPhen (benigne) und PhD-SNP (neutral) Datenbanken hinzu, dann kann eine tragende Rolle der Mutation c.1228C>T (p.R408W) für die Krankheitsgenese ausgeschlossen werden. Gleichzeitig ist dieses Gen auch das einzige der untersuchten Basenveränderungen, deren Sequenzvariante übereinstimmend von allen vier Programmen keine Auswirkungen auf die Spleißstellen vorhergesagt wird.

Auch dem putativen Protein kodierenden Gen *MGC16121* mit den Mutationen c.1037G>C (p.R343P) und c.1513+35C>T wird von *Mutation Taster* kein Transkript zugeordnet. Dies hat allerdings eine andere Ursache. Ensembl gibt für das Gen zwar fünf Transkripte an, jedoch werden diese alle als „*novel processed transcripts*“ typisiert und als Vorhersagemethode wird „*manually annotated transcripts (determined on a case-by-case basis) from the Havana project*“ angegeben. Dies bedeutet, dass keine Übereinstimmungen mit den oben genannten Datenbanken gefunden wurden, auf die *Mutation Taster* über Ensembl zugreifen kann. Stattdessen wurden die Transkripte ausschließlich durch eine manuelle Sichtung im Rahmen des Havana-Projektes, einer Untergruppe der *Vertebrate Genome Annotation* (VEGA) Datenbank, ermittelt. Die zusätzliche Eingabe der im Exon liegenden Sequenzvariante (c.1037G>C) mit dem daraus folgenden Aminosäureaustausch (p.R343P) des Gens *MGC16121* in andere Vorhersageprogramme für die biologische Bedeutung von Aminosäureveränderungen ergab für die betroffene Mutation in PolyPhen die Bewertung benigne (gutartig) und in SNAP die Vorhersage neutral. So kann der Aminosäureaustausch in diesem Gen als Ursache der hier vorliegenden Erkrankung ausgeschlossen werden. Jedoch ergibt bei diesem Gen die Auswertung sowohl der im Intron (1513+35C>T) als auch der im Exon liegende Sequenzvariante in Hinblick auf ihren Einfluss auf die Spleißstellen ein für die Krankheitsgenese eventuell bedeutendes Ergebnis. Denn die meisten Übereinstimmungen der Programme und damit auch die als am sichersten zu bewertenden

Vorhersagen finden sich bei den Sequenzabweichungen des Gens *MGC 16121*. Hier kommt es zum einem durch einen Basenaustausch im fünften Exon (c.1037G>C) und zum anderen durch eine Sequenzveränderung 35 Basen nach Beendigung des sechsten Exon (c.1513+35C>T) zu dem vorausgesagten Entstehen neuer Spleißstellen.

Die im Exon liegende Veränderung ist mit der Position 266 Basen vom Anfang und 347 Basen vor dem Ende des Exons mittig im Exon angesiedelt. Sowohl *SpliceView* als auch *NetGene2* geben eine neue Akzeptorstelle an und HSF unterstützt diese Aussage mit einer deutlichen Zunahme der den Akzeptorstellen zugeordneten ermittelten Scores, die in beiden Fällen mit einem Anstieg auf über 80 die von Desmet [2009] angegebene Schwelle für eine starke Spleißstelle überschreiten. Sich beziehend auf Hellen [2009] macht die Lokalisation der Sequenzabweichung eine Auswirkung auf den Spleißprozess unwahrscheinlich, da Varianten, die mehr als 10 Basen vom Exon/Intron-Übergang entfernt liegen, selten eine bedeutende Signalveränderung verursachen. Das pathogene Potential von exonischen Sequenzveränderungen hängt also maßgeblich von deren genauer Lokalisation im Exon ab. Aber neben der direkten Veränderung der Intron/Exon-Grenz (GT-/AG-)Region, werden eine steigende Anzahl von Erkrankungen auf Sequenzveränderungen in Steuerregionen der Exone (*Exonic Splicing Enhancer*, ESE bzw. *Silencer*, ESS) zurückgeführt [Cartegni et al., 2002; Wang, G.S. und Cooper, 2007]. Die spinale Muskelatrophie etwa wird durch einen Basenaustausch (C zu T) im sechsten Nukleotid des siebten Exons verursacht, was zu dem Überspringen des Exons und folgend zu einer Produktion eines inaktiven Proteins führt [Monani et al., 1999; Lorson et al., 1999]. Als Ursache für das Auslassen des Exons werden nach neuesten Arbeiten zwei Modelle diskutiert. Eines, in dem die Mutation zu einem neuen ESS führt und eines, in dem sie zu einem Verlust der ESE führt [Kashima et al., 2003]. Eine Eingabe der hier vorliegende Mutation c.1037G>C im Gen *MGC16121* in das ESE-Vorhersageprogramm *RESCUE-ESE* [Fairbrother et al., 2002] ergab jedoch, dass keine Steuerstelle in der vom Basenaustausch betroffenen Region liegt.

Bei der vorliegenden Sequenzvariante ist außerdem grundsätzlich fraglich, ob es sich bei der neu entstandenen Akzeptorstelle nicht nur um eine Pseudo-Spleißstelle handelt. Alle genutzten Programme können nicht zwischen den für den Spleißvorgang nicht relevanten Pseudo-Stellen und tatsächlich genutzten kryptischen Spleißstellen unterscheiden. Bei der exemplarischen Untersuchung eines Gens, in diesem Fall des *HTPR*-Gens, in der Arbeit von Sun und Chasin [2000] kamen auf 8 „echte“ Spleißstellen über 100 Pseudo-Spleißstellen, deren vom Programm ermittelte Werte höher waren als der niedrigste der authentischen Spleißstelle. Kryptische Spleißstellen werden aber nur dann genutzt, wenn die ursprüngliche Spleißstelle durch eine Mutation ihre Funktion verloren hat [Roca et al., 2003].

Wenn der neu entstandene alternative Akzeptor tatsächlich im Spleißprozess genutzt werden würde, wären zwar Konsequenzen für das kodierte Protein wahrscheinlich. Im Fall des betroffenen Gens *MGC16121* ist aber zum Zeitpunkt dieser Arbeit nicht klar, ob dieses überhaupt proteinkodierend ist (*hypothetical protein* laut NCBI-Datenbank), was auch die Bewertung der Auswirkungen der ebenfalls in diesem Gen liegenden zweiten Sequenzabweichung (c.1513+35C>T) schwierig macht.

Die aufgeführte intronische Sequenzvariante 35 Basen nach Beendigung des sechsten Exon (c.1513+35C>T) des Gens *MGC16121* führt laut *Splice View* und BDGP zu der Entstehung einer neuen Donorstelle. HSF 2.4 bestätigt diese Vorhersage.

Genauso wie im Exon liegende Sequenzvarianten können auch im Intron lokalisierte Sequenzveränderungen außerhalb der festgelegten GT und AG Dinukleotide zum Ausschalten von Exons, Aktivierung von kryptischen Spleißstellen und dem Bestehenbleiben von Introns führen. Selbst Punktmutationen tausende Basen vom Exon entfernt und damit tief im Intron liegend, wie zum Beispiel bei der Muskeldystrophie Typ Becker und Duchenne festgestellt, können hohe Krankheitsrelevanz besitzen, indem sie in diesem Fall durch die Integration von intronischen Sequenzen zu Pseudoexons führen [Gurvich et al., 2008].

Das Entstehen einer neuen Donorstelle kann bei dem gleichzeitigen Vorhandensein einer passenden stromabwärts liegenden Akzeptorstelle zum Einbau dieses Abschnittes im Rahmen des Spleißvorganges und damit zu der Entstehung einer verlängerten reifen mRNA führen. In dem hier vorliegenden Fall könnte der Abschnitt zwischen der durch die Punktmutation entstandenen Donorstelle und einem 174 Basen stromaufwärts liegenden Akzeptor (vom Programm HSF 2.4 mit einem sehr hohen Score von 90,69 angegeben) zu einer um 174 Nukleotide verlängerten mRNA führen.

Zusammenfassend ist die Konsequenz, die aus den beschriebenen Sequenzvariationen erwächst schwer vorherzusagen. Denn obwohl das Wissen über die Spleißprozesse zunimmt, sind viele an diesem Vorgang beteiligte Faktoren noch nicht bekannt. Auch deshalb sind die zur Auswertung zur Verfügung stehenden Computerprogramme noch nicht ausreichend valide. Daher gibt es zwei Möglichkeiten, um die Pathogenität der Sequenzvariationen abschließend beurteilen zu können. Es kann entweder direkt mRNA aus den Blutzellen oder über eine Hautbiopsie gewonnen werden. Es kann aber auch über die Konstruktion von Minigenen des Wildtyps und des mutierten Typs, in die der nachgewiesene Basenaustausch eingebracht wird, beurteilt werden, ob die Sequenzvariante Einfluss auf den Spleißprozess hat.

Da der dieser Arbeit zu Grunde liegende Indexpatient zwischenzeitlich verstorben ist, müsste zur Blutabnahme bzw. Hautbiopsie der jüngere Bruder (IV.6), bei dem die gleichen Symptome beschrieben sind, herangezogen werden. Sowohl aus den durch die Hautbiopsie

gewonnenen Fibroblasten als auch aus den nukleären Zellen des peripheren Blutes kann dann RNA extrahiert werden, die in einer Reverse-Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion (RT-PCR) zunächst in cDNA umgeschrieben und anschließend amplifiziert wird. Das gewonnene Produkt lässt sich dann gelelektrophoretisch auftrennen und sequenzieren. Bei einer Auswirkung der Sequenzvarianten auf den Spleißprozess wäre eine durch die Mutation modifizierte Sequenz zu erwarten, die sich in der Basenfolge von der humanen Referenzsequenz unterscheidet.

Wenn der Bruder weder zu einer Hautbiopsie noch zu einer Blutabnahme zur Verfügung stünde, wäre die Konstruktion von Minigenen zur Analyse der Auswirkung der Sequenzvarianten möglich. Hierzu wird entweder das von der Sequenzvariante betroffene Exon etwa bei der Mutation c.1037G>C oder das Intron (c.1513+35C>T) des Gens *MGC16121* und die flankierenden Regionen zunächst mittels PCR amplifiziert. Anschließend wird das Produkt in einen Minigen-Vektor transferiert und mittels transienter Transfektion in kultivierte Zellen übertragen. Gleichzeitig wird auch ein Wildtyp-Minigen als „Kontroll-Minigen“ konstruiert. Über Amplifikation mittels RT-PCR, gelelektrophoretischer Auftrennung und Sequenzierung können dann die Spleiß-Ergebnisse beider Minigene miteinander verglichen werden. Der Nachteil dieser Methode gegenüber der direkten RNA-Gewinnung durch eine Hautbiopsie oder Blutentnahme ist, dass die genutzte fremde Zellkultur unter Umständen nicht vollständig die regulierenden Spleißprozesse des betroffenen Gewebes wiedergibt [Gaildrat et al., 2010].

Wenn die Auswertung der aufgeführten Sequenzvarianten, denen ein möglicher Einfluss auf den Spleißprozess zugesprochen wurde (insbesondere *MGC16121* mit c.1037G>C und c.1513+35C>T) ergeben sollte, dass der Spleißprozess trotz der aufgeführten Punktmutationen unverändert ablaufen kann, so liegt kein weiterer Hinweis dafür vor, dass die in dieser Arbeit untersuchten 21 Gene mit den festgestellten Sequenzabweichungen eine Rolle in der Krankheitsgenese spielen. Da jedoch noch sechzehn weitere Gene im Erkrankungslocus liegen, ist, bis zur abschließenden Analyse aller Gene, die Bedeutung möglicher genetischer Veränderungen in der Entstehung der Leukoenzephalopathie und Chondrodysplasie der in dieser Arbeit beschriebenen Patienten als ungeklärt zu betrachten.

5. Zusammenfassung

Das Ziel dieser Arbeit war es die genetische Grundlage einer bisher unbekanntem Erkrankung zu identifizieren. Diese ist gekennzeichnet durch die Symptome einer Leukoencephalopathie und Osteochondrodysplasie. Die Einordnung der neurologischen und orthopädischen Symptome in ein bereits bekanntes Krankheitsbild war nicht möglich. Die Krankheit tritt in einer Familie bei vier männlichen Familienmitgliedern auf. Drei der Patienten waren zum Zeitpunkt der Erstellung dieser Doktorarbeit bereits verstorben.

In der Arbeit von Neubauer et al. [2006], der die gleiche Familie als Grundlage dient, wurde der Erkrankungslocus durch eine Kopplungsanalyse auf den Bereich Xq25-q27.3 eingegrenzt. In diesen Bereich liegen 107 Gene, davon sind 38 Gene Pseudogene. 39 Kandidatengene mit 213 Exons wurden auf Grund ihrer Funktion im Muskel- bzw. Gehirnstoffwechsels bereits in der erwähnten Arbeit untersucht. Eine die Krankheit auslösende Genveränderung konnte hierbei nicht gefunden werden [Neubauer et al., 2006].

In der vorliegenden Arbeit wurden weitere 21 Gene, die im Erkrankungslocus Xq25-q27.3 liegen, mit insgesamt 114 Exons und den unmittelbar angrenzenden Intronabschnitten auf eine der Erkrankung zugrunde liegende genetische Veränderung hin untersucht. Bei fünf der untersuchten Gene wurden insgesamt 15 Sequenzabweichungen von der humanen Referenzsequenz festgestellt. Alle Sequenzvarianten wurden mit dem Programm *Mutation Taster* auf ihr pathogenes Potential untersucht. Die Ergebnisse der Analyse lieferten keinerlei Hinweise darauf, dass die Mutationen in den untersuchten Genen als krankheitsverursachend zu werten sind. Zusätzlich wurden sämtliche Sequenzabweichungen in vier Spleißstellenveränderungen vorhersagende Programme (*SpliceView*, *NetGene2*, *BDGP*, *HSF 2.4*) eingegeben. Es ergab sich hier eine Schwierigkeit in der Auswertung und der anschließenden Bewertung durch die in den einzelnen Programmen sehr voneinander abweichenden Vorhersagen. Insgesamt hatten die Sequenzabweichungen c.1037G>C und c.1513+35C>T des Gens *MGC16121* die meisten Übereinstimmungen in der Auswertung der Programme und waren damit auch die am sichersten zu bewertenden Vorhersagen. Die im Exon dieses Gens lokalisierte Veränderung (c.1037G>C) führt dabei laut Aussage dreier Programme (*SpliceView*, *BDGP*, *HSF 2.4*) zu der Entstehung einer neuen Akzeptor-Spleißstelle. Die intronische Sequenzvariante (c.1513+35C>T) führt laut *SpliceView* und *BDGP* zu der Entstehung einer neuen Donor-Spleißstelle. Die Konsequenz, die aus den Sequenzvarianten erwächst, ist alleine durch die Auswertung von Computer generierten Vorhersagen nicht möglich. Zur abschließenden Klärung der Pathogenität der Sequenzabweichungen kann entweder direkt aus einer Hautbiopsie oder aus Blutzellen des Patienten gewonnene mRNA oder die Konstruktion von Minigenen dienen. Beide Varianten erlauben eine Beurteilung der möglichen Auswirkungen der Spleißstellenveränderungen.

Da außerdem noch 16 weitere in dieser Arbeit nicht untersuchte Gene in dem ermittelten Erkrankungslocus liegen, ist, bis zur abschließenden Analyse aller Gene, die Bedeutung möglicher genetischer Veränderungen auf die Entstehung der Leukoenzephalopathie und Chondrodysplasie der in dieser Arbeit beschriebenen Patienten als ungeklärt zu betrachten.

6. Literaturverzeichnis

Aubourg, P. (2007). X-linked adrenoleukodystrophy. *Ann Endocrinol* **68**(6), 403-411.

Baralle, D., Baralle, M. (2005). Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet.* **42**, 737-748.

Bell, J., Bodmer, D., Sisternans, E., Ramsden, S. (2007). Practice guidelines for the interpretation and reporting of unclassified variants in clinical molecular genetics. http://cmgs.org/BPGs/pdfs/current_bpgs/UV_GUIDELINES_ratified.pdf

Bertini, E., des Portes, V., Zanni, G., Santorelli, F., Dionisi-Vici, C., Vicari, S., Fariello, G., Chelly, J. (2000). X-linked congenital ataxia: a clinical and genetic study. *Am J Med Genet.* **92**(1), 53-56.

Bromberg, Y., Rost, B. (2007). SNAP: predict effect of non-synonymous polymorphisms on function. *Nucleic Acids Res.* **35**(11), 3823-3835.

Brunak, S., Engelbrecht, J., Knudsen, S. (1991). Prediction of human mRNA donor and acceptor sites from the DNA sequence. *J Mol Biol.* **220**(1), 49-65.

Burset, M., Seledtsov, I.A., Solovyev, V.V. (2000). Analysis of canonical and non-canonical splice-sites in mammalian genomes. *Nucleic Acids Res.* **28**, 4364-4375.

Capriotti, E., Calabrese, R., Casadio, R. (2006). Predicting the insurgence of human genetic diseases associated to single point protein mutations with support vector machines and evolutionary information. *Bioinformatics* **22**(22), 2729-2734.

Cartegni, L., Chew, S.L., Krainer, A.R. (2002). Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet.* **3**(4), 285-298.

Desmet, F.O., Hamroun, D., Lalande, M., Collod-Bérout, G., Claustres, M., Bérout, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* **37**(9), e67.

Fairbrother, W.G., Yeh, R.F., Sharp, P.A., Burge, C.B. (2002). Predictive identification of exonic splicing enhancers in human genes. *Science* **297**(5583), 1007-1013.

Fu, X.D. (2004). Towards a splicing code. *Cell* **119**, 736-738.

Gärtner, J., Kohlschütter, A., Gieselmann, V. (2007). Leukodystrophies: disease of white matter of the nervous system. *Bundesgesundheitsblatt Gesundheitsforschung Gesundheitsschutz*. **50**(12), 1531-1540.

Gaidrat, P., Killian, A., Martins, A., Tournier, I., Frébourg, T., Tosi, M. (2010). Use of splicing reporter minigene assay to evaluate the effect on splicing of unclassified genetic variants. *Methods Mol Biol*. **653**, 249-257.

Gurvich, O.L., Tuohy, T.M., Howard, M.T., Finkel, R.S., Medne, L., Anderson, C.B., Weiss, R.B., Wilton, S.D., Flanigan, K.M. (2008). DMD pseudoexon mutations: splicing efficiency, phenotype and potential therapy. *Ann Neurol*. **63**(1), 81-89.

Hall, C.M. (2002). International nosology and classification of constitutional disorders of bone (2001). *Am J Med Genet*. **113**(1), 65-77.

Hellen, B. (2009). Splice Site Tools-A comparative Analysis Report. *National Genetics Reference Laboratory*.

Illarioshkin, S.N., Tanaka, H., Markova, E.D., Nikolskaya, N.N., Ivanova-Smolenskaya, I.A., Tsuji, S. (1996). X-linked nonprogressive congenital cerebellar hypoplasia: clinical description and mapping to chromosome Xq. *Ann Neurol*. **40**(1), 75-83.

Inkson, C.A., Ono, M., Bi, Y., Kuznetsov, S.A., Fisher, L.W., Young, M.F. (2009). The potential functional interaction of biglycan and WISP-1 in controlling differentiation and proliferation of osteogenic cells. *Cells Tissues Organs* **189**(1-4), 153-157.

Kashima, T., Manley, J.L. (2003). A negative element in SMN2 exon 7 inhibits splicing in spinal muscular atrophy. *Nat Genet*. **34**(4), 460-463.

Kemp, K., Mallam, E., Scolding, N., Wilkins, A. (2010). Stem cells in genetic myelin disorders. *Regen Med*. **5**(3), 425-439.

Kornak, U., Mundlos, S. (2003). Genetic disorders of the skeleton: a developmental approach. *Am J Hum Genet*. **73**(3), 447-474.

- Krawczak, M., Reiss, J., Cooper, D.N. (1992).** The mutational spectrum of single base-pair substitutions in mRNA splice junctions of human genes: causes and consequences. *Hum Genet.* **90**(1-2), 41-54.
- Le Guern, E., Couillin, P., Oberlé, I., Ravise, N., Boue, J. (1990).** More precise localization of the gene for Hunter syndrome. *Genomics* **7**(3), 358-362.
- Leja, J., Essaghir, A., Essand, M., Wester, K., Oberg, K., Tötterman, T.H., Lloyd, R., Vasmatzis, G., Demoulin, J.B., Giandomenico, V. (2009).** Novel markers for enterochromaffin cells and gastrointestinal neuroendocrine carcinomas. *Mod Pathol* **22**(2), 261-272.
- López-Bigas, N., Audit, B., Ouzounis, C., Parra, G., Guigó, R. (2005).** Are splicing mutations the most frequent cause of hereditary disease? *FEBS Lett.* **579**(9), 1900-1903.
- Lorson, C.L., Hahnen, E., Androphy, E.J., Wirth, B. (1999).** A single nucleotide in the SMN gene regulates splicing and is responsible for spinal muscular atrophy. *Proc Natl Acad Sci USA* **96**(11), 6307-6311.
- Mattei, M.G., Alliel, P.M., Dautigny, A., Passage, E., Pham-Dinh, D., Mattei, J.F., Jollès, P. (1986).** The gene encoding for the major brain proteolipid (PLP) maps on the q-22 band of the human X chromosome. *Hum Genet.* **72**(4), 352-353.
- Monani, U.R., Lorson, C.L., Parson, D.W., Prior, T.W., Androphy, E.J., Burghes, A.H., McPherson, J.D. (1999).** A single nucleotide difference that alters splicing patterns distinguishes the SMA gene SMN1 from the copy gene SMN2. *Hum Mol Genet.* **8**(7), 1177-1183.
- Neubauer, B.A., Stefanova, I., Hübner, C.A., Neumaier-Probst, E., Bohl, J., Oppermann, H.C., Stö, H., Hahn, A., Stephani, U., Kohlschütter, A., Gal, A. (2006).** A new type of leukoencephalopathy with metaphyseal chondrodysplasia maps to Xq25-q27. *Neurology* **67**(4), 587-591.
- Pettigrew, A.L., Jackson, L.G., Ledbetter, D.H. (1991).** New X-linked mental retardation disorder with Dandy-Walker malformation, basal ganglia disease and seizure. *Am J Genet.* **38**(2-3), 200-207.

Ramensky, V., Bork, P., Sunyaev, S. (2002). Human non-synonymous SNPs: server and survey. *Nucleic Acids Res.* **30**(17), 3894-3900.

Reese, M.G., Eeckman, F.H., Kulp, D., Haussler, D. (1997). Improved splice site detection in Genie.

J Comput Biol. **4**(3), 311-323.

Roca, X., Sachidanandam, R., Krainer, A.R. (2003). Intrinsic differences between authentic and cryptic 5' splice sites. *Nucleic Acids Res.* **31**(21), 6321-6333.

Rogozin, I.B., Milanesi, L. (1997). Analysis of donor splice sites in different eukaryotic organisms. *J Mol Evol.* **45**(1), 50-59.

Schwarz, J.M., Rödelberger, C., Schuelke, M., Seelow, D. (2010). Mutation Taster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. *Nat Methods.* **7**(8), 575-576.

Sherry, S.T., Ward, M., Sirotkin, K. (2000). Use of molecular variation in the NCBI dbSNP database. *Hum Mutat.* **15**(1), 68-75.

Spranger, J. (1992). International classification of osteochondrodysplasias. The International Working Group on Constitutional Diseases of Bone. *Eur J Pediatr.* **151**(6), 407-415.

Stenson, P.D., Ball, E.V., Mort, M., Phillips, A.D., Shiel, J.A., Thomas, N.S., Abeyasinghe, S., Krawczak, M., Cooper, D.N. (2003). Human Gene Mutation Database (HGMD): 2003 update. *Hum Mutat* **21**, 577-581.

Sun, H., Chasin, L.A. (2000). Multiple splicing defects in an intronic false exon. *Mol Cell Biol.* **20**(17), 6414-6425.

Superti-Furga, A., Bonafé, L., Rimoin, D.L. (2001). Molecular-pathogenetic classification of genetic disorders of the skeleton. *Am J Med Genet.* **106**(4), 282-293.

Thomas, P.D., Kejariwal, A., Campbell, M.J., Mi, H., Dimer, K., Guo, N., Ladunga, I., Ulitsky-Lazareva, B., Muruganujan, A., Rabkin, S., Vandergriff, J.A., Doremieux, O. (2003). PANTHER: a browsable database of gene products organized by biological function, using curated protein family and subfamily classification. *Nucleic Acids Res.* **31**(1), 334-341.

Tian, J., Wu, N., Guo, X., Zhang, J., Fan, Y. (2007). Predicting the phenotypic effects of non-synonymous single nucleotide polymorphisms based on support vector machines. *BMC Bioinformatics* **8**, 450.

Traupe, H., Has, C. (2000). The Conradi-Hünemann-Happle syndrome is caused by mutations in the gene that encodes a 8-7 sterol isomerase and is biochemically related to the CHILD syndrome. *Eur J Dermatol.* **10**(6), 425-428.

Turner, E.V., Roberts, E. (1938). A family with a sex-linked hereditary ataxia. *J Nerv Ment Dis* **97**, 74-80.

Wang, E.T., Sandberg, R., Luo, S., Khrebtkova, I., Zhang, L., Mayr, C., Kingsmore, S.F., Schroth, G.P., Burge, C.B. (2008). Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. *Nature* **456**(7221), 470-476.

Wang, G.S., Cooper, T.A. (2007). Splicing in disease: disruption of the splicing code and the decoding machinery. *Nat Rev Genet.* **8**(10), 749-761.

Willard, H.F., Riordan, J.R. (1985). Assignment of the gene for myelin proteolipid protein to the X chromosome: implications for X-linked myelin disorders. *Science* **230**(4728), 940-942.

Zanni, G., Bertini, E., Bellcross, C., Nedelec, B., Froyen, G., Neuhäuser, G., Opitz, J.M., Chelly, J. (2008). X-linked congenital ataxia: a new locus maps to Xq25-q27.1. *Am J Med Genet A.* **164A**(5), 593-600.

7. Danksagung

An dieser Stelle möchte ich allen danken, die mir das Verfassen dieser Promotion ermöglicht haben:

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Stefan Kindler für die hervorragende Betreuung. Sein Fachwissen, seine stete Hilfsbereitschaft und konstruktive Kritik haben maßgeblich zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Bedanken möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. Andreas Gal, der es mir ermöglicht hat meine Promotion am Institut für Humangenetik zu verfassen.

Allen Mitarbeitern des Instituts danke ich für ihre freundliche Aufnahme und ihre Unterstützung.

Weiterhin möchte ich Frau Prof. Dr. rer. nat. Kerstin Kutsche für ihre Hilfe und geduldige Beantwortung zahlreicher Fragen danken.

Der gesamten Arbeitsgruppe Kindler möchte ich für die freundliche Einarbeitung, Betreuung und angenehme kollegiale Atmosphäre danken.

Meine Dankbarkeit gilt im Besonderen den Patienten und ihrer Familie, die ihr Einverständnis zu dieser Arbeit gegeben haben. Genauso möchte ich auch denen danken, die mir die klinischen Daten und die DNA zur Verfügung gestellt haben.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern und Henrik Schmutzler danken, die mich unterstützend und verständnisvoll durch die gesamte Promotionszeit begleitet haben.

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Gabriela Banneck
Geburtsdatum	19.09.1983
Geburtsort	Kiel
Adresse	Erzbergerstraße 8, 22765 Hamburg
E-Mail	Elli.banneck@gmx.de

Berufserfahrung/Praktika/Berufliche Tätigkeiten

Seit 04.2011	Assistenzärztin an der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie, Asklepios Klinikum Wandsbek
11.2010-02.2011	Assistenzärztin an der Klinik für Strahlentherapie, Universitätsklinikum Hamburg Eppendorf

Praktisches Jahr

12.2009-02.2010	Chirurgie, Diakonie Klinikum Alten Eichen, Hamburg
10.2009-12.2009	Chirurgie, Mater Dei Hospital, Malta
08.2009-10.2009	Neurologie, Albertinen Krankenhaus, Hamburg
06.2009-08.2009	Neurologie, ev. Krankenhaus Alsterdorf, Hamburg
04.2009-06.2009	Innere Medizin, Kardiologie, Concord Repatriation Hospital, Sydney
02.2009-04.2009	Innere Medizin, Onkologie, Marienkrankenhaus, Hamburg

Famulaturen

09.2007	Onkologie, Krankenhaus der Barmherzigen Schwestern, Linz
05.2007	Psychiatrie, Uniklinikum Eppendorf, Hamburg
04.2007	Neurologie, Albertinen Krankenhaus, Hamburg

09.2006	Gastroenterologische Praxis, Hamburg
Promotion	
09.2008-03.2011	Experimentelle Doktorarbeit am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg Eppendorf, Titel „X-chromosomal vererbte Leukoenzephalopathie und Chondrodysplasie – vier Erkrankte, eine Familie.“
Zusätzliche berufliche Erfahrung	
2005-2006	Studentische Hilfskraft beim IFT- Nord Institut für Therapie und Gesundheitsforschung GmbH
2000-2003	Ausbildung und Mitarbeit am Kinder- und Jugendtelefon „Impuls“ als Telefonberaterin
Hochschulausbildung	
06.2010	2. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2006-2010	Studium der Humanmedizin an der Universität Hamburg
03.2006	1. Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003-2006	Studium der Humanmedizin an der Christian-Albrechts-Universität, Kiel
Schulbildung	
1990-2003	Grundschule und Gymnasium in Kiel

9. Eidesstattliche Versicherung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift: