# UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Aus dem Institut für Humangenetik des Zentrums für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin

kommiss. Leitung Prof. Dr. med. Kurt Ullrich

# Molekulargenetische und molekularzytogenetische Analysen bei Patienten mit Gehirnfehlbildungen: Sequenzanalyse des JAKMIP1-Gens und Bruchpunktkartierung bei drei Patienten mit Chromosomentranslokationen

### Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Zahnmedizin an der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

vorgelegt von:

Magdalena Mermela aus Oldenburg in Holstein

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 31. März 2014

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende:	Prof. Dr. Kerstin Kutsche
Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in:	PrivDoz. Dr. Gökhan Uyanik
Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in:	Prof. Dr. Katrin Lamszus

# Inhaltsverzeichnis

<u>I</u>	Arbeitshypothese und Fragestellung	1
II	Einleitung	2
1	Chromosomale Rearrangements als Hilfsmittel zur	
	Identifizierung neuer Krankheitsgene	2
2	Positionseffekt	4
3	Kortikogenese	7
4	Neuronale Migrationsstörungen	10
	<ul> <li>4.1 Heterotopien</li> <li>4.2 Lissenzephalie</li> <li>4.2.1 Klassische Lissenzephalie</li> <li>4.2.2 Lissenzephalie mit zerebellärer Hypoplasie (LCH)</li> <li>4.2.3 X-chromosomale Lissenzephalie mit abnormen Genitalien (XLAG)</li> <li>4.2.4 Mikrolissenzephalie</li> </ul>	12 13 13 15 16 16
	4.3 "Cobblestone"-Lissenzephalie	17
5	Das JAKMIP1-Gen	18
III	Material und Methoden	20
1	Patienten	20
	<ol> <li>Patienten mit chromosomalen Rearrangements</li> <li>Patienten für die Sequenzanalyse von <i>JAKMIP1</i></li> </ol>	20 20
2	Chemikalien und Lösungsmittel	20
3	Kits, Enzyme und Nukleinsäuren	21
4	Medien, Zusätze, Puffer und Lösungen	21
	<ul> <li>4.1 Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten</li> <li>4.2 PCR-Puffer</li> <li>4.3 Puffer und Lösungen für die Agarose-Gelelektrophorese</li> <li>4.4 Puffer und Lösungen für die</li> </ul>	21 22 22
	<ul> <li>4.5 Sonstige Puffer</li> </ul>	22 22
5	Gerätschaften	23
6	Oligonukleotide für die Sequenzanalyse des Genes JAKMIP1	24
7	BAC- und Fosmid-Klone	24
	<ul> <li>7.1 BAC-Klone aus der Region 1p35.3-p34.</li> <li>7.2 BAC-Klone aus der Region 4q12-q13.1</li> <li>7.3 BAC- und Fosmid-Klone aus der Region 7p12.2-p11.2 und 7q36.3</li> </ul>	25 25 26

	<ul><li>7.4 BAC- und Fosmid-Klone aus der Region 9q34.13-q34.3</li><li>7.5 BAC-Klone aus der Region 17p13.3-p13.2</li></ul>	26 27
8	Molekularbiologische Methoden	27
	<ul> <li>8.1 Amplifikation von genomischer DNA</li> <li>8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)</li> <li>8.3 Agarosegelelektrophorese</li> <li>8.4 Aufreinigung von PCR-Produkten</li> <li>8.5 DNA-Sequenzierung</li> <li>8.6 Isolierung von BAC-DNA aus <i>E.coli</i></li> <li>8.7 Restriktionsanalyse von DNA</li> </ul>	27 28 30 31 31 33 33
9	Molekularzytogenetische Methode	34
	<ul> <li>9.1 Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung (FISH)</li> <li>9.1.1 Herstellung der Chromosomenpräparate</li> <li>9.1.2 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate</li> <li>9.1.3 Fluoreszenzmarkierung der DNA-Sonden</li> <li>9.1.4 Hybridisierung der Chromosomenpräparate</li> <li>9.1.5 Färben und Eindecken der Chromosomenpräparate</li> </ul>	34 34 34 34 36 36
10	Computerprogramme und Datenbanken	37
IV	Ergebnisse	38
1	Beschreibung der Vorgehensweise	38
2	Restriktionsenzymatische Spaltung der isolierten BAC- und Fosmid-DNAs zur Herstellung von Sonden für die	
3	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer	39
3	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 4;7-Translokation bei Patient 1	39 40
3	<ul> <li>Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>4;7-Translokation bei Patient 1</li> <li>3.1 Vorarbeiten</li> <li>3.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 4</li> <li>3.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf 7a36</li> </ul>	<b>39</b> <b>40</b> 40 42 44
3	<ul> <li>Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>4;7-Translokation bei Patient 1</li> <li>3.1 Vorarbeiten</li> <li>3.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 4</li> <li>3.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf 7q36</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>7:17-Translokation bei Patient 2</li> </ul>	<ul> <li>39</li> <li>40</li> <li>40</li> <li>42</li> <li>44</li> <li>47</li> </ul>
3	<ul> <li>Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>4;7-Translokation bei Patient 1</li> <li>3.1 Vorarbeiten</li> <li>3.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 4</li> <li>3.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf 7q36</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>7;17-Translokation bei Patient 2</li> <li>4.1 Vorarbeiten</li> </ul>	<ul> <li>39</li> <li>40</li> <li>40</li> <li>42</li> <li>44</li> <li>47</li> <li>47</li> </ul>
3	<ul> <li>Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>4;7-Translokation bei Patient 1</li> <li>3.1 Vorarbeiten</li> <li>3.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 4</li> <li>3.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf 7q36</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>7;17-Translokation bei Patient 2</li> <li>4.1 Vorarbeiten</li> <li>4.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 7</li> </ul>	<ul> <li>39</li> <li>40</li> <li>40</li> <li>42</li> <li>44</li> <li>47</li> <li>47</li> <li>48</li> </ul>
3	<ul> <li>Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>4;7-Translokation bei Patient 1</li> <li>3.1 Vorarbeiten</li> <li>3.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 4</li> <li>3.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf 7q36</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>7;17-Translokation bei Patient 2</li> <li>4.1 Vorarbeiten</li> <li>4.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 7</li> <li>4.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 7</li> </ul>	<ul> <li>39</li> <li>40</li> <li>40</li> <li>42</li> <li>44</li> <li>47</li> <li>47</li> <li>48</li> <li>48</li> </ul>
3 4 5	<ul> <li>Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>4;7-Translokation bei Patient 1</li> <li>3.1 Vorarbeiten</li> <li>3.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 4</li> <li>3.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf 7q36</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>7;17-Translokation bei Patient 2</li> <li>4.1 Vorarbeiten</li> <li>4.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 7</li> <li>4.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 17</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>1;9-Translokation bei Patient 3</li> </ul>	<ul> <li>39</li> <li>40</li> <li>40</li> <li>42</li> <li>44</li> <li>47</li> <li>47</li> <li>48</li> <li>48</li> <li>48</li> <li>50</li> </ul>
3 4 5	<ul> <li>Fluoreszenz-<i>in-situ</i>-Hybridisierung</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>4;7-Translokation bei Patient 1</li> <li>3.1 Vorarbeiten</li> <li>3.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 4</li> <li>3.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf 7q36</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>7;17-Translokation bei Patient 2</li> <li>4.1 Vorarbeiten</li> <li>4.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 7</li> <li>4.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 7</li> <li>FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosm 17</li> <li>Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer</li> <li>1;9-Translokation bei Patient 3</li> <li>5.1 Vorarbeiten</li> <li>5.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosem 1</li> </ul>	<ul> <li>39</li> <li>40</li> <li>40</li> <li>42</li> <li>44</li> <li>47</li> <li>47</li> <li>48</li> <li>48</li> <li>50</li> <li>50</li> <li>50</li> </ul>

	5.3	FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 9	54
6	Seque neuro	enzanalyse von <i>JAKMIP1</i> bei Patienten mit onalen Migrationsstörungen und Kleinhirnhypoplasien	57
	6.1 6.2	Vorbemerkungen PCR-Amplifikation ausgewählter Exons des <i>JAKMIP1</i> -Gens und anschließende direkte DNA-Sequenzierung	57 58
V	Disku	ission	61
1	Eingı Patie	renzung der Bruchpunkte einer 4;7-Translokation bei nt 1 auf 170 kb bzw. 40 kb	61
	1.1 1.2	Durch den Bruch in 4q13.1 wird bei Patient 1 kein Gen unterbrochen SHH als mögliches Kandidatengen für den Phänotyp von Patient 1	61 61
2	Eingr	renzung der Bruchpunkte einer 7;17-Translokation bei Patient 2	64
	<ul><li>2.1</li><li>2.2</li></ul>	Die Eingrenzung des Bruchpunktes auf Chromosom 7p wurde abgebrochen, aufgrund der Erkenntnisse zu dem Bruchpunkt auf Chromosom 17 Der Bruchpunkt in 17p13.3 bei Patient 2 disrupiert das	64
2	<b>F</b> !	Krankheitsgen <i>LISI</i>	65
3	Eingi	renzung der Bruchpunkte einer 1;9-1 ranslokation bei Patient 3	65
	3.1 3.2	Der Phänotyp des Patienten 3 ist wahrscheinlich unabhängig vom 1p36.13-Translokationsbruchpunkt Der Bruchpunkt 9q34.3 befindet sich in einer etwa 50 kb großen Region in der die Gene <i>EGFL7</i> und <i>AGPAT2</i> lokalisiert sind	65 66
4	Keine neure	e pathogene Mutation in <i>JAKMIP1</i> bei 75 Patienten mit onalen Migrationsstörungen und Kleinhirnhypolplasie	67
VI	Zusa	mmenfassung	70
VII	Liter	aturverzeichnis	72
VIII	Anha	ing	85
1	Dank	sagung	85
2	Leber	nslauf	86
3	Eides	stattliche Versicherung	87

# Abkürzungsverzeichnis

А	Adenin
Abb.	Abbildung
BAC	bacterial artificial chromosome
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin
°C	Grad Celsius
C.	Nukleotidposition in der Kodierregion eines Gens ("coding
	sequence")
ca.	zirka
cDNA	komplemetäre ("copy") Desoxyribonukleinsäure
cen	Zentromer
CGH	comparative genome hybridization (komparative
	Genomhybridisierung)
cm	Zentimeter
CNV	copy number variations
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
der	derivativ
dest.	destilliert
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
d.h.	das heißt
DNA	Desoxyribonukleinsäure ("desoxyribonucleic acid")
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
dUTP	Deoxyuridinetriphosphat
E.coli	Escherichia coli
EcoRI	Escherichia coli 1 RY-13 I
EDTA	Ethylesndinitrilotetrasessigsäure
EEG	Elektroenzephalographie/-gramm
et al.	et alii (und andere)
F	Fosmidklon
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
FS	FailSafe
Fwd	vorwärts
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
G	Guanin
GTP	Guaninnukleotidtriphosphat

Kilobase(n)
Kaliumchlorid
Liter, Milliliter, Mikroliter
Luria Broth
locus control region
Mol, Millimol, Mikromol, Picomol
Meter, Zentimeter, Nanometer
Megabasen
Minute
Magnetresonanztomographie
Natriumacetat
Aminosäureposition im Protein
P1-derived artificial chromosomes
Polymerase-Kettenreaktion, polymerase chain reaction
potentia hydrogenii
rückwärts
Ribonukleinsäure
Ribonuklease
ribosomale Ribonukleinsäure
Referenznummer eines SNPs
reverse trancriptase polymerase chain reaction
Sekunde(n)
smal interfering RNA
Einzelbasenpaar-Polymorphismus, single nucleotide polymorphism
sogenannt
saline sodium citrate
Stunde
Thymin
Tabelle
Thermus aquaticus
Tris/Borat/EDTA (Puffer)
touchdown
Tris-EDTA
Telomer
Tris (Hydroxymethyl-) aminomethan
Umdrehungen pro Minute
ultraviolett
Volt
Wildtyp
zum Beispiel
zentrales Nervensystem

### I Arbeitshypothese und Fragestellung

Die neuronalen Migrationsstörungen bilden eine heterogene Gruppe von kortikalen Fehlbildungen, die klinisch durch Intelligenzminderung und Epilepsie charakterisiert sind und das Resultat unterschiedlicher Störungen der neuronalen Migrationsphasen während der Kortikogenese sind. Sie werden zumeist durch Defekte der an den Wanderungsprozessen beteiligten Proteine bzw. Mutationen der entsprechenden Gene verursacht. Es ist schon eine Vielzahl von migrationsassoziierten Genen bekannt, jedoch lassen sich nicht alle Fälle und die Vielfalt der Migrationsstörungen auf Mutationen dieser Gene zurückführen. Durch Arbeiten von Herrn Professor Dr. Vidal und seiner Gruppe wurden wir auf das mögliche Kandidatengen JAKMIP1 (Janus Kinase and Microtubule-Interacting Protein 1) aufmerksam, welches für ein neuronales Migrationsprotein kodiert, das in der Literatur als Marlin-1 bezeichnet wird. Es konnte eine Assoziation des Marlin-1-Proteins mit dem Mikrotubuliapparat sowie eine Expression in bestimmten Arealen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie dem aufgezeigt werden. Intrauterine, siRNA-basierte Experimente Kleinhirn, an Mäuseembryonen lieferten Hinweise auf eine Beteiligung von Marlin-1 an neuronaler Migration. Durch eine Verminderung der Expression von Jakmip1, mittels intraventrikulärer siRNA-Applikation, konnte bei den Mäuseembryonen festgestellt werden, dass die Neuronen in ihrer Wanderungsbewegung während der Kortikogenese gestört sind. Ziel dieser Doktorarbeit war es, mögliche Mutationen mittels Sequenzanalyse des Kandidatengens JAKMIP1 in einem Kollektiv von 75 Patienten mit einer kortikalen Fehlbildung und einer Kleinhirnaffektion aufzudecken, um somit ein neues Krankheitsgen für die neuronalen Migrationsstörungen zu identifizieren.

Des Weiteren sollten in dieser Arbeit neue positionelle Kandidatengene für Gehirnfehlbildungen identifiziert werden. Eine etablierte Methode hierfür stellt die molekularzytogenetische Untersuchung balancierter chromosomaler Aberrationen dar. Es wurden drei Patienten mit einer Gehirnfehlbildung, die jeweils eine reziproke Chromosomentranslokation aufwiesen, untersucht. Durch serielle Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) wurden die Bruchpunkte der Chromosomenaberrationen molekularzytogenetisch eingegrenzt, um Kandidatengene in den feinkartierten Regionen für den jeweiligen Krankheitsphänotyp aufzufinden.

1

# II Einleitung

### 1 Chromosomale Rearrangements als Hilfsmittel zur Identifizierung neuer Krankheitsgene

Einer der Hauptaufgaben der Humangenetik ist die Identifizierung von menschlichen Krankheitsgenen, wobei sich chromosomale Aberrationen als ein wichtiges Hilfsmittel erwiesen haben. Strukturelle Chromosomenaberrationen bzw. Chromosomenmutationen kommen bei etwa 0,6% der neugeborenen Kinder vor (Shaffer und Lupski 2000). Diese Chromosomenaberrationen können ohne einen Verlust oder Zugewinn von Chromosomenmaterial einhergehen, wobei dann von balancierten man Chromosomenaberrationen spricht. Zu solchen Aberrationen zählen balancierte Translokationen oder Inversionen. Durch die strukturellen Veränderungen kann es aber auch zu Deletionen, Duplikationen und unbalancierten Translokationen mit Verlust von chromosomalem Material kommen. Bei den hier im Weiteren relevanten reziproken Translokationen erfolgt ein Chromosomenstückaustausch zwischen zwei nichthomologen Chromosomen. Dieser erscheint in der konventionellen Chromosomenanalyse häufig balanciert, d.h. ausgeglichen, ohne offensichtlichen Verlust oder Zugewinn an chromosomalem Material.

Eine balancierte Translokation geht in den meisten Fällen mit einem unauffälligen Phänotyp einher. In 6,1% der Fälle tritt allerdings eine balancierte chromosomale Aberration zusammen mit einer Erkrankung auf (Warburton 1991), welche für eine Lokalisierung von bisher unbekannten Krankheitsgenen hilfreich sein kann. Dabei muss jedoch beachtet werden, dass auch ein zufälliges Zusammentreffen zwischen dem Phänotyp und dem chromosomalen Rearrangement vorliegen kann, so dass dieses Rearrangement nicht ursächlich ist. Deshalb muss zunächst ausgeschlossen werden, dass Mutationen in bereits bekannten Krankheitsgenen vorliegen, die mit diesem Phänotyp bereits in Assoziation gebracht worden sind. Ebenso sollte durch Analyse der parentalen Chromosomen das Vorliegen der Aberration bei den gesunden Eltern untersucht werden. Wird die Aberration bei den Eltern nicht gefunden, d.h. das Rearragement liegt bei dem Patienten *de novo* vor, spricht dies umso mehr für einen kausalen Zusammenhang (Shaffer 2005). Dabei kann es so sein, dass ein oder mehrere Gene durch den Bruchpunkt direkt unterbrochen werden oder aber regulatorische

Einleitung

Sequenzelemente zerstört werden. Hieraus resultiert zumeist eine Veränderung der Genexpression, die wiederum oft durch Haploinsuffizienz des betreffenden Gens zu dem klinischen Bild führt (Strachan und Read 1999).

Durch lichtmikroskopische Untersuchungen an gebänderten Metaphasechromosomen können Chromosomenanomalien identifiziert werden, jedoch nicht zu genüge kartiert ergibt die Notwendigkeit einer Feinkartierung werden. Daraus sich der Bruchpunktregion, die durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) erfolgen kann. Die FISH-Analyse nutzt definierte Abschnitte des Genoms, die in BAC-Klonen (bacterial artificial chromosome), PAC-Klonen (P1-derived artificial chromosomes) oder Fosmiden (F-Faktor basierende Cosmide) als DNA-Sonden vorliegen, so dass eine feinere Eingrenzung der chromosomalen Bruchpunkte bis auf wenige Kilobasen (kb) ermöglicht wird. Die DNA-Abschnitte in den Klonen, welche durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, hybridisieren entsprechend ihrer Sequenz auf komplementären DNA-Abschnitten des zu analysierenden Chromosomenmaterials. Sie können unter einem Fluoreszenz-Mikroskop durch Anregung mittels Lichtwellen geeigneter Wellenlänge zum Leuchten gebracht und auf den entsprechenden Chromosomenabschnitten lokalisiert werden. Hierbei ist das Ziel die Identifizierung von bruchpunktüberspannenden Klonen, diese stellen sich beim Mikroskopieren durch so genannte split signals dar: sie erzeugen drei Signale, da sie zum einen auf dem Wildtyp-Chromosom hybridisieren sowie auf den beiden Translokationschromosomen (derivative Chromosomen). Daraufhin kann durch Datenbankrecherchen in den eingegrenzten Regionen nach potentiellen Kandidatengenen für eine Erkrankung gesucht werden, die entweder durch den Chromosomenbruch direkt unterbrochen wurden oder durch den sog. Positionseffekt in ihrer Expression beeinträchtigt sein könnten. Nach der Identifizierung des Kandidatengens muss im nächsten Schritt eine Veränderung dieses Gens bei weiteren Patienten gezeigt werden. Durch eine Mutationsanalyse dieser Kandidatengene bei Patienten mit dem gleichen klinischen Phänotyp wie der Patient mit dem Rearrangement, jedoch unauffälligem Karyotyp, kann durch den Nachweis pathogener Mutationen ein neues Krankheitsgen identifiziert werden.

Anhand der hier beschriebenen Vorgehensweise konnten in der Vergangenheit viele krankheitsverursachende Gene entdeckt werden. Es konnten die Krankheitsgene einiger autosomal-dominant oder X-chromosomal vererbter Erkrankungen identifiziert werden, wie z.B. das *RIEG*-Gen für das Rieger-Syndrom (Datson et al. 1996, Semina et al. 1996). X-chromosomal vererbte unspezifische geistige Behinderung (Kutsche et al. 2000) und das Sotos-Syndrom (Imaizumi et al. 2002, Kurotaki et al. 2002) sind weitere Beispiele, bei welchen die molekulare Aufklärung eines chromosomalen Rearrangements bei Patienten mit einem Mendel'schen Kranksheitsphänotyp eine wesentliche Rolle bei der Identifizierung des ursächlichen Krankheitsgens gespielt haben.

Es sollten aber auch Erkrankungen mit einem autosomal-rezessiven Erbgang nicht unberücksichtigt bleiben. Stellt sich bei der Analyse der parentalen Chromosomen bei einem Elternteil das gleiche Rearrangement dar, jedoch ohne jegliche phänotypische Ausprägungen bei diesem, kann dieses Rearrangement trotzdem an der Erkrankung des Kindes ursächlich beteiligt sein, wenn auf dem zweiten, intakten Allel eine intragenische Mutation (z.B. Punktmutation) vorliegt. Dies wäre einer Compound-Heterozygotie vergleichbar, bei der auf beiden Allelen unterschiedliche Mutationen vorliegen, welche für die Erkrankung ursächlich sind (Yoshida et al. 2001, Jiao et al. 2011).

# 2 Positionseffekt

1 erwähnt, Wie schon unter kann nicht nur ein direkter "Genbruch" (Translokationsbruchpunkt innerhalb des Gens) bei einer balancierten Translokation krankheitsverursachend sein. Brüche, die nicht im Gen, sondern in seiner Umgebung liegen, können auch zu einem Funktionsverlust eines oder mehrerer Gene führen und somit für die phänotypischen Merkmale ursächlich sein. Dieser sog. Positionseffekt (Abb. 1) beschreibt die veränderte Expression eines Gens aufgrund einer Änderung der normalen chromosomalen Umgebung des Gens durch die Translokation, ohne einen Zusammenhang mit einer Mutation oder Deletion innerhalb des Gens an sich (Kleinjan und van Heyningen 1998). Dieser Effekt kann zum einen eine Überexpression oder eine verminderte Expression und zum anderen eine örtlich und/oder zeitlich veränderte Expression des Gens bewirken.

Unterschiedliche Elemente regulieren die Expression eines Gens. Der Promotor, an dem die Bindung und Initiation des Transkriptionskomplexes stattfindet, kontrolliert diese.

Jedoch auch andere Kontrollelemente wie Silencer und Enhancer, kurze DNA-Regionen, die stromaufwärts oder -abwärts liegen und an denen Transkriptionsfaktoren binden können, sind an dieser Regulation beteiligt (Abb. 1). Des Weiteren wird die Expression vieler Gene über größere Entfernungen hinweg durch verschiedene *cis*regulatorische Sequenzen, wie z.B. sog. *locus control regions* (LCRs) oder Insulatoren, reguliert (Howard und Davidson 2004, Jeziorska et al. 2009). Diese können stromaufwärts oder -abwärts eines Gens lokalisiert sein und verstärken in der Regel die Expression nach- oder vorgeschalteter Gene (Kleinjan und van Heyningen 2005).



Abb. 1: Schematische Darstellung möglicher Mechanismen, die zu einem Positionseffekt führen können (modifiziert nach Kleinjan und van Heyningen, 1998)

Durch dunkelblaue und hellblaue Balken sind jeweils Anteile von zwei nicht-homologen Chromosomen dargestellt. Das grüne sowie graue Rechteck stellt ein Gen dar. Die weißen Rechtecke stehen für ein Enhancer-Element oder eine *locus control region* (LCR) bzw. einen Insulator. Die Translokation wird durch einen roten Blitz angedeutet. Der schwarze Pfeil symbolisiert die Transkription der Gene, der rot durchgestrichene Pfeil zeigt eine verringerte oder fehlende Transkription an. Rechts ist die funktionelle Auswirkung des chromosomalen Rearrangements auf einem derivativen Chromosom schematisch veranschaulicht. Die Beschreibung der Mechanismen 1-4 erfolgt im nachfolgenden Text.

Entsprechend der ersten beiden diskutierten Mechanismen kommt es zu einem Positionseffekt, wenn sich ein Bruchereignis zwischen einem Gen und einem dazugehörigen Regulatorelement, wie einem Enhancer (1) oder einem LCR (3), ereignet. Die Expression des Gens wird dadurch reduziert oder sogar vollständig blockiert. Der zweite Mechanismus (2) führt im Gegensatz dazu zu einer verstärkten Expression, wenn durch eine Translokation ein fremdes Enhancerelement vor ein Gen gebracht wird. Wird dagegen durch ein Rearrangement ein Gen in die Nähe des Enhancers eines anderen Gens gebracht, kann dieses mit dem anderen Gen um die

Einleitung

Interaktion mit dem Enhancer kompetitieren (4). Durch diesen Vorgang kommt es zur Fehlregulation der Expression eines oder beider Gene.

*cis*-regulatorische Sequenzen wurden z.B. für das Gen SHH in einer Entfernung von bis zu 1 Mb gefunden (Lettice et al. 2002), und für das Gen SOX9 konnten Enhancerelemente identifiziert werden, die 1,3 Mb vom Promotor entfernt liegen und in Zusammenhang mit dem Pierre-Robin-Syndrom stehen (Velagaleti et al. 2005, Benko et al. 2009). Interessanterweise liegen einige dieser weit entfernten Kontrollelemente in genarmen Regionen oder in sog. Genwüsten (Nobrega et al. 2003, Benko et al. 2009). Es wurden aber auch Kontrollelemente innerhalb von Introns benachbarter Gene beschrieben, wobei das diese Kontrollelemente aufweisende Gen selbst nicht signifikant beeinflusst wird, sondern das weiter entfernt liegende Gen. Dies trifft z.B. für Kontrollelemente der Gene SHH und PAX6 zu (Kleinjan et al. 2001, Lettice et al. 2002). Ein Positionseffekt konnte z.B. auch für das Krankheitsgen PAX6 bei Patienten mit Aniridie nachgewiesen werden (Fantes et al. 1995). Hierbei handelt es sich um eine Erkrankung, die mit Fehlbildungen der Augen (z.B. Hypoplasie der Iris) einhergeht. Sie wird verursacht durch eine Haploinsuffizienz von PAX6, die durch Deletionen und Punkmutationen in dem auf Chromosom 11p13 kartierenden PAX6(paired box/homeodomain 6)-Gen bedingt wird (Ton et al. 1991, Hanson und Van Heyningen 1995). Bei einigen Patienten mit Aniridie wurde eine Translokation mit einem Bruchpunkt stromabwärts von PAX6 nachgewiesen. Dadurch konnte eine in einer Entfernung von mindestens 125 kb liegende Region bzw. hier lokalisierte regulatorische Elemente für eine korrekte zeitliche und örtliche Expression des PAX6-Gens identifiziert werden, deren Trennung vom PAX6-Gen für eine Aniridie ursächlich ist (Kleinjan et al. 2001).

Im Falle des *SHH*-Gens konnten weitere interessante Beobachtungen gemacht werden. Zum einen wurden pathogene Punktmutationen in einem ~1 Mb vom *SHH*-Gen entfernten Kontrollelement, welches im Intron 5 des *LMBR1*-Gens lokalisiert ist, identifiziert. Diese verursachen eine autosomal-dominant erbliche Skelettfehlbildung der Hände, eine präaxiale Polydaktylie. Dadurch wurde erstmals gezeigt, dass auch Punktmutationen in nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen, die in großer Entfernung zu ihrer Transkriptionseinheit lokalisiert sind, krankheitsverursachend sein können (Hill et al. 2003). Dies ist insbesondere interessant, da intragenische Mutationen des *SHH-Gens*, aber auch Translokationen, deren Bruchpunkte bis zu 275 kb vom Gen entfernt sind sowie Punktmutationen in einem ~460 kb entfernten Enhancerelement, hingegen eine Holoprosencephalie verursachen, bei der es sich um eine Entwicklungsstörung des Vorderhirns und Gesichts handelt (Roessler et al. 1996, Roessler et al. 1997, Jeong et al. 2008). Diese Beobachtungen belegen eindrucksvoll, dass unterschiedliche Veränderungen in der Expression eines Gens auch zu verschiedenen phänotypischen Merkmalen führen können.

### 3 Kortikogenese

Das menschliche Gehirn entwickelt sich aus dem rostralen Ende des Neuralrohrs. Nach dem Schluss des vorderen Nauralrohrs am 25. Embryonaltag bilden sich dort die drei primären Hirnbläschen aus, das vordere Prosencephalonbläschen, das mittlere Mesencephalonbläschen und das hintere Rhombencephalonbläschen. Im weiteren Verlauf spalten sich aus diesen die fünf Sekundärbläschen ab, das Telencephalon, Diencephalon, Mesencephalon, Myelencephalon und das Metencephalon, aus dem sich wiederum das Zerebellumbläschen abspaltet.

Bei der Entstehung des Kortex werden drei wesentliche Phasen unterschieden (Gleeson und Walsh 2000). In der ersten Phase kommt es zur zellulären Proliferation in der Ventrikulärzone, aus der zunächst eine Vermehrung der neuralen Stammzellen, zu denen auch die radialen Gliazellen gehören, resultiert. Ihr Ursprung liegt in der Neuralplatte, und sie besitzen als pluripotente neurale Stammzellen die Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Ausbildung spezialisierter Zelltypen (Anthony et al. 2004, Noctor et al. 2007). In der nächsten Phase erfolgt die Migration neuronaler Vorläuferzellen in den sich bildenden Kortex, und in der dritten Phase, der postmigratorischen Phase, erfolgt die Differenzierung zu reifen Nervenzellen und Organisation in neuralen Netzwerken.

Die Proliferationszone der glutamatergen Pyramidenzellen ist in der dorsolateralen Wand in der ventrikulären und subventrikulären Zone des Telencephalon lokalisiert, die der Interneurone, welche den Neurotransmitter GABA exprimieren, in den ganglionischen Eminenzen des ventralen Telencephalon (Anderson et al. 2001). In den frühen Stadien der zellulären Proliferation findet in der Ventrikulärzone eine symmetrische Zellteilung in gleichartige Tochterzellen statt. Um den 33. Embryonaltag beginnt die zweite Stufe der Proliferation, in welcher sich die neuronalen Stammzellen asymmetrisch teilen, so dass eine Tochterzelle als Stammzelle im Epithel verbleibt und die andere in den sich entwickelnden Kortex wandert, ohne weitere Teilungen zu durchlaufen. Hiermit beginnt die Migration der postmitotischen neuralen Vorläuferzellen, welche zwischen der 10. und 20. Schwangerschaftswoche stattfindet (Bystron et al. 2008). Zu Beginn des Migrationsprozesses wird durch die erste Welle von neuralen Vorläuferzellen die sog. Vorplatte gebildet (Abb. 2). In ihrer oberen Schicht differenzieren sich die Cajal-y-Retzius Zellen, welche das Signalmolekül Reelin sezernieren, das den weiteren Wellen von neuralen Vorläuferzellen als Leitsignal dient und den Migrationsverlauf beeinflusst (Ogawa et al. 1995).

Die zweite Welle von Zellen wandert in die Vorplatte ein und spaltet diese in die äußere Marginalzone und die innere Subplatte auf und bildet somit die kortikale Platte. Die Marginalzone stellt die künftige erste Schicht des ausgereiften Neokortex dar. Die weiteren Wellen von migrierenden neuralen Vorläuferzellen wandern entlang von radialen Gliazellen an ihren Vorgängern vorbei und in die kortikale Platte kurz unterhalb der Marginalzone ein (Rakic 1971). Hierdurch entstehen die sechs Schichten des zerebralen Kortex in einem "inside-out"-Muster, wobei die jüngsten Neurone in der jeweils oberflächlichsten Schicht unterhalb der Marginalzone zu finden sind und die Schichtung somit von innen nach außen stattfindet (Angevine und Sidman 1961). Daneben gibt es weitere Migrationsformen, wie die tangentiale Migration, die streckenweise in parallelen Bahnen zur Gehirnoberfläche verläuft und z.B. für die aus den ganglionischen Eminenzen des Telencephalon stammende GABAergen Neurone beschrieben wurde (Anderson et al. 2001).



Abb. 2: Schematische Darstellung der Kortexentwicklung beim Menschen (modifiziert nach Diaz und Gleeson, 2009)

In der frühen Phase der Kortexentwicklung besteht diese aus der Ventrikulärzone (VZ) und der Subventrikulärzone (SVZ). Es erfolgt eine asymmetrische Teilung der neuronalen Stammzellen während der fünften Schwangerschaftswoche (SW) in der Ventrikulärzone. Eine der Tochterzellen (pink) wandert als neurale Vorläuferzelle in der ersten Migrationswelle aus, so dass die Vorplatte (preplate; PP) gebildet wird und die andere Tochterzelle verbleibt als neurale Stammzelle (blau) im Epithel. Die zweite Welle (grün) wandert in die Vorplatte ein, spaltet diese in die Marginalzone (MZ) und die Subplatte (SP) und bildet die dazwischen liegende kortikale Platte (CP). Weitere Zellen (magenta, gelb, orange und neongrün) migrieren in einem "inside-out"-Muster in die kortikale Platte ein und bilden somit den sechsschichtigen Kortex, dessen erste Schicht durch die Marginalzone gebildet wird, die unterhalb der Piaoberfläche (PS) liegt. Unterhalb der Schichten befindet sich beim Erwachsenen die weiße Substanz (W) und das angrenzende Epithel (E).

Für die radiale Migration werden zwei unterschiedliche Mechanismen beschrieben (Nadarajah et al. 2001), zum einen die Wanderung mit Hilfe und entlang von Gliazellen und zum anderen die Migration durch somale Translokation, die in der frühen Phase der Kortexentwicklung dominiert. Sobald die zurückzulegenden Distanzen jedoch zu groß werden, wandern die neuronalen Vorläuferzellen entlang des Glia-Gerüstes in Richtung Marginalzone. Um dann die Migration zu beenden und den spezifischen Zielort zu erreichen, lösen sich diese von ihren Leitschienen und wandern wieder mit Hilfe der somalen Translokation zu ihrer endgültigen Position (Cooper 2008).

Die eigentliche Vorwärtsbewegung der neuronalen Vorläuferzellen kann in drei Hauptschritten beschrieben werden, in denen das Zytoskelett der Zelle eine tragende Rolle spielt. Das Zytoskelett besteht aus drei Hauptkomponenten, den Aktinfilamenten, den intermediären Filamenten und den Mikrotubuli und ist für die Stabilisierung der Zelle, ihre äußere Form, für die aktive Bewegung der Zelle als Ganzes sowie für Bewegungen und Transporte innerhalb der Zelle verantwortlich. Durch unterschiedliche Umbauprozesse des Zytoskeletts wird die Fortbewegung der Zelle ermöglicht. Als erster Schritt erfolgt die Ausbildung eines Zellfortsatzes, welche hauptsächlich durch Aktinfilamente vermittelt wird (Abb. 3). Für diesen Prozess sind Proteine wie das Filamin A, welches ein quervernetzendes Protein für Aktin ist, von großer Bedeutung. Daraufhin erfolgt die Translokation des Zellkerns, der in einem "Käfig" aus Mikrotubuli in Richtung des Leitfortsatzes gezogen wird. Die Proteine LIS1 (PAFAH1B1), Doublecortin und andere Motorproteine wie Dynein und Kinesin steuern diesen Transport des Zellkerns (Vallee et al. 2000, Wynshaw-Boris und Gambello 2001). Als letztes erfolgt ein Nachziehen der zurückgebliebenen Ausläufer in Wanderungsrichtung, indem sich diese Ausläufer verkürzen.



#### Abb. 3: Schematische Darstellung der Migration einer Zelle (modifiziert nach Faulkner, 2000)

Die Migration einer neuronalen Vorläuferzelle erfolgt entlang einer radialen Gliazelle und deren Ausläufern, indem die Zelle mittels Aktinfilamenten (rot) ihren Zellausläufer vorstreckt und danach den Zellkern anhand von Mikrotubuli (blau) nach sich zieht. Zum Schluss wird der zurückbleibende Ausläufer verkürzt und somit nachgezogen.

#### 4 Neuronale Migrationsstörungen

Migrationsstörungen bilden eine Neuronale heterogene Gruppe von Gehirnfehlbildungen, die klinisch durch das Auftreten einer Intelligenzminderung und Epilepsien charakterisiert sind. Die häufigste unter diesen Erkrankungen ist die periventrikuläre noduläre Heterotopie (PNH). Seit die Magnetresonanz-Tomographie (MRT) zur Diagnostik bei Patienten mit psychomotorischen Entwicklungsstörungen sowie bei Patienten mit Epilepsien zur Verfügung steht, werden neuronale Migrationsstörungen immer häufiger diagnostiziert. Aufgrund von Störungen der verschiedenen Migrationsphasen ergeben sich vielfältige Fehlbildungen mit unterschiedlichem Muster. Dabei wandern Gruppen von neuralen Vorläuferzellen fehlerhaft und erreichen nicht ihren eigentlichen Zielort während der

Kortexentwicklung, wodurch sich unterschiedliche makroskopische Veränderungen im Aufbau des Gehirns ergeben. Betrifft die Störung z.B. den Beginn des Wanderungsprozesses, resultiert dies in einer periventrikulären nodulären Heterotopie, bei der die Neuroblasten an ihrem Entstehungsort liegen bleiben. Ist die eigentliche Wanderungsbewegung gestört, resultiert dies z.B. in einer klassischen Lissenzephalie (Lissenzephalie Typ I) mit einer fehlerhaften Kortexschichtung und Gyrierung. Liegt eine Störung während der Beendigung der Migration vor, resultiert diese in einer "Cobblestone"-Lissenzephalie (Lissenzephalie Typ II), bei der es durch eine Übermigration der Neuroblasten zu einer höckerig und pflastersteinartig aussehenden Gehirnoberfläche kommt (Dobyns und Truwit 1995, Barkovich 1996).

Die fehlerhafte Migration ist zumeist durch Defekte an den für die Migration verantwortlichen Proteinen bzw. Mutationen der entsprechenden Gene bedingt. Andere Ursachen können exogene Faktoren wie z.B. Infektionen sein. Es wurden bis zum heutigen Tag schon eine Vielzahl von migrationsassoziierten Genen entdeckt, jedoch lassen sich durch diese noch nicht alle Fälle von Patienten mit Migrationsstörungen sowie deren Vielfalt klären. Daher beschäftigt sich der erste Teil dieser Doktorarbeit mit der Identifizierung neuer Kandidatengene bei Patienten mit Gehirnfehlbildungen. Es wurden drei Patienten mit einer Gehirnfehlbildung, die eine lichtmikroskopisch detektierbare, chromosomale Translokation aufweisen, untersucht. Durch serielle Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) wurden die Bruchpunkte der Chromosomenaberrationen molekularzytogenetisch eingegrenzt, um Kandidatengene in den feinkartierten Regionen für den jeweiligen Krankheitsphänotyp aufzufinden.

Die neuronalen Migrationsstörungen können grob in vier Hauptgruppen unterteilt werden, wobei diese Einteilung sich aufgrund fortwährender neuer Erkenntnisse im Wandel befindet. Die vier Gruppen sind die Heterotopien, Lissenzephalien, subkortikalen Heterotopien bzw. sublobäre Dysplasien und "Cobblestone"-Lissenzephalien (Barkovich et al. 2012).

Im Folgenden sollen die Heterotopien und Lissenzephalien genauer beschrieben werden.

#### 4.1 Heterotopien

In diese Gruppe werden die periventrikulären nodulären Heterotopien (PNH) zugeordnet. Sie stellen die häufigste Form der neuronalen Migrationsstörungen dar. Durch die fehlerhafte Initiierung der Migration resultiert ein Arrest und eine dadurch bedingte Ansammlung der unreifen Neuroblasten im Bereich der lateralen Ventrikelwand in Form von rundlichen oder epileptoiden Knoten, welche unilateral fokal, bilateral fokal oder bilateral diffus verteilt sein können (Barkovich et al. 2005). Im MRT fallen diese als Knoten von grauer Substanz entlang der lateralen Wand der Seitenventrikel auf (Abb. 4). Die Patienten weisen klinisch zumeist eine Epilepsie mit meist fokalen Anfällen sowie eine Intelligenzminderung auf (Puche et al. 1998, Lu und Sheen 2005, Parrini et al. 2006).











Das linke axiale MRT-Bild stellt eine PNH bei einer Patientin mit einer *FLNA*-Mutation dar; der weiße Pfeil markiert die Knoten von grauer Substanz entlang der Ventrikelwand. Das rechte axiale MRT-Bild stellt zum Vergleich eine Normalperson dar.

Die bilaterale symmetrische PNH wird meist durch Mutationen des X-chromosomal lokalisierten *FLNA*-Gens verursacht (Xq28) (Sheen und Walsh 2005, Parrini et al. 2006). Für männliche Mutationsträger liegt eine hohe und meist bereits intrauterine Letalität vor, daher erklärt sich das vorwiegende Auftreten bei Frauen und das gehäufte Auftreten von Aborten in entsprechenden Familien. Das *FLNA*-Gen kordiert für ein 280 kDa schweres Protein, welches zahlreiche Funktionen erfüllt. Essentiell ist es für die

Einleitung

Migration, da es Aktin quervernetzt, das Zytoskelett stabilisiert und Zell-Zell-Kontakte vermittelt (Fox et al. 1998, van der Flier und Sonnenberg 2001).

Eine seltene autosomal-rezessive Form der PNH wird durch Mutationen im *ARFGEF2*-Gen verursacht, welches in 20q13.13 lokalisiert ist (Barkovich et al. 2005). Es kodiert für das Protein *Brefeldin-inhibited* GEF2 (BIG2), welchem eine Rolle beim Vesikelund Membrantransport zugeschrieben wird, aus dessen Funktionsstörung gestörte Zell-Zell-Kontakte resultieren können (Sheen et al. 2004). Die Patienten weisen neben der bilateral diffusen PNH einen angeborenen Mikrozephalus auf (Lu und Sheen 2005).

### 4.2 Lissenzephalien

Die Lissenzephalien sind eine Gruppe von Gehirnfehlbildungen, die allgemein durch eine fehlerhafte Gyrierung der Gehirnoberfläche charakterisiert sind. Diese kann von einer vergröberten (Pachygyrie) bis zu einer fehlenden (Agyrie) Gyrierung reichen. Die neuralen Vorläuferzellen beginnen die Migration, doch die Wanderung läuft gestört ab und kann nicht regulär zu Ende geführt werden. Die Lissenzephalien können unter anderem mit einer Dandy-Walker-Malformation (DWM) assoziiert sein. Diese ist durch eine Hypoplasie des Kleinhirnwurms sowie dessen Rotation, einer Zyste in der Fossa posterior, die mit einem dilatierten 4. Ventrikel kommuniziert und einem teilweise erst später resultierenden Hydrozephalus charakterisiert (Barkovich et al. 2009). Potentielle Kandidatengene sind *ZIC1* und *ZIC4* (Blank et al. 2011). Es werden bei den Lissenzephalien vereinfacht vier Gruppen unterschieden, die im Weiteren einzeln erläutert werden sollen.

#### 4.2.1 Klassische Lissenzephalie

Die klassissche Lissenzephalie oder auch Lissenzephalie Typ I ist durch eine Kombination von Agyrie und Pachygyrie der Gehirnoberfläche und durch einen verdickten Kortex charakterisiert (Banna und Malabarey 1989). Der Kortex zeigt histologisch eine veränderte Schichtung, bei der vier statt sechs Schichten vorliegen (Porter et al. 2002). Des Weiteren können eine Kleinhirnhypoplasie oder Veränderungen der Stammganglien vorliegen.

Das *LISI*-Gen (*PAFAH1B1*-Gen in 17p13.3) wurde als erstes mit der klassischen Lissenzephalie assoziiert (Dobyns et al. 1993). Es kodiert für das PAFAH1B1-Protein aus 410 Aminosäuren. Dieses kontrolliert die Ausrichtung des aus Mikrotubuli

bestehenden Spindelapparates während der Mitose in den neuralen Stammzellen und Gliazellen (Gressens 2006, Kerjan und Gleeson 2007). Das Fehlen des PAFAH1B1-Proteins verursacht auch Fehlfunktionen des Proteins Dynein, welches Bestandteil des Mikrotubuli-Apparates ist und ebenso eine Rolle bei der Migration spielt (Wynshaw-Boris und Gambello 2001). Mutationen im *LIS1*-Gen führen zur autosomal-dominanten klassischen Lissenzephalie; die Patienten sind klinisch durch eine profunde Intelligenzminderung und Epilepsien auffällig (Cardoso et al. 2002, Guerrini et al. 2008). Es werden bei etwa 40% der Patienten Deletionen des kompletten *LIS1*-Gens beobachtet und bei 15-25% kleinere intragenische Deletionen im *LIS1*-Gen, die einzelne Exons betreffen, sowie bei ca. 15-25% unterschiedliche intragenische Mutationen (z.B. Punktmutationen), so dass bei 70-75% der Patienten eine *LIS1*-Mutation vorliegt und dies die häufigste Ursache für eine isolierte klassische Lissenzephalie ist (Cardoso et al. 2002). Es besteht keine Korrelation zwischen dem Genotyp und der Schwere des resultierenden Phänotyps. *LIS1*-assoziierte kortikale Malformationen sind aber grundsätzlich immer okzipital betont (Uyanik et al. 2007).

Eine Sonderform ist das durch größere, heterozygote Deletionen des *LISI*-Gens und weiterer, in der Nähe lokalisierter Gene (wie z.B. das *YWHAE*-Gen oder *CRK*-Gen) verursachte Miller-Dieker-Syndrom (MDS) (Cardoso et al. 2003). Patienten mit dem Miller-Dieker-Syndrom weisen neben der Lissenzephalie charakteristisch kraniofaziale Dysmorphien auf (Selypes und Laszlo 1988, Allanson et al. 1998).

Weiterhin führen Mutationen des *DCX*-Gens in Xq22.3 bei männlichen hemizygoten Mutationsträgern zu einer frontal betonten klassischen Lissenzephalie (Abb. 5) (des Portes et al. 1998, Gleeson et al. 1998). Bei diesen Patienten werden klinisch eine schwere Intelligenzminderungen, eine motorische Entwicklungsstörung, Epilepsien und Dysphagien beobachtet (Pilz et al. 1999, Matsumoto et al. 2001).



Abb. 5: Axiale MRT-Bilder zur Darstellung einer klassischen Lissenzephalie

Weibliche heterozygote Mutationsträgerinnen weisen hingegen eine generalisierte oder frontal betonte subkortikale Bandheterotopie auf, die synonym auch als Double-Cortex-Syndrom bezeichnet wird (des Portes et al. 1998). Der Phänotyp kann hier sehr weit gefächert sein und bewegt sich zwischen einer normalen Intelligenz und psychomotorischer Entwicklung bis hin zu einer ausgeprägten Intelligenzminderung mit einem häufigen Auftreten von Epilepsien (Aigner 2003). Auch das Doublecortin-Protein beeinflusst die Migration, indem es die Organisation und Stabilität des Mikrotubuli-Apparates reguliert (Francis et al. 1999, Horesh et al. 1999).

#### 4.2.2 Lissenzephalie mit zerebellärer Hypoplasie (LCH)

In dieser Gruppe werden unterschiedliche Lissenzephalien zusammengefasst, die mit einer ausgeprägten Kleinhirnhypoplasie einhergehen. Die Patienten zeigen eine verzögerte motorische, sprachliche und kognitive Entwicklung, ebenso wie eine Hypotonie, eine Ataxie und eine früh beginnende Epilepsie (Ross et al. 2001). Die LCH wurde erstmals 2000 mit dem Gen *RELN* assoziiert (Hong et al. 2000). Das Genprodukt Reelin wird von den Cajal-y-Retzius-Zellen in der Marginalzone des Kortex sezerniert und spielt, wie zuvor in Abschnitt 3 beschrieben, eine Rolle bei der Einwanderung nachkommender neuronaler Vorläuferzellen (Ogawa et al. 1995, Hirotsune et al. 1995).

Das linke axiale MRT-Bild stellt eine klassische Lissenzephalie infolge einer *DCX*-Mutation dar. Der weiße Pfeil verweist auf die Verdickung des Kortex und eine frontal betonte Pachygyrie. Das rechte axiale MRT-Bild stellt zum Vergleich eine Normalperson dar.

Es konnten jedoch auch Deletionen und Mutationen des *VLDLR*-Gens bei Patienten nachgewiesen werden, die neben einer zerebellären Hypoplasie eine Vereinfachung der Gyrierung des Kortex aufwiesen (Boycott et al. 2005). Dieses Gen kodiert für einen Rezeptor des zuvor beschriebenen Reelins (Hiesberger et al. 1999, Trommsdorff et al. 1999).

Kürzlich wurden auch Patienten mit Mutationen im *TUBA1A*-Gen beschrieben, bei denen eine okzipital betonte Lissenzephalie Typ I vorliegt, mit zusätzlichen Auffälligkeiten des Balkens und einer Pons- und Kleinhirnhypoplasie (Poirier et al. 2007). Das Gen ist in 12q13.12 lokalisiert und kodiert für das Protein alpha-Tubulin, welches ein Hauptbestandteil der Mikrotubuli ist.

#### 4.2.3 X-chromosomale Lissenzephalie mit abnormen Genitalien (XLAG)

Diese Form der Lissenzephalie wird vorwiegend bei Jungen beobachtet, bei denen die Lissenzephalie mit okzipitaler Betonung auftritt und mit einem im Vergleich nur leicht verdickten Kortex. Des Weiteren sind eine Agenesie des Balkens und abnorme Genitalien mit einem Mikropenis oder Kryptorchismus charakteristisch (Leventer et al. 2000, Hartmann et al. 2004). Der abnorme dreischichtige Kortex besteht hauptsächlich aus Pyramidenzellen und wenigen GABAergen Interneuronen (Forman et al. 2005). Klinisch besteht eine Intelligenzminderung, neonatal beginnende Epilepsien und eine Hypothermieneigung. Das XLAG-Syndrom resultiert durch Mutationen des in Xp22 liegenden *ARX*-Gens (Kitamura et al. 2002, Uyanik et al. 2003). Dieses Homeobox-Gen kodiert für ein Protein aus 562 Aminosäuren, das spezifisch in Interneuronen des Prosencephalon und in den männlichen Keimdrüsen exprimiert wird. Es spielt bei der Proliferation und tangentialen Migration der Interneurone und deren Differenzierung eine wesentliche Rolle (Miura et al. 1997, Kitamura et al. 2002).

#### 4.2.4 Mikrolissenzephalie

Bei der Mikrolissenzephalie liegt eine Kombination aus Lissenzephalie und extremer Mikrozephalie bei der Geburt vor, welche durch eine gestörte neuronale Proliferation und Migration verursacht wird (Alkuraya et al. 2011).

#### Einleitung

### 4.3 "Cobblestone"-Lissenzephalien

Die "Cobblestone"-Lissenzephalien oder auch Lissenzephalien Typ II sind eine Gruppe von Kortexfehlbildungen, die durch eine höckerige, pflastersteinartig aussehende Gehirnoberfläche auffallen, die aufgrund einer fehlerhaften Beendigung der Migration zustande kommt. Im MRT zeigt sich eine komplexe kortikale Fehlbildung, die sich durch unterschiedliche Areale mit Agyrie, Pachygyrie und Polymikrogyrie darstellt. Außerdem sind auch Myelinisierungsstörungen, Zysten der Kleinhirnrinde, Ventrikelerweiterungen bis hin zu einem ausgeprägten Hydrozephalus charakteristisch sowie Hirnstamm- und Kleinhirnhypoplasien mit der charakteristischen Knickbildung der Pons (Abb. 6) (Barkovich 1996).





Abb. 6: Axiales und sagittales MRT-Bild zur Darstellung einer "Cobblestone"-Lissenzephalie

Das linke, axiale MRT-Bild stellt die pflastersteinartige Gehirnoberfläche (weißer Pfeil) einer "Cobblestone"-Lissenzephalie dar. Auf dem rechten, sagittalen MRT verweist der senkrechte Pfeil auf die Kleinhirnhypoplasie und der waagerechte Pfeil auf die Verschmälerung der Pons bei einem Patienten mit "Cobblestone"-Lissenzephalie.

Die "Cobblestone"-Lissenzephalien liegen zumeist in Zusammenhang mit drei Syndromen vor, dem Walker-Warburg-Syndrom (WWS), der Fukuyama-kongenitalen Muskeldystrophie (FCMD) und der "Muscle Eye Brain Disease", deren weitere Symptome Augenfehlbildungen und kongenitale Muskeldystrophien sind (Cormand et al. 2001). Es wurden bislang folgende sechs Gene mit der Cobblestone-Lissenzephalie assoziiert: *POMT1, POMT2, POMGnT1, FCMD, FKRP* und *LARGE* (Guerrini und Parrini 2009). Alle kodierten Genprodukte sind in die Glykosylierung von Alpha-Dystroglykan involviert, welches ein extrazelluläres Protein darstellt, das über seine

Glykosylseitenketten an Proteine der extrazellulären Matrix wie Laminin, Agrin und Neurexine bindet (Kobayashi et al. 1998, Yoshida et al. 2001, Beltran-Valero de Bernabe et al. 2002, Beltran-Valero de Bernabe et al. 2004, van Reeuwijk et al. 2005, van Reeuwijk et al. 2007).

#### 5 Das JAKMIP1-Gen

Das JAKMIP1-Gen kodiert für das in der Literatur als Marlin-1, JAKMIP-1 oder JAKMIP1 bezeichnete Protein, welches 73 kDa schwer ist und aus 626 Aminosäuren besteht. Es weist drei "Coiled-Coil"-Domänen und zwei Leucin-Zipper-Motive auf. Das JAKMIP1-Gen ist auf dem kurzen Arm des Chromosoms 4, in 4p16.2, lokalisiert, es erstreckt sich auf der genomischen DNA-Ebene über einen Bereich von etwa 175 kb und besteht aus 24 Exons. Marlin-1 ist ein RNA-bindendes Protein, welches über den N-Terminus mit Mikrotubuli sowie dem Motorprotein Kinesin-1 interagiert. Etwa 200 Aminosäuren am C-Terminus sind für die Bindung an GABAB1-Untereinheiten in Neuronen und Mitgliedern der Janus-Kinasen (JAKs) in Zellen des lymphatischen Systems verantwortlich (Couve et al. 2004, Steindler et al. 2004, Vidal et al. 2007). Marlin-1 wird hauptsächlich im ZNS exprimiert, jedoch auch im Hoden, in Muskelzellen und im lymphatischen Gewebe. Im ZNS wurde eine Expression nur in bestimmten Arealen, wie dem Kleinhirn, dem Bulbus olfactorius, der Großhirnrinde, dem Hippokampus, der Medulla oblongata und der Pons beobachtet. Zusätzlich wurde festgestellt, dass es im Zytoplasma von Dendriten und Axonen von Neuronen lokalisiert ist und dort vor allem mit Mikrotubuli kolokalisiert (Vidal et al. 2009). Ebenso ergab sich eine mögliche Assoziation von Marlin-1 mit neuronalen Migrationsstörungen durch intrauterine Versuche an Mäuseembryonen. Durch das Vermindern der Expression von Marlin-1 durch eine intraventrikuläre Applikation von siRNA konnte bei den Mäuseembryonen festgestellt werden, dass die Neuronen bei der Kortikogenese in ihrer Wanderungsbewegung gestört sind (Vidal et al. 2012).

Diese neuesten Beobachtungen lassen eine wichtige Funktion von Marlin-1 beim intrazellulären Transport und innerhalb des Zytoskeletts vermuten, aufgrund derer sich ein möglicher Zusammenhang mit der Entstehung von neuronalen Migrationsstörungen ergibt. Dieser begründet sich durch die Kenntnisse der Funktion anderer Proteine/Gene, die mit den neuronalen Migrationsstörungen assoziiert sind und zuvor beschrieben wurden. Diese stehen zumeist in einem Zusammenhang mit dem Zytoskelett. Aus diesen Gründen war es das Ziel dieser Doktorarbeit, mögliche Mutationen bei Patienten mit neuronalen Migrationsstörungen bzw. Gehirnfehlbildungen im *JAKMIP1*-Gen ausfindig zu machen.

# III Material und Methoden

### 1 Patienten

#### 1.1 Patienten mit chromosomalen Rearrangements

Bei den drei untersuchten Patienten lagen unterschiedliche reziproke Translokationen vor. Geimeinsam ist ihnen eine Gehirnfehlbildung.

#### 1.2 Patienten für die Sequenzanalyse des JAKMIP1-Gens

Das Patientenkollektiv für die Sequenzanalyse umfasste 75 Patienten, wobei die Patienten-DNAs durch unterschiedliche humangenetische Institute zur Verfügung gestellt wurden. Hauptsächlich sind die Institute des Universitätsklinikums Freiburg, Universitätsklinikums des Schleswig-Holstein, Campus Lübeck, und des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf Die zu nennen. grundsätzliche Gemeinsamkeit des Patientenkollektives war die Kleinhirnaffektion. Bei drei Patienten lag eine Kleinhirnagenesie vor, sieben Patienten zeigten eine Dandy-Walker-Malformation, 27 eine pontocerebelläre Hypoplasie (PCH) und die restlichen 38 Patienten eine Lissenzephalie Typ I mit Kleinhirnhypoplasie (LCH).

# 2 Chemikalien und Lösungsmittel

Agar (Select) Agarose Borsäure Bovines Serumalbumin (BSA) Chloramphenicol Dextransulfat Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA) Ethanol Ethidiumbromid Fixogum Formamid, deionisiert Glycerol Hefeextrakt HPLC Natriumacetat Natriumchlorid

- Invitrogen (Karlsruhe) Invitrogen (Karlsruhe) Merck (Darmstadt) Sigma-Aldrich (Taufkirchen) Sigma-Aldrich (Taufkirchen) Pharmacia (Heidelberg) Merck (Darmstadt)
  - J.T. Baker (Deventer, NL) Merck (Darmstadt) Marabuwerke (Tamm) Qbiogene (Heidelberg) Roth (Karlsruhe) Oxoide (Wesel) Merck (Darmstadt) J.T. Baker (Deventer, NL)

Orange-G Tri-Natriumcitrat-Dihydrat Tris(Hydroxymethyl-)aminomethan [Tris] Trypton 2-Propanol 4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI) Sigma-Aldrich (Taufkirchen) Merck (Darmstadt) Sigma-Aldrich (Taufkirchen)

> Difco (Kansas, USA) BD (Heidelberg) Fluka (Buchs, CH) Serva (Heidelberg)

# 3 Kits, Enzyme und Nukleinsäuren

BigDye<sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit CGH Nick Translation Kit DNA-Standard (1 kb- und 100 bp-Leiter) DNA-Standard "Fast Ruler<sup>TM</sup>" (Low Range Leiter) **Eco**RI Exonuclease I, E.coli FastAP<sup>TM</sup> Thermosensitive Alkaline Phosphatase FastDigest<sup>®</sup> EcoR1 GenomiPhi<sup>TM</sup> V2 DNA Amplification Kit Humane Cot-1 DNA [1 mg/ml] Lachssperma-DNA Typ III Nick Translation Enzymmix (DNase I, DNA Pol I) NucleoBond<sup>®</sup> Xtra Midi Nukleotidmix (dNTPs) (je 10 mM) *Taq*-DNA-Polymerase [5 U/µl]

Life Technologie (Darmstadt)

Vysis, Inc. (Downers Grove, IL, USA) Invitrogen (Karlsruhe) Fermentas (St. Leon-Rot)

> Promega (Mannheim) Fermentas (St. Leon-Rot) Fermentas (St. Leon-Rot)

Fermentas (St. Leon-Rot) GE Healthcare (Freiburg) Invitrogen (Karlsruhe) Sigma (Taufkirchen) Vysis, Inc. (Downers Grove, IL, USA)

> Macherey-Nagel (Düren) Invitrogen (Karlsruhe) Qiagen (Hilden)

# 4 Medien, Zusätze, Puffer und Lösungen

### 4.1 Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten

LB-Medium	10 g 5 g 10 g ad 1000 ml pH	Trypton Hefeextrakt Natriumchlorid Aqua dest. 7,0
Agar für Festmedien	15 g/l	Agar
Chloramphenicol	1 ml für 1 l	Stock: 50 mg/ml (in 100% Ethanol)

# 4.2 PCR-Puffer

10x PCR-Puffer Qiagen (Hilden)	15 mM pH	MgCl <sub>2</sub> Tris-Cl KCl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> 8,7
4.3 Puffer und Lösungen	für die Agarose-(	Gelelektrophorese
10x TBE	890 mM 890 mM 20 mM pH	Tris Borsäure EDTA 8,0
10x Ladepuffer für DNA	25 ml 25 ml 20 mg	Glycerin (100%) 1x TBE Orange-G
Ethidiumbromid	0,05%	(in Aqua dest.)
4.4 Puffer und Lösungen	für die Fluoresze	enz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)
20x SSC	3 M 0,3 M pH	NaCl Tri-Natriumcitrat-Dihydrat 7,0
Denaturierungslösung	70 % pH	Formamid in 2x SSC 7,0
Hybridisierungspuffer (Master-Mix)	5 ml 1 ml 100 μg/ml pH	50% Formamid 10% Dextransulfat in 2x SSC Lachssperma-DNA Typ III 7,0
Denaturierungslösung	50% pH	Formamid in 2x SSC 7,0
DAPI-Stock-Lösung	5 mg/ml	4',6-Diamidino-2- phenylindole/HCl
DAPI-Färbe-Lösung	0,1 ‰ DAPI	Stocklösung in 2x SSC
4.5 Sonstige Puffer		
10x nick Translationspuffer	500 mM 100 mM 1 mM	Tris-HCl (pH 7.2) Tris-HCl (pH 7.2) Tris-HCl (pH 7.2)

Restriktionspuffer "FastDigest<sup>®</sup>"

Restriktionspuffer "Multi-Core<sup>TM</sup>"

# 5 Gerätschaften

Agarplatten Autoklav Deckgläser Digitalkamera Drucker Digital Graphic Printer Eismaschine Fluoreszenz-Mikroskop "Leica DM RA" Gelelektrophoresekammer Heizblock (Typ: 52526101) Inkubator Shaker Model G25 Kühlzentrifuge 5417R Kühlzentrifuge 5810R Kunststoff-Tubes Falcon Magnetrührer RET basic Objektträger PCR-Cycler MJ Research PTC 200 PCR-Tubes (0,5 ml) PIPETBOY acu Pipetten Finnpipetten Spannungsgeber *Electrophoresis power* supply ST305 Spannungsgeber Electrophoresis power supply PS3002 Spannungsgeber Power Pac 300 Sterilwerkbank HERA safe Typ 12/2, 1995 Thermomixer *compact* Tischzentrifuge "Biofuge Pico" UV-Transilluminator UVT-28M Vortex-Gerät "Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000" Waage "Sartorius ISO 9001" Wasserbad "GFL 1083" Zentrifuge Megafuge 1.0

Fermentas (St. Leon-Rot)

Promega (Mannheim)

Greiner (Kremsmünster, AUT) Tecnomara (Fernwald) Marienfeld (Lauda-Königshofen) OLYMPUS (Hamburg) SONY (Japan) Ziegra (Isernhagen) Leica Microsystems (Wetzlar)

BioRad (München) Liebisch (Bielefeld) New Brunswick Scientific (Edison, NJ) Eppendorf AG (Hamburg) Eppendorf AG (Hamburg) Becton Dickinson GmbH (Heidelberg) IKA Labortechnik (Staufen i. Br.) Marienfeld (Lauda-Königshofen) MJ Research, Inc. (Watertown, USA) Biozym Diagnostik GmbH (Oldenburg) IBS Integra Biosciences (Fernwald) Thermo Labsystems (Mannheim) Life Technologies (Karlsruhe)

Life Technologies (Karlsruhe)

BioRad (München) Heraeus (Hannover)

Eppendorf AG (Hamburg) Heraeus (Hannover) Herolab (Wiesloch) Scientific Industries, INC. (Bohemia, New York, USA) Sartorius (Göttingen) GFL (Burgwedel) Heraeus (Hannover)

# 6 Oligonukleotide für die Sequenzanalyse des Gens JAKMIP1

Die verwendeten Oligonukleotide für die PCR-Analysen wurden mit Hilfe des webbasierten Programms *Primer3Plus* (Untergasser et al. 2007) ermittelt und von der Firma *Sigma-Aldrich* bezogen (Tab.1).

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
Marlin1-2F	GCTCCAGATGAGGCAGGTG	Marlin1-2R	TGGAACAGGCTCTTCACACA
Marlin1-3drF	GGAATCCATGGGAACGTG	Marlin1-3zwR	CTCCAGGCATTGTTCAAAGC
Marlin1-4/5F	GGGGAGAGATTTCCTTGGTC	Marlin1-4/5seqR	AGTTCTTTGTGCTGGACGCT
Marlin1-5zwF	TCTTTGTGCTGGACGCTGT	Marlin1-5zwR	TGGAGAGGATGTTCATTGCA
Marlin1-6F	GGGTTGAGTCTCTGCTCACC	Marlin1-6R	CACTCCCTTCTCTGTCTGGG
Marlin1-7F	AGCTCCACTCCAGCACTGTC	Marlin1-7R	GTGTCAGGAACGGGTGTTG
Marlin1-8F	TGGCTTTGGTTTGTGAGATG	Marlin1-8R	TGGAGTGGGGGGGGTTTTACA
Marlin1-9F	CGACCAGGGACTGGTAGACT	Marlin1-9R	ACCTCACCCCAGATGCTCT
Marlin1-10zwF	GCAGCACTGTGAGATGTGGT	Marlin1-10zwR	CATACCCTGGCTTGGACACT
Marlin1-11F	TAAGGACCCTAGGCATTGCT	Marlin1-11R	TCTGTCCCCTTGGTGGTATC
Marlin1-12F	TGACCTTTCTCACTAAAAGTTTGTT	Marlin1-12R	GCTCAGACTACACGGGTCGT
Marlin1-13F	CTCCAGCCACTCAGTCAGGT	Marlin1-13R	CCTATGGCTTGTTTTGCACTT
Marlin1-14F	GGGAAAATGGCAAGTGGTAA	Marlin1-14R	CTCAGCTGCAAAGGGGGA
Marlin1-15F	CGTGGCCCTAGAAATTGGT	Marlin1-15R	CTTTTGTATGGCCGTGTTCC
Marlin1-16F	TTGCTTGGTGCTGACTGTCT	Marlin1-16R	TACATTGGCGTCTTGCTTTG
Marlin1-17F	GAAATTCCACAGCCCCTTG	Marlin1-17R	TTGATTTGCAGGAAGGCTTT
Marlin1-18F	CTAGCAAACGGGCTCTGAAG	Marlin1-18R	TTTCCTCTGGGGGCTGAAACT
Marlin1-19F	CTGGCTCTGCCTCCACTG	Marlin1-19R	CCATCATATCTCCCCGTGAC
Marlin1-20F	GCTTCTGTGCTAGACCACAATAAA	Marlin1-20R	TTTTATTTCATAAGGTCCAAAGCA
Marlin1-21F	AAAATGCTGTCATTGAGTTCCA	Marlin1-21R	TCCTTGAGAGATGAGGCACC

Tab. 1: Oligonukleotide für die Sequenzanalyse des JAKMIP1-Gens

### 7 BAC- und Fosmid-Klone

Die hier verwendeten BAC-Klone wurden von *Invitrogen* (Karlsruhe) und *imaGenes* (Berlin) bezogen. Die klonierte DNA der BAC-Klone stammt aus den Lymphozyten eines Mannes; die BACs stammen aus der Bibliothek "RP11-" (Osoegawa et al. 2001). Die Klone tragen die Anfangsbezeichnung "RP11-", die durchschnittliche Größe der BAC-Inserts beträgt ca. 174 kb, wobei die DNA-Fragmente in den Vektor pBACe3.6 kloniert wurden. Des Weiteren wurden einige BAC-Klone verwendet, dessen klonierte DNA aus menschlichen Spermazellen stammt; die BACs stammen aus der Bibliothek "D" des *California Institute of Technology*. Diese Klone tragen die Anfangsbezeichnung "CTD-". Hier beträgt die durchschnittliche Größe der BAC-Inserts

ca. 129 kb, und die DNA-Fragmente wurden in den Vektor pBeloBAC11 kloniert. Die physikalischen Angaben zu den DNA-Inserts beziehen sich auf die humane Genomreferenzsequenz *Human Feb. 2009 (GRCh37hg19)*.

Die Fosmid-Klone stammen aus der Bibliothek *WIBR-2* und wurden vom *BACPAC Resources Center* (Oakland, Kalifornien, USA) bezogen. Die Inserts dieser Klone sind mit ungefähr 40 kb deutlich kleiner als die der BAC-Klone. Die DNA-Fragmente stammen aus Lymphozyten einer Frau und wurden in den Vektor pEpiFOS5 kloniert. Die Bezeichnung der Fosmid-Klone beginnt mit "G248P8". Die physikalischen Angaben zu den DNA-Inserts beziehen sich auf die humane Genomreferenzsequenz *Human Feb. 2009 (GRCh37hg19)*. Des Weiteren wurden zwei Sonden zur Identifizierung einer das *LIS1*-Gen umfassenden Deletion auf dem Chromosom 17 bestellt: die 350 kb große KBI-40101 Miller-Dieker LIS-Sonde der Firma *Kreatech* und die 110 kb große Sonde Vysis LSI LIS1 der Firma *Vysis*.

BAC-Klone	Region	Anfang (bp)	Ende (bp)	Herkunft
RP11-460I13	1p35.3	28,234,187	28,402,651	Invitrogen
RP11-376P8	1p35.2	30,190,657	30,220,416	Invitrogen
RP11490K7	1p35.2	31,576,660	31,751,400	Invitrogen
RP11-395N6	1p35.1	32,860,071	32,956,460	Invitrogen
RP11-415J8	1p35.1	33,669,772	33,856,436	Invitrogen
RP11-26F12	1p35.1-p34.3	34,514,167	34,688,706	imaGenes
RP11-435D7	1p34.3	36,087,555	36,279,850	imaGenes
RP11-329N22	1p34.3	38,759,226	38,953,051	imaGenes

#### 7.1 BAC-Klone aus der Region 1p35.3-p34

#### 

Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer nach Telomer sortiert. Angegeben ist die Region, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

#### 7.2 BAC-Klone aus der Region 4q12-q13.1

BAC-Klone	Region	Anfang (bp)	Ende (bp)	Herkunft
RP11-1077L17	4q12	55,488,713	55,691,933	imaGenes
RP11-528I4	4q12	56,384,401	56,544,261	Invitrogen
RP11-533F5	4q12	57,548,670	57,752,309	Invitrogen
RP11-685F15	4q12	58,448,506	58,491,227	imaGenes
RP11-25L5	4q12	58,924,121	59,106,713	Invitrogen
RP11-506N2	4q13.1	59,646,791	59,849,859	Invitrogen
RP11-474J22	4q13.1	59,715,229	59,915,919	Invitrogen

RP11-451H19	4q13.1	59,895,920	60,061,347	Invitrogen
RP11-892H24	4q13.1	59,979,925	60,178,365	Invitrogen
RP11-991A19	4q13.1	60,144,588	60,358,801	Invitrogen
RP11-321L4	4q13.1	60,356,876	60,386,115	Invitrogen
RP11-325J7	4q13.1	61,662,158	61,669,649	Invitrogen

#### Tab. 3: Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 4

Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer nach Telomer sortiert. Angegeben ist die Region, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

BAC- und	Region	Anfang (bp)	Ende (bp)	Herkunft
Fosmid-Klone				
RP11-95E2	7p12.2	50,475,208	50,650,097	Invitrogen
CTD-2568K21	7p12.1	51,118,149	51,294,657	Invitrogen
RP11-576H9	7p12.1	51,971,337	52,151,483	Invitrogen
RP11-598O8	7p12.1	53,003,535	53,152,852	Invitrogen
RP11-678B3	7p12.1-p11.2	53,836,266	53,991,776	Invitrogen
RP11-908F8	7q36.3	155,801,995	155,908,401	imaGenes
RP11-672G10	7q36.3	156,065,984	156,225,118	imaGenes
RP11-260H17	7q36.3	156,252,670	156,351,372	imaGenes
RP11-42I12	7q36.3	156,508,283	156,668,736	imaGenes
RP11-593I20	7q36.3	156,563,703	156,754,284	Invitrogen
G248P80376E10	7q36.3	156,653,505	156,695,553	BACPAC
G248P85405A5	7q36.3	156,687,450	156,726,290	BACPAC
G248P8537G12	7q36.3	156,706,156	156,748,499	BACPAC
G248P82040H4	7q36.3	156,745,261	156,785,107	BACPAC
G248P84315E3	7q36.3	156,785,136	156,823,803	BACPAC
G248P87284G5	7q36.3	156,790,653	156,831,773	BACPAC
RP11-1023A12	7q36.3	156,690,590	156,874,402	Invitrogen
RP11-899F14	7q36.3	156,861,049	157,029,823	Invitrogen
RP11-232K17	7q36.3	156,985,613	157,141,790	Invitrogen
RP11-96I8	7q36.3	157,032,972	157,187,950	imaGenes

#### 7.3 BAC- und Fosmid-Klone aus der Region 7p12.2-p11.2 und 7q36.3

 Tab. 4:
 Verwendete BAC- und Fosmid-Klone für das Chromosom 7

Die BAC- und Fosmid-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer nach Telomer sortiert. Angegeben ist die Region, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

#### 7.4 BAC- und Fosmid-Klone aus der Region 9q34.13-q34.3

BAC- und Fosmid-Klone	Region	Anfang (bp)	Ende (bp)	Herkunft
RP11-738I14	9q34.13	135,302,242	135,491,962	imaGenes
RP11-317B10	9q34.2	136,497,594	136,543,740	imaGenes
RP11-555H7	9q34.3	138,193,621	138,299,511	imaGenes

RP11-83N9	9q34.3	138,983,971	139,136,889	Invitrogen
RP11-707O3	9q34.3	139,250,847	139,453,805	Invitrogen
G248P81654G3	9q34.3	139,486,952	139,527,559	BACPAC
CTD-2551F21	9q34.3	139,434,485	139,634,459	Invitrogen
G248P81152G5	9q34.3	139,583,833	139,627,610	BACPAC
RP11-216L13	9q34.3	139,617,968	139,797,970	Invitrogen
RP11-48C7	9q34.3	140,341,752	140,514,746	Invitrogen
RP11-417A4	9q34.3	140,403,357	140,596,187	Invitrogen

Tub. 5. Ver wendete brie und Fosiniu Rione fur dus enformosom /
---

Die BAC- und Fosmid-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer nach Telomer sortiert. Angegeben ist die Region, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

BAC-Klone	Region	Anfang (bp)	Ende (bp)	Herkunft
RP11-135N5	17p13.3	2,369,442	2,545,428	Invitrogen
CTD-3060P21	17p13.3	2,774,384	2,926,454	Invitrogen
RP11-64J4	17p13.3	3,171,922	3,317,824	Invitrogen
RP11-530N7	17p13.2	6,754,940	6,882,140	Invitrogen

#### 7.5 BAC-Klone aus der Region 17p13.3-p13.2

#### Tab. 6:Verwendete BAC-Klone für das Chromosom 17

Die BAC-Klone wurden nach ihrer Lokalisation von Zentromer nach Telomer sortiert. Angegeben ist die Region, die Lokalisation auf dem Chromosom mit Anfang und Ende sowie der Hersteller, von dem der jeweilige Klon bezogen wurde.

# 8 Molekularbiologische Methoden

#### 8.1 Amplifikation von genomischer DNA

Die Amplifikation der gesamten genomischen DNA (<u>whole genome amplification</u> - WGA) wurde mit Hilfe des *GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* nach Angaben des Herstellers *GE Healthcare* durchgeführt. Die verwendete *Phi29*-DNA-Polymerase besitzt neben einer hohen Prozessivität und einer korrekturlesenden  $3' \rightarrow 5'$ -Exonuklease-Aktivität auch *strand displacement*-Aktivität, wodurch die neu synthetisierten Stränge auch als Matrize für weitere Amplifikationen dienen können und Temperaturzyklen überflüssig werden. So ist es möglich, aus 10 ng eingesetzter DNA 4–7 µg amplifizierte DNA pro 20 µl Reaktionsansatz zu erhalten.

Zunächst wurde die zu amplifizierende DNA [~10 ng/µl] in einem Probenpuffer (Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben) denaturiert. Dieser denaturierten Probe wurde anschließend ein Reaktionspuffer (genaue Zusammensetzung vom

Hersteller nicht angegeben), der vor allem Random-Hexamernukleotide, dNTPs und Puffer enthält, und die *Phi29*-DNA-Polymerase zugesetzt. Die Reaktion erfolgte isotherm für 90 min bei 30°C, anschließend wurde die Polymerase für 10 min bei 65°C inaktiviert. Alle Schritte dieser WGA-Reaktion wurden im *PTC-200 Thermocycler* der Firma *MJ Research* durchgeführt.

#### 8.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, <u>polymerase chain reaction</u>) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten. Unter Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen sowie zweier Oligonukleotide (Primer), die zu je einem Abschnitt der DNA revers komplementär sind, kann dieser aus genomischer DNA vervielfältigt werden (Mullis and Faloona 1987). In der Regel wurden für einen PCR-Ansatz 100 ng DNA (Matrize), je 10 pmol der beiden Primer, 0,5 µl Desoxynukleotide (2,5 mM je Nukleotid) und 0,2 µl (5 U/µl) *Taq*-Polymerase, die aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde, verwendet. Hinzu kamen 2,5 µl 10x PCR-Puffer und HPLC-H<sub>2</sub>O, so dass ein Reaktionsvolumen von 25 µl entstand. Der Standard PCR-Ansatz sah wie folgt aus:

K)
\$

Alle im Nachfolgenden erläuterten Amplifikationsreaktionen wurden im *PTC-200 Thermocycler* durchgeführt. Die PCR-Kettenreaktion kann dabei in fünf Schritte unterteilt werden, wobei drei Reaktionsschritte repetitive Reaktionszyklen darstellen.

1. Initiale	95°C	2 min	
2. Denaturierung	95°C	20 s	J
3. Annealing	45 – 65°C	10 s	
4. Elongation	72°C	30 - 40  s	J
5. Finale Elongation	72°C	3 min	

Die Denaturierung dient der Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge. Anschließend erfolgt beim *Annealing* die komplementäre Hybridisierung der eingesetzten Oligonukleotide, wobei die Anlagerungstemperatur von der Schmelztemperatur der Primer abhängig ist. In der Elongation kommt es zur Polymerisation von Desoxynukleotiden komplementär zu der Ausgangs-DNA. Die Elongationszeit richtet sich dabei nach der Länge des zu synthetisierenden Amplikons, wobei Polymerasen 500–1000 bp pro Minute polymerisieren können. Das Prinzip der Kettenreaktion besteht in der Wiederholung der Denaturierung, in der sich die neusynthetisierten DNA-Stränge wieder von der Matrize lösen, des *Annealings* und der Elongation (30–35 Zyklen). Die in jedem Zyklus entstehenden neusynthetisierten DNA-Stränge dienen als Matrize im nächsten Zyklus, so dass es möglich ist, eine exponentielle Vermehrung des Ausgangsmaterials zu erreichen. Mit einer finalen Elongation wird dann die Polymerisation des DNA-Materials abgeschlossen.

Um die Ausbeute an PCR-Produkten zu erhöhen, ohne die Spezifität der entstehenden Produkte zu gefährden, wurden so genannte *Touchdown*-PCRs durchgeführt. Dabei wird die Anlagerungstemperatur der Primer schrittweise zweimal um 2°C erniedrigt, z.B. wurde beim Programm TD64 für vier Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 64°C begonnen, weitere vier Zyklen erfolgten mit einer Anlagerungstemperatur von 62°C und 30 Zyklen mit 60°C.

Je nach verwendetem Primerpaar variierten die PCR-Bedingungen. Nachfolgend wird ein Überblick über die PCR-Bedingungen der einzelnen Exons von *JAKMIP1* gegeben (Tab. 7).

Exon	Primerpaar	Produktgröße (bp)	PCR-Programm
(Amplikon)			
2	Marlin1-2F+2R	469	TD66
3	Marlin1-3drF+3zwR	744	TD65
4+5	Marlin1-4/5F+5zwR	1103	TD62
6	Marlin1-6F+6R	286	TD62
7	Marlin1-7F+7R	295	TD60
8	Marlin1-8F+8R	209	TD62
9	Marlin1-9F+9R	242	TD62
10	Marlin1-10zwF+10zwR	380	TD62
11	Marlin1-11F+11R	243	TD62
12	Marlin1-12F+12R	223	TD62
13	Marlin1-13F+13R	455	TD60
14	Marlin1-14F+14R	243	TD62
15	Marlin1-15F+15R	273	TD62
----	-----------------	-----	------
16	Marlin1-16F+16R	226	TD62
17	Marlin1-17F+17R	213	TD62
18	Marlin1-18F+18R	233	TD62
19	Marlin1-19F+19R	468	TD70
20	Marlin1-20F+20R	243	TD62
21	Marlin1-21F+21R	273	TD61

Tab. 7: PCR-Bedingungen für die einzelnen Exons des JAKMIP1-Gens

Die Exons 4 und 5 wurden in einer PCR-Reaktion gemeinsam amplifiziert.

#### 8.3 Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung von PCR-Produkten und Restriktionsspaltungen von BAC-Klonen wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosegelkonzentrationen von 0,8-2% (w/v) verwendet. Die Agarose wurde in 1x TBE-Puffer aufgekocht, anschließend auf etwa 50°C abgekühlt und in einen geeigneten Gelschlitten mit eingesetzten Gelkämmen gegossen. Das auspolymerisierte Gel wurde in einer Gelkammer positioniert, mit Elektophoresepuffer (1x TBE) überschichtet und von den Kämmen befreit. Die entstandenen Geltaschen wurden nun mit einer Mischung aus den DNA-Proben und ~1/4 Volumen DNA-Ladepuffer (Orange G) beladen. Als Größenstandard wurde ein DNA-Standard-Marker aufgetragen. Eine Spannung, dessen Stärke sich nach der Größe der Ladung der Fragmente richtete, wurde angelegt. Im Fall von PCR-Produkten wurde eine Spannung von 160 V und eine Laufzeit von 30 min gewählt, im Falle von Restriktionsfragmenten eine Spannung von 100 V und eine Laufzeit von 3 h. Aufgrund von Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA weist diese eine negative Gesamtladung auf, so dass DNA in einem angelegten elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandert. Die Laufstrecke der Fragmente ist dabei dem Logarithmus seines Molekulargewichts umgekehrt proportional, wodurch kleinere Fragmente schneller durch die Gelporen wandern als größere. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer 0,05%igen Ethidiumbromid-Lösung für mindestens 15 min inkubiert. Der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA, sodass nach Anregung mit UV-Licht (254 nm) die DNA durch die resultierende Fluoreszenz auf einem Transilluminator-Tisch nachgewiesen und mit Hilfe des aufgetragenen Längenstandards die Größe des jeweiligen DNA-Fragments abgeschätzt werden konnte.

#### 8.4 Aufreinigung von PCR-Produkten

Vor der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte mit dem Enzymmix ExoSAP aufgereinigt. Der Enzymmix wird im Verhältnis 1:2 aus der Exonuclease I aus *E.coli* und der *FastAP*<sup>TM</sup> *Thermosensitive Alkaline Phosphatase* der Firma *Fermentas* hergestellt und dient dem Entfernen von einzelsträngiger DNA (Primer), die die nachfolgende Sequenzierung des PCR-Produktes störten. Der ExoSAP-Ansatz sah wie folgt aus:

0,6 µl	PCR-Produkt
0,5 µl	ExoSAP
6 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
7,1 µl	Gesamtvolumen

Die ExoSAP-Reaktion erfolgte für 15 min bei 37°C, anschließend folgte die Enzyminaktivierung für 15 min bei 80°C. Die Reaktion wurde im *PTC-200 Thermocycler* der Firma *MJ Research* durchgeführt.

#### 8.5 DNA-Sequenzierung

durchgeführten DNA-Sequenzierung Das Prinzip der beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977) und erfolgte mit dem ABI Prism BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit (Life Technologies, Darmstadt) und dem Sequenziergerät ABI 3130 der Firma Life Technologies (Darmstadt). Die Methode beruht darauf, dass neben 2'-Desoxyribonukleotiden (dNTPs) auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in die zyklische Sequenzierreaktion eines spezifischen PCR-Produktes eingesetzt werden. Wird während der Amplifizierungsreaktion, die sich im Wesentlichen aus Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation zusammensetzt, ein solches ddNTP in den entstehenden DNA-Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Sequenzierreaktion. Der Abbruch erfolgt, weil den ddNTPs die 3'-OH-Gruppe fehlt, die für die Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke mit der Phosphatgruppe des benachbarten dNTPs oder ddNTPs notwendig ist. Die so entstehenden DNA-Fragmente sind aufgrund des zufälligen Einbaus von ddNTPs unterschiedlicher Länge und je nach Didesoxynukleotid mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Durch Kapillarelektrophorese werden die DNA-Fragmente nach Größe aufgetrennt, und durch einen Laser wird der jeweilige Fluoreszenzfarbstoff angeregt. Die einzelnen Farbstoffe haben ihre Fluoreszenzmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen. Durch eine elektronische Messung der Fluoreszenzmaxima und eine anschließende Computerverarbeitung der Signale wird ein Sequenzchromatogramm erstellt.

Die Reaktion wurde mit nur einem Primer durchgeführt, um nur einen Strang als Matrize für die Sequenzierung zu nutzen. Der Ansatz für die Sequenzierung sah wie folgt aus:

2 µl	ExoSAP-Produkt
0,5 µl	Primer Fwd oder Rev (10 pmol/µl)
1 µl	BigDyeMix
2 µl	BigDye Terminatorpuffer (5x)
4,5 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
10 µl	Gesamtvolumen

Die Sequenzierreaktion lief unter folgendem Programm im *PTC-200 Thermocycler* der Firma *MJ Research*:

96°C	5 min		
96°C	50 sec		
55°C	10 sec	$\geq$	30 Zyklen
60°C	4 min		2
72°C	4 min		

Im Anschluss erfolgte eine Aufreinigung des Sequenzierprodukts durch eine Natriumacetat (NaAc)-Fällung, um hierdurch nicht eingebaute dNTPs und ddNTPs zu entfernen, die wie folgt aussah:

10 µl	Sequenzierprodukt
5 µl	NaAc (3M, pH 5,2)
125 µl	Ethanol (abs.)
40 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
180 µl	Gesamtvolumen

Dieser Fällungsansatz wurde kurz gevortext und anschließend bei 14.000 Upm bei 20°C für 20 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das DNA-Pellet

in 250  $\mu$ l 70% Ethanol (v/v) gewaschen, erneut wie beschrieben für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei 37°C für ca. 15 min getrocknet und bis zur Sequenzierung im Kapillarsequenzierer bei -20°C gelagert.

#### 8.6 Isolierung von BAC-DNA aus *E.coli*

Die für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) benötigte reine BAC-DNA wurde anhand einer Midipräparation mit Hilfe des *Nucleo Bond Xtra Midi Kits* der Firma *Macherey/Nagel* aus den Bakterien isoliert. Das Protokoll wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt und beruht wesentlich auf den Schritten der Bakterienlyse, der Immobilisierung der DNA an eine Anionenaustauschersäule mit gleichzeitiger Entfernung der Proteine und RNA durch Waschen mit einer schwach konzentrierten Salzlösung und anschließender Elution der immobilisierten DNA mit einer hoch konzentrierten Salzlösung. Im Anschluss erfolgte die Präzipitation der isolierten DNA mit Isopropanol und die Resuspendierung des DNA-Pellets in 100 µl TE-Puffer. Die DNA-Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

#### 8.7 Restriktionsanalyse von DNA

Zur Kontrolle der Qualität und der Quantität der DNA, die bei der Midipräparation isoliert wurde, wurden Restriktionsanalysen mit dem Restriktionsenzym *Eco*RI durchgeführt (Smith und Birnstiel 1976). Dieses Enzym gehört zu den Typ-II-Endonukleasen, welche eine spezifische, palindromische Sequenz erkennen, und schneidet diese unter der Entstehung so genannter *sticky ends*.

5 µl	DNA
2 µl	BSA (10x)
2 µl	Puffer (10x)
1 µl	<i>Eco</i> RI (6 U)
10 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
20 µl	Gesamtvolumen

Es wurden zwei verschiedene *Eco*RI Enzyme verwendet. Bei der Verwendung des *Eco*RI von *Promega* wurde der dazugehörige Puffer *Multi-Core*<sup>TM</sup> (10x) verwendet. Der Ansatz wurde für 90 min bei 37°C im Heizblock inkubiert.

Bei der Verwendung des *FastDigest<sup>®</sup> Eco*RI von *Fermentas* wurde der dazugehörige *FastDigest<sup>®</sup>* Puffer verwendet. Die Inkubation erfolgte für 5 min bei 37°C im

Heizblock. Anschließend wurden beide Ansätze gleich behandelt, mit 1/4 Volumen Orange G-Ladepuffer versetzt und in einer Agarosegelelektrophorese analysiert. Das Gel wurde mit Ethidiumbromid angefärbt und unter UV-Licht fotografiert. Anhand der Stärke der Banden ließ sich die Menge der vorhandenen DNA abschätzen.

### 9 Molekularzytogenetische Methode

#### 9.1 Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

#### 9.1.1 Herstellung der Chromosomenpräparate

Für die FISH-Analysen standen Chromosomenpräparate zur Verfügung, die entweder aus heparinisiertem, peripherem Blut oder lymphoblastoiden Zellen hergestellt wurden. Das dafür verwendete Protokoll entspricht dem Protokoll aus *Current Protocols in Human Genetics* (Dracopoli 2000).

#### 9.1.2 Vorbehandlung der Chromosomenpräparate

Da die bereitgestellten Chromosomenpräparate für die nachfolgende Hybridisierung mit den DNA-Sonden einzelsträngig vorliegen müssen, wurden sie einer Vorbehandlung unterzogen. Dazu wurden zunächst die Chromosomenpräparate, die auf Objektträgern fixiert sind, für 5 min in 2x SSC gewaschen und in einer aufsteigenden Ethanolreihe (70%, 80% und 95%) dehydriert. Daraufhin wurden die getrockneten Objektträger in 70%-igem Formamid (in 2x SSC) für genau 3 min denaturiert. Die Formamidlösung musste dazu eine Temperatur zwischen 68°C und 72°C aufweisen. Nach einem weiteren Waschen der Objektträger in eiskalten 2x SSC erfolgte eine erneute Dehydrierung der Chromosomenpräparate in einer aufsteigenden, eiskalten Ethanolreihe (70%, 80% und 95%). Die getrockneten Objektträger standen nach dieser Prozedur für die Hybridisierung bereit.

#### 9.1.3 Fluoreszenzmarkierung der DNA-Sonden

Die Markierung der DNA-Sonden erfolgte mit der *nick translation*-Methode anhand des *CGH Nick Translation Kit* der Firma *Vysis* (Downers Grove, USA). Die Methode basiert darauf, dass die im Enzymgemisch enthaltene DNase I an zufälligen Stellen Einzelstrangbrüche, so genannte *nicks*, in einen vorhandenen DNA-Doppelstrang einfügt. Die ebenfalls enthaltene, prokaryotische DNA-Polymerase I benutzt die

entstandenen freien 3'-OH-Enden dieser *nicks* als Primer für die 5' $\rightarrow$ 3'-DNA-Synthese. Im Markierungsansatz ist neben den DNA-Bausteinen dCTP, dGTP, dTTP und dATP auch der RNA-Baustein dUTP enthalten. Dieser substituiert im Reaktionsmix zu 50% das dTTP und ist mit dem Fluoreszenzfarbstoff *SpectrumGreen* markiert. Diese Mischung verringert zwar den Einbau des markierten Nukleotids, erhöht jedoch die Effizienz der DNA-Polymerase I. Diese entfernt gleichzeitig zum Nukleotid-Einbau mit ihrer 5' $\rightarrow$ 3'-Exonuclease-Aktivität die Nukleotide in Syntheserichtung, so dass eine fortlaufende Strangsynthese erfolgen kann. Bei einer Reaktionstemperatur von 15°C wird so unmarkierte DNA durch neu synthetisierte markierte DNA ersetzt. Pro Sonde wurde folgender Reaktionsansatz pipettiert:

2,75-6,75µl	Nuklease-freies H <sub>2</sub> O
$2,0-6,0 \mu$ l	DNA (~500 ng)
1,25 µl	SpectrumGreen dUTPs (0,2 mM)
2,5 µl	dTTP (0,1 mM)
5,0 µl	dNTP Mix (0,1 mM)
2,5 µl	10x Nick Translationspuffer
5,0 µl	Nick Translation Enzymmix*
25,0 µl	Gesamtvolumen

Der Reaktionsansatz wurde kurz gevortext und für 2–4 h bei 15°C inkubiert. Anschließend wurden die Enzyme für 10 min bei 70°C inaktiviert und der Ansatz wieder auf Eis abgekühlt. Die nachfolgende Ethanol-Fällung des Markierungsproduktes erfolgte zur Abtrennung nicht-inkorperierter Nukleotidbausteine; es wurden folgende Reagenzien hinzugefügt:

3 µl	NaAc (3M) (pH 5,2)
4 µl	humane Cot-1-DNA
0,5 µl	Lachssperma-DNA
75 µl	Ethanol abs.
25 µl	Markierungsansatz
107,5 µl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde gevortext und für mindestens eine Stunde bei -20°C gefällt. Anschließend wurde der Mix für 30 min bei 4°C und 14.000 Upm zentrifugiert und danach der Überstand dekantiert. Das Pellet wurde zweimal mit 250  $\mu$ l 70% (v/v) Ethanol gewaschen und anschließend für etwa 15 min bei 37°C getrocknet.

#### 9.1.4 Hybridisierung der Chromosomenpräparate

die vorbehandelten Für Hybridisierung der Sonden-DNA mit den Chromosomenpräparaten wurde zunächst das Pellet aus der Ethanol-Fällung in 12 µl Hybridisierungspuffer aufgenommen und die DNA-Sonde für 10 min bei 95°C denaturiert. Anschließend erfolgte für 90 min bei 37°C die Absättigung der repetitiven Sequenzen mit der im Fällungsansatz enthaltenen humanen Cot-1-DNA. Diese ist eine aus Plazenta-DNA gewonnene und angereicherte Mischung von repetitiven DNAs, die zur Kompetition von repetitiven Sequenzen der Sonden-DNA dient. Dieser Vorgang wird als *Pre-Annealing* bezeichnet und basiert auf einer schnellen Reassoziationskinetik von repetitiver DNA. Nach der Inkubationszeit wurde der Hybridisierungsansatz auf das vorbehandelte Chromosomenpräparat pipettiert, ein Deckgläschen (20x20 mm) aufgelegt und die Ränder mit Fixogum abgedichtet. Die betropften Chromosomenpräparate wurden über Nacht in einer Feuchtkammer bei 37°C inkubiert.

#### 9.1.5 Färben und Eindecken der Chromosomenpräparate

Das Deckgläschen wurde von dem Chromosomenpräparat, auf das über Nacht die DNA-Sonde hybridisiert hatte, entfernt. Es erfolgte eine Waschung der Objektträger in 2x SSC für 5 min und anschließend wurde das Chromosomenpräparat zur Entfernung unspezifischer Bindungen für wenige Sekunden in dem 42°C warmen, 50%-igen Formamid (in 2x SSC) geschwenkt und erneut in 2x SSC gewaschen. Die Färbung des Präparats wurde für 5 min in 0,1‰ DAPI-Lösung durchgeführt. Nachfolgend wurde das Chromosomenpräparat für 5 min in Wasser geschwenkt und zur Verstärkung der Hybridisierung mit 20 µl *Vectashield Mounting Medium* eingedeckt.

Die Auswertung des FISH-Experimentes wurde an einem *Leica*-Fluoreszenzmikrokop durchgeführt. Die Darstellung der DAPI-Färbung erfolgte mit Hilfe des dreifach BGR-Filters. Dieser besitzt 3 Anregungsstufen bei 405 bis 435 nm, bei 487 bis 502 nm und bei 560 bis 580 nm, so dass das durchscheinende Licht weiß erscheint. Die Darstellung der Fluoreszenzsignale wurde mit Hilfe eines zu der Wellenlänge *des Spectrum Green* korrespondierenden L5-Filters ermöglicht. Zur Dokumentation der Ergebnisse diente das Computerprogramm *Cytovision* der Firma *Applied Imaging*, und die Fotodokumentation der Chromosomenpräparate erfolgte mit der Kamera *Cooled CCD Camera C-FK7549*.

Datenbanken	Anwendungen
NCBI <u>(National Center for Biotechnology</u> <u>Information</u> ) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Map Viewer: Auswahl der BAC- Klone für FISH
UCSC ( <u>U</u> niversity of <u>C</u> alifornia, <u>S</u> anta <u>C</u> ruz UCSC) http://genome.ucsc.edu/	Auswahl der BAC-Klone für FISH
Ensembl (The European Bioinformatics Institute and Genome Research) http://www.ensembl.org/index.html	Sammlung und Darstellung bekannter Varianten (SNPs) in genomischer DNA, Darstellung von Genom- Sequenzen

## 10 Computerprogramme und Datenbanken

Computerprogramme und "online"- Programme	Anwendungen
Cytovision (Applied Imaging)	Dokumentation und Bearbeitung von Fluoreszenzaufnahmen
Chromas Lite 2.01	Visualisieren und Editieren von DNA-Sequenzchromatogrammen
DIGI CAM Digital Camera Control	Dokumentation von Agarosegelen
MutationTaster http://www.mutationtaster.org/index.html	Überprüfen von Sequenzvarianten
NetGene2 (Center for Biological Sequence Analysis, DTU) http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/	Erkennung und Voraussage humaner Spleißstellen
Primer3Plus http://www.bioformatics.nl/cgi- bin/primer3plus/primer3plus.cgi	Ableiten von Oligonukleotiden aus DNA-Sequenzen
SeqPilot 3.1.0.4 (JSI medical systems GmbH)	Auswertung von Sequenzen
Splice Site Prediction by Neural Network (Berkeley Drosophila Genome Project) http://www.fuitfly.org/seq_tools/splice.html	Erkennung und Voraussage von Spleißstellen
SpliceView (Oriel) http://bioinfo.itb.cnr.it/oriel/splice-view.html	Erkennung und Voraussage von Spleißstellen

## IV Ergebnisse

#### **1** Beschreibung der Vorgehensweise

Im Rahmen einer Chromosomenanalyse mittels GTG (G-banding by trypsin using Giemsa)-Bänderung können die Bruchpunkte eines Rearrangements nur relativ grob eingegrenzt werden, so dass es weiterer Methoden für die Feinkartierung der Bruchpunkte bedarf. Dies kann durch serielle Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierungen (FISH) anhand von klonierten DNA-Fragmenten (z.B. in BAC- und Fosmid-Klonen) ermöglicht werden. Durch die physikalische Kartierung des humanen Genoms können DNA-Sonden entsprechend ausgesucht werden. Das Ziel ist die Identifizierung bruchpunktüberspannender Klone. Ein solcher bruchpunktüberspannender Klon zeigt in der fluoreszenzmikroskopischen Untersuchung der Metaphasechromosomen der Patientin / des Patienten sogenannte split signals, dies bedeutet, er hybridisiert in dem für ihn kartierten Bereich auf dem Wildtyp-Chromosom und auf beiden rearrangierten [derivativen (der)] Chromosomen; das Signal spaltet sich auf den beiden derivativen Chromosomen auf. Am Anfang erfolgt eine grobe Auswahl der für die FISH-Analyse eingesetzten DNA-Klone aus den zytogenetisch bestimmten Bruchpunktbereichen mithilfe von Datenbankrecherchen (NCBI, UCSC). Sobald in den nachfolgenden FISH-Analysen der Bruchpunkt durch distal und proximal liegende BAC-Klone eingegrenzt wird, können im weiteren Verlauf Klone aus diesem eingegrenzten Bereich ausgewählt werden. Diese sollten möglichst die gesamte Bruchpunktregion vollständig abdecken, wenn die Größe dies zulässt. Zur Feinkartierung der Bruchpunktregion wird auf Fosmid-Klone zurückgegriffen, da deren Inserts mit ca. 40 kb deutlich kleiner als die der BACs sind. Können mithilfe dieser Klone bruchpunktüberspannende Fosmide identifiziert werden, gelingt es den, Bruchpunkt relativ genau einzugrenzen.

Die verwendeten Fosmid-Klone, welche die Anfangsbezeichnung "G248P8" tragen, stammen aus der Bibliothek "WIBR-2" und wurden vom *BACPAC Resources Center* in Oakland (USA) bezogen.

## 2 Restriktionsenzymatische Spaltung der isolierten BAC- und Fosmid-DNAs zur Herstellung von Sonden für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung

Zur Herstellung der DNA-Sonden für die FISH-Experimente wurden zunächst geeignete BAC-Klone aus den zytogenetisch bestimmten Bruchpunktregionen durch Datenbankrecherchen (*NCBI*, *UCSC*) ausgewählt und bei *Invitrogen* und *imaGenes* bestellt. Die BAC-DNA konnte nach erfolgreicher Kultivierung der entsprechenden *E.coli*-Kolonien mithilfe eines Midi-Kits zur Plasmid-DNA-Präparation aus den Bakterien isoliert werden. Von der auf diese Weise gewonnenen DNA wurde eine definierte Menge für die restriktionsenzymatische Spaltung mit *Eco*RI eingesetzt. Die erhaltenen Restriktionsfragmente wurden im Agarosegel aufgetrennt, um die in der Midi-Präparation gewonnene DNA qualitativ und quantitativ beurteilen zu können. In der folgenden Abbildung ist exemplarisch die restriktionsenzymatische Spaltung von sieben BAC-DNAs und deren Auftrennung im Agarosegel gezeigt (Abb. 7).



# Abb. 7: Darstellung eines beispielhaften Agarosegels mit Restriktionsfragmenten einer *Eco*RI-Spaltung von verschiedenen BAC-DNAs

Auf ein 0,8% iges Agarosegel wurden die Restriktionsprodukte von BAC-DNA-Klonen nach *Eco*RI-Verdau aufgetragen. M – 1 kb-DNA-Leiter, Spur 1 – 689O13, Spur 2 – 1121P4, Spur 3 – 1164F10, Spur 4 – 898G24, Spur 5 – 3168N18, Spur 6 – 1031D10, Spur7 – 322B4

Anhand der Intensität der Banden konnte abgeschätzt werden, welche DNA-Menge in den nachfolgenden Sondenmarkierungen eingesetzt werden sollte. Da die Banden in Spur 5 etwas schwächer erscheinen als die restlichen, wurde hier mehr DNA markiert.

### 3 Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 4;7-Translokation bei Patient 1

#### 3.1 Vorarbeiten

Bei Patient 1 handelt es sich um einen sechsjährigen Jungen mit einer balanciert erscheinenden de novo Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 7, mit dem Karyotyp 46,XY,t(4;7)(q12;q36). Der Patient zeigt eine Entwicklungsverzögerung, Kleinwuchs, autistische Verhaltenszüge sowie eine polyzystische einen Nierendegeneration links. Die motorische Entwicklung verlief verzögert, der Patient lernte das Sitzen mit neun Monaten, das freie Laufen gelang erst im Alter von zwei Jahren, weiterhin bestehen Feinmotorikdefizite und ein ataktisches Bewegungsmuster. Eine MRT-Untersuchung des Schädels im Mai 2004 ergab den Verdacht auf eine Dandy-Walker-Variante und eine Balkenhypoplasie. Im Alter von 51/2 Jahren fiel auch eine erhöhte Anfallsbereitschaft im EEG auf. Eine Wiederholung der MRT-Aufnahmen des Schädels im Juni 2008 zeigte die bereits bekannte Dandy-Walker-Variante mit Hypoplasie des Kleinhirnwurms. Neben dem proportioniertem Kleinwuchs fallen äußerlich ein Strabismus und eine kurze Nase mit leicht antevertierten Nares auf.

Die initiale Chromosomenanalyse aus dem Jahr 2004 hatte eine balanciert erscheinende Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 7 [Karyotyp 46,XY,t(4;7)(q12;q36)] ergeben (Abb.8). Eine weitere, später durchgeführte Chromosomenanalyse hatte diesen Vorbefund der 4;7-Translokation bestätigt. Ergänzend wurde auch bei den Eltern eine Chromosomenanalyse durchgeführt, die jeweils die Translokation nicht zeigten und somit diese *de novo* bei dem Patienten vorliegt.

Weiterhin wurden nach Verdacht auf ein Angelman-Syndrom eine Methylierungs- und Deletions-Analyse mittels MLPA durchgeführt, welche ein unauffälliges Ergebnis ergaben. Ebenso konnten eine Deletion 15q11-q13, eine paternale uniparentale Disomie 15 und ein Imprintingdefekt als Ursache für ein Angelman-Syndrom nicht nachgewiesen werden. Zusätzlich wurde eine Mutationsanalyse im *UBE3A*-Gen eingeleitet, jedoch konnte auch hierdurch keine krankheitsverursachende Mutation im gesamten kodierenden Bereich des *UBE3A*-Gens als Ursache für ein Angelman-Syndrom aufgezeigt werden.

Weiterhin wurde auch eine molekulargenetische Diagnostik im *FMR1*-Gen bei Verdacht auf ein Fragiles-X-Syndrom bei dem Patienten in die Wege geleitet, diese ergab ebenfalls einen unauffälligen Befund.



Abb. 8: Schematische Darstellung der Wildtyp- und rearrangierten Chromosomen der 4;7-Translokation

Blau-weiß dargestellt ist das Wildtyp-Chromosom 4, rot-weiß das Wildtyp-Chromosom 7. Außerdem sind die derivativen Chromosomen 4 [der(4)] und 7 [der(7)] gezeigt. Die schwarze Wellenlinie markiert die Bruchpunktregion in 4q12 bzw. in 7q36.

Am Institut für Humangenetik in Kiel wurde zur weiteren Abklärung, insbesondere zum Nachweis einer möglicherweise unbalancierten Chromosomenveränderung, eine Array-CGH Untersuchung in die Wege geleitet, wobei die Untersuchung mit dem 105k-Chip der Firma *Agilent* keinen Hinweis auf eine klinisch relevante Deletion oder Duplikation ergab. Es wurde jedoch eine unklare kleine Deletion in der Region 10q11.23 nachgewiesen, die 0,124 Mb groß ist und die beiden Gene *A1CF* und *ASAH2B* umfasst. Diese Befunde führten zu der Annahme, dass der Phänotyp ursächlich mit der vorliegenden Translokation oder Mikrodeletion assoziiert sein könnte.

Zur Eingrenzung der Bruchpunkte auf den Chromosomen 4 und 7 und zum Nachweis der Mikrodeletion auf Chromosom 10 wurden schon vor Beginn dieser Doktorarbeit in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Kerstin Kutsche serielle FISH-Analysen durchgeführt. Dabei konnte die Bruchpunktregion auf dem Chromosom 4 noch nicht eingegrenzt werden, der am distalsten hybridisierende BAC-Klon in Bande 4q12 war RP11-959G16. Auf Chromosom 7 konnte der Bruchpunkt durch die BAC-Klone RP11-120J15 und RP11-452C13 auf einen Bereich von 2 Mb eingegrenzt werden. Die Mikrodeletion auf Chromosom 10 konnte anhand der BAC-Klone RP11-638A22 und RP11-532F4 und der beiden Fosmid-Klone G248P86547F6 und G248P80613G2 nicht bestätigt werden.

# **3.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 4**

Da in den zuvor durchgeführten FISH-Analysen der Bruchpunkt noch nicht eingegrenzt werden konnte, führte ich die FISH-Analyse mit dem BAC-Klon RP11-1077L17 durch, welcher zu den vorherigen weiter distal in 4q12 kartiert. Jedoch ergab auch dieser ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 4 und eines auf dem derivativen Chromosom 4, d.h. auch dieser BAC hybridisierte proximal zum Bruchpunkt.

Daraufhin erfolgte die Bestellung von drei neuen BAC-Klonen, die noch weiter distal in 4q12 kartieren, wobei der am weitesten distal gelegene BAC-Klon RP11-25L5 zuerst ausgesucht wurde und erneut ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 4 und eines auf dem derivativen Chromosom 4 ergab. Danach wurden zwei neue Klone ausgesucht, die weiter distal in 4q13.1 kartieren. Einer dieser beiden BACs, RP11-321L4, ergab ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 4 und eines auf dem derivativen Chromosom 7, wodurch nun der Bruchpunkt auf einen Bereich von ungefähr 1 Mb eingegrenzt wurde (Abb. 9).



# Abb. 9: FISH-Analyse mit den BAC-Klonen RP11-25L5 und RP11-321L4 als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen des Patienten 1

A: Die grün-fluoreszierende DNA-Sonde RP11-25L5 hybridisierte auf dem Wildtyp-Chromosom 4 (Chr 4) und auf dem derivativen Chromosom 4 [der(4)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

**B**: Die DNA-Sonde RP11-321L4 (grün-fluoreszierend) ergab ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 4 (Chr 4) und auf dem derivativen Chromosom 7 [der(7)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Es wurden zwei weitere, in dem Bruchbereich liegende Klone ausgesucht, wobei der weiter distal gelegene Klon RP11-506N2 den Bruchpunkt auf einen Bereich von etwa 600 kb eingrenzen konnte. Danach wurden vier Klone ausgesucht, RP11-474J22, RP11-451H19, RP11-892H24 und RP11-991A19, die den eingegrenzten Bereich abdecken. Der BAC-Klon RP11-451H19 ergab *split signals*, er hybridisierte auf dem Wildtyp-Chromosom 4 und jeweils auf beiden rearrangierten Chromosomen 4 und 7 (Abb. 10).



Abb. 10: FISH-Analyse mit dem BAC-Klon RP11-451H19 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Patienten 1

Die rot-fluoreszierende DNA-Sonde RP11-451H19 hybridisierte auf dem Wildtyp-Chromosom 4 (Chr 4), auf dem derivativen Chromosom 4 [der(4)] sowie auf dem derivativen Chromosom 7 [der(7)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Die Resultate der FISH-Analyse sind in Tab. 8 zusammengefasst.

BAC-Klone	Region	Signal
RP11-959G16	4q12	WT4 + (der)4
RP11-1077L17	4q12	WT4 + (der)4
RP11-25L5	4q12	WT4 + (der)4
RP11-506N2	4q13.1	WT4 + (der)4
RP11-474J22	4q13.1	WT4 + (der)4
RP11-451H19	4q13.1	WT4 + (der)4 + (der)7
RP11-892H24	4q13.1	WT4 + (der)7
RP11-991A19	4q13.1	WT4 + (der)7
RP11-321L4	4q13.1	WT4 + (der)7

Tab. 8:Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes auf Chromosom 4<br/>mit BAC-Klonen

Durch den BAC-Klon RP11-451H19 konnte der Bruchpunkt auf etwa 180 kb eingegrenzt werden, die FISH-Analysen der umliegenden Klone bestätigten dieses Ergebnis. Die Ergebnisse sind in der folgenden schematischen Abbildung zusammengefasst (Abb. 11). Datenbankrecherchen ergaben, dass sich in der eingegrenzten Bruchpunktregion sowie der näheren Umgebung keine Gene befinden. Die nächstliegenden Gene befinden sich etwa 2 Mb distal bzw. proximal zum Bruchpunkt.



Abb. 11: Schematische Darstellung ausgewählter BAC-Klone in der Bruchpunktregion 4q13.1 mit den in der Umgebung lokalisierten Genen

Durch die grauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 4q12 und 4q13.1 mit der darüber liegenden Größeneinteilung in Megabasen (Mb) dargestellt, außerdem ist die Orientierung von Centromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Der den Bruchpunkt überspannende BAC-Klon RP11-451H19 ist durch einen roten Balken dargestellt. Die proximal liegenden BAC-Klone RP11-506N2 und RP11-474J22 sind durch grüne und die distal gelegenen RP11-892H24 und RP11-991A19 durch gelbe Balken dargestellt. Die grau gestrichelten vertikalen Linien grenzen den etwa 180 kb großen Bruchpunktbereich ein. Gene, die in der Umgebung liegen, sind durch Pfeile abgebildet, wobei die Pfeilrichtung die 5' $\rightarrow$ 3'-Transkriptionsrichtung angibt. Die physikalische Karte wurde nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly erstellt.

#### **3.3** FISH-Analysen zur Eingrenzung der 7q36-Bruchpunktregion

Wie bereits unter 3.1 erwähnt, konnte schon im Vorfeld dieser Arbeit der 7q36-Bruchpunkt durch die BAC-Klone RP11-120J15 und RP11-452C13 auf einen Bereich von 2 Mb eingegrenzt werden. Zur weiteren Eingrenzung des Bruchpunktes wurden vier weitere BAC-Klone ausgesucht: RP11-908F8, RP11-672G10, RP11-42I12 und RP11-96I8. Dabei konnte der Bruchpunkt durch die BAC-Klone RP11-42I12 und RP11-98I8 auf einen Bereich von 400 kb weiter eingegrenzt werden. Es wurden wieder vier weitere BAC-Klone ausgesucht, RP11-593I20, RP11-1023A12, RP11-899F14 und RP11-232K17, die den Bruchpunktbereich von 400 kb lückenlos abdecken. Die BAC- Klone RP11-593I20 und RP11-1023A12 zeigten bruchpunktüberspannende Signale, sie hybridisierten somit auf dem Wildtyp-Chromosom 7 und jeweils auf beiden rearrangierten Chromosomen 4 und 7 (Abb. 12).

Die *split signals* auf den derivativen Chromosomen 4 und 7 ergaben für die beiden BAC-Klone RP11-593I20 und RP11-1023A12 unterschiedliche Intensitäten. Bei dem BAC-Klon RP11-593I20 konnte eine Fluoreszenzsignalintensität von ca. 60% auf dem derivativen Chromosom 7 und von ca. 40% auf dem derivativen Chromosom 4 beobachtet werden. Bei dem BAC-Klon RP11-1023A12 konnte eine Fluoreszenzsignalintensität von ca. 60% auf dem derivativen Chromosom 4 und von ca. 40% auf dem derivativen Chromosom 7 beobachtet werden.



Abb. 12: FISH-Analyse mit den BAC-Klonen RP11-1023A12 und RP11-593I20 als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen des Patienten 1

A: Die grün-fluoreszierende DNA-Sonde RP11-1023A12 hybridisierte auf dem Wildtyp-Chromosom 7 (Chr 7), auf dem derivativen Chromosom 7 [der(7)] sowie dem derivativen Chromosom 4 [der(4)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

**B**: Die DNA-Sonde RP11-593I20 (grün-fluoreszierend) ergab ebenso ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 7 (Chr 7), auf dem derivativen Chromosom 7 [der(7)] sowie dem derivativen Chromosom 4 [der(4)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Die beiden den Bruchpunkt überspannenden BACs weisen einen Bereich von etwa 64 kb auf, in dem sich die *Inserts* beider Klone überlappen und der Bruchpunkt lokalisiert sein müsste. In diesem Bereich und seiner näheren Umgebung wurden daraufhin sechs Fosmid-Klone zur Absicherung und genaueren Eingrenzung des Bruchpunktes ausgesucht. Dabei ergab der Fosmid-Klon G248P82040H4 *split signals*, so dass nun der Bruchpunkt in dem etwa 40 kb großen Insert des Fosmid-Klons lokalisiert werden konnte. Dieser Bruchpunkt konnte durch zwei weitere Fosmide bestätigt werden, da der

Fosmid-Klon G248P8537G12 auf dem Wildtyp-Chromosom 7 und dem rearrangierten Chromosom 7 und der Fosmid-Klon G248P84315E3 auf dem Wildtyp-Chromosom 7 und dem rearrangierten Chromosom 4 hybridisierte.

BAC- und	Region	Signal
Fosmid-Kione		
RP11-120J15	7q36.3	WT7 + (der)7
RP11-672G10	7q36.3	WT7 + (der)7
RP11-42I12	7q36.3	WT7 + (der)7
RP11-593I20	7q36.3	WT7 + (der)7 + (der)4
G248P80376E10	7q36.3	WT7 + (der)7
G248P85405A5	7q36.3	WT7 + (der)7
G248P8537G12	7q36.3	WT7 + (der)7
G248P82040H4	7q36.3	WT7 + (der)7 + (der)4
G248P84315E3	7q36.3	WT7 + (der)4
G248P87284G5	7q36.3	WT7 + (der)4
RP11-1023A12	7q36.3	WT7 + (der)7 + (der)4
RP11-899F14	7q36.3	WT7 + (der)4
RP11-232K17	7q36.3	WT7 + (der)4
RP11-96I8	7q36.3	WT7 + (der)4
RP11-452C13	7q36.3	WT7 + (der)4

Die Resultate der FISH-Analyse sind in Tab. 9 zusammengefasst.

Tab. 9:Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des 7q36.3-Bruchpunktes mit BAC-<br/>und Fosmid-Klonen

Die Ergebnisse sind in der folgenden schematischen Abbildung zusammengefasst (Abb. 13). Datenbankrecherchen ergaben, dass in der eingegrenzten Bruchpunktregion das Gen *NOM1* liegt, das durch den Bruchpunkt eventuell unterbrochen wird. In der Umgebung des Bruchpunktes befinden sich jedoch weitere sehr interessante Kandidatengene, bei denen ein Positionseffekt unbedingt in Betracht gezogen werden sollte.



Abb. 13: Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone in der Bruchpunktregion 7q36.3 mit den dort lokalisierten Genen

Durch einen grauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 7q36.3 mit der darüber liegenden Größeneinteilung in Megabasen (Mb) dargestellt, außerdem ist die Orientierung von Centromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Der BAC-Klon RP11-593120 ist durch einen blauen Balken und RP11-1023A12 ist durch einen hellblauen Balken dargestellt. Das den Bruchpunkt überspannende Fosmid G248P8204H4 ist durch einen roten Balken dargestellt. Die proximal liegenden Fosmide sind durch grüne und die distal gelegenen Fosmide durch gelbe Balken dargestellt. Die grau gestrichelten vertikalen Linien grenzen den etwa 40 kb großen Bruchpunktbereich ein. Gene, die in dieser Region liegen, sind durch Pfeile abgebildet, wobei die Pfeilrichtung die 5' $\rightarrow$ 3'-Transkriptionsrichtung angibt. Die physikalische Karte wurde nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly erstellt.

### 4 Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 7;17-Translokation bei Patient 2

#### 4.1 Vorarbeiten

Bei Patient 2 handelt es sich um einen dreijährigen Jungen, bei dem eine reziproke de Translokation zwischen den Chromosomen 7 und 17 [Karyotyp: novo 46,XY,t(7;17)(p12.1;p13.2)] vorliegt (Abb. 14). Bei diesem Patienten wurde eine klassische Lissenzephalie (Lissenzephalie Typ I) festgestellt, der üblicherweise Mutationen in LIS1 zugrunde liegen (siehe Einleitung, S. 13). Am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Freiburg wurden im Vorfeld dieser Doktorarbeit erste FISH-Untersuchungen durchgeführt. Auf Chromosom 7 wurde die Bruchpunktregion in 7p12.1, distal von EGFR, bestimmt und auf Chromosom 17 in 17p13.2, distal von P53.



#### Abb. 14: Schematische Darstellung der Wildtyp- und rearrangierten Chromosomen der 7;17-Translokation

Blau-weiß dargestellt ist das Wildtyp-Chromosom 7, rot-weiß das Wildtyp-Chromosom 17. Außerdem sind die derivativen Chromosomen 7 [der(7)] und 17 [der(17)] gezeigt. Die schwarze Wellenlinie markiert die Bruchpunktregion in 7p12.1 bzw. in 17p13.2 nach Chromosomenanalyse.

#### 4.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 7

Es wurden zuerst die beiden BAC-Sonden RP11-95E2, welche in 7p12.2 kartiert, und RP11-678B3, welche in 7p12.1-p11.2 kartiert, ausgesucht. Die BAC-Sonde RP11-95E2 ergab ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 7 und dem derivativen Chromosom 17 und die BAC-Sonde RP11-678B3 ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 7 und dem derivativen Chromosom 7. Durch diese beiden Klone konnte die Bruchpunktregion auf eine Größe von etwa 3 Mb eingegrenzt werden. Daraufhin wurde jedoch, aufgrund der Ergebnisse, die sich für das Chromosom 17 ergaben, die FISH-Analyse für das Chromosom 7 eingestellt.

#### 4.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 17

Wie unter 4.1 erwähnt, wurde die Bruchpunktregion in 17p13.2 distal von *P53* kartiert. Daraufhin wurden die beiden weiter distal gelegenen DNA-Sonden RP11-64J4, welche in 17p13.3 kartiert, und RP11-530N7, welche in 17p13.2 kartiert, ausgesucht. Beide BAC-Sonden ergaben ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 17 und dem derivativen Chromosom 17. Dadurch verschob sich die Lage des möglichen Bruchpunktes in die Nähe des *LIS1*-Gens. Daraufhin wurden zwei weiter distal gelegene BAC-Klone ausgesucht. Der BAC-Klon RP11-135N5 kartiert in 17p13.3, distal vom *LIS1*-Gen, und

der BAC-Klon CTD-3060P21 kartiert auch in 17p13.3, jedoch centromerwärts vom *LISI*-Gen. Die BAC-Sonde CTD-3060P21 ergab keine eindeutigen Ergebnisse, da sie unspezifisch hybridisierte. Die BAC-Sonde RP11-135N5 ergab jedoch ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 17 und dem derivativen Chromosom 7. Dadurch ergab sich eine Eingrenzung der Bruchpunktregion auf einen Bereich von ungefähr 600 kb, in dem das Krankheitsgen *LIS1* lokalisiert war, so dass FISH-Analysen mit zwei bekannten *LIS1*-Sonden durchgeführt wurden. Diese werden in der Diagnostik zur Identifizierung einer Deletion des *LIS1*-Gens benutzt, welches die häufigste Ursache für eine klassische Lissenzephalie darstellt (Cardoso et al. 2002). Mit der 350 kb großen Miller-Dieker LIS-Sonde KBI-40101 konnte ich bruchpunktüberspannende Signale feststellen, woraufhin eine weitere FISH-Analyse mit der Sonde Vysis LSI LIS1, welche mit einer Größe von 110 kb das gesamte, 80 kb große *LIS1*-Gen abdeckt, durchgeführt wurde. Diese zeigte ebenso wie die vorherige Sonde keine Deletion, sondern ergab auch bruchpunktüberspannende Signale (Abb.15).



Abb. 15: FISH-Analyse mit den *LIS1*-Sonden an Metaphasechromosomen des Patienten 2, mit einer zusätzlichen, grün-fluoreszierenden Telomersonde für Chromosom 17

A: Die rot-fluoreszierende Miller-Dieker LIS-Sonde KBI-40101 hybridisierte auf dem Wildtyp-Chromosom 17 (Chr 17) und auf dem derivativen Chromosom 17 [der(17)] sowie dem derivativen Chromosom 7 [der(7)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

**B**: Die Vysis LSI LIS1-Sonde (rot-fluoreszierend) ergab ebenso ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 17 (Chr 17) und auf dem derivativen Chromosom 17 [der(17)] sowie dem derivativen Chromosom 7 [der(7)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Aufgrund dieser Ergebnisse, die in Abb. 16 schematisch dargestellt sind, kann man die Aussage treffen, dass das *LIS1*-Gen durch den Translokationsbruchpunkt unterbrochen

ist und somit ursächlich für den Phänotyp des Patienten 2 ist, so dass wir auf weitere FISH-Analysen zur genauen Eingrenzung der Bruchpunkte auf den Chromosomen 7 und 17 verzichtet haben.



#### Abb. 16: Schematische Darstellung ausgewählter BAC-Klone in der Region 17q13.3 mit dem dort lokalisierten Gen *LIS1* und der KBI-40101 Miller-Dieker LIS-Sonde sowie der Vysis LSI LIS1-Sonde

Durch einen grauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 17p13.3 mit der darüber liegenden Größeneinteilung in Megabasen (Mb) dargestellt, außerdem ist die Orientierung von Centromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Der BAC-Klon RP11-135N5 ist durch einen dunkelblauen Balken und RP11-64J4 ist durch einen hellblauen Balken dargestellt. Die beiden *LISI*-Sonden sind durch einen grünen und gelben Balken dargestellt. Das *LISI*-Gen ist durch einen Pfeil abgebildet, wobei die Pfeilrichtung die 5' $\rightarrow$ 3'-Transkriptionsrichtung angibt. Die physikalische Karte wurde nach *UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly* erstellt.

### 5 Physikalische Kartierung der Bruchpunkte einer 1;9-Translokation bei Patient 3

#### 5.1 Vorarbeiten

Bei Patient 3 handelt es sich um einen männlichen Fetus aus der 22. Schwangerschaftswoche, bei dem es aufgrund eines Hydrozephalus internus zum Abort kam. Die pathologische Untersuchung des männlichen eutrophen Fetus ergab ein äußerlich altersentsprechend entwickeltes Gehirn, bei dem jedoch neben dem Hydrozephalus internus auch eine Agenesie des Corpus callosum vorlag. Aufgrund dieser Befundkonstellation wurde der Verdacht auf ein Walker-Warburg-Syndrom einem Krankheitsbild aus dem Formenkreis der "Cobblestone"geäußert. Lissenzephalien (Lissenzephalie Typ II). Die Chromosomenanalyse an Zellen aus dem Abortmaterial ergab beim Fetus eine balanciert erscheinende reziproke Translokation Karyotypformel 46,XY,t(1;9)(p34;q34) (Abb.17). Die nachfolgende mit der zytogenetische Analyse der Eltern im Hinblick auf das Vorliegen dieser Translokation ergab bei der Mutter einen unauffälligen Befund, bei dem Vater wurde selbige reziproke 1;9-Translokation festgestellt. Auch in unserem Institut wurde nach Eingang des Untersuchungsmaterials des Vaters eine erneute zytogenetische Untersuchung vorgenommen. Dabei ergab der Karyotyp 46,XY,t(1;9)(p34.3;q34.1). Bei dem Fetus wurde aufgrund eines vermuteten Walker-Warburg-Syndroms der Verdacht auf eine kongenitale Muskeldystrophie gestellt, und dieser Verdacht durch eine alpha-Dystroglykan-Färbung in Verbindung mit einem Immunblot an einer asservierten Muskelprobe des Feten am Universitätsklinikum München bestätigt.

Obwohl der Vater phänotypisch unauffällig ist, wurde aufgrund des in der Regel bei dem Walker-Warburg-Syndrom zu Grunde liegenden autosomal-rezessiven Erbganges die FISH-Analyse zur Eingrenzung der Bruchpunktregionen an den Chromosomenpräparaten des Vaters begonnen, da der Zugang zu den Zellkulturen des Feten eingeschränkt war.



Abb. 17: Schematische Darstellung der Wildtyp- und rearrangierten Chromosomen der 1;9-Translokation

Blau-weiß dargestellt ist das Wildtyp-Chromosom 1, rot-weiß das Wildtyp-Chromosom 9. Außerdem sind die derivativen Chromosomen 1 [der(1)] und 9 [der(9)] gezeigt. Die schwarze Wellenlinie markiert die Bruchpunktregion in 1p34.3 bzw. in 9q34.1 nach Chromosomenanalyse.

Vor Beginn dieser Doktorarbeit wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Kerstin Kutsche FISH-Analysen durchgeführt. Dabei konnten die Bruchpunktregionen auf den Chromosomen 1 und 9 noch nicht eingegrenzt werden. Da ein schon bekanntes Krankheitsgen für das Walker-Warburg-Syndrom, *POMT1*, in der Bande 9q34.1 kartiert, in der eine Bruchregion bei dem Patienten und seinem Vater in der Chromosomenanalyse angegeben worden war, wurden die BAC-Sonden RP11-643E14

und RP11-40A7, welche centromerwärts und distal von *POMT1* liegen, ausgesucht. Beide BAC-Sonden ergaben ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 9 und eines auf dem derivativen Chromosom 9, wodurch ausgeschlossen wurde, dass *POMT1* im Bruchpunkt von Chromosom 9 liegt. Die beiden BAC-Sonden RP11-656D10 und RP11-322N21 konnten ebenso den Bruchpunkt auf Chromosom 1 nicht eingrenzen, da sie ein Signal auf Chromosom 1 und dem derivativen Chromosom 1 ergaben.

#### 5.2 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 1

Da im Vorfeld dieser Arbeit nur proximal zum Bruchpunkt hybridisierende BAC-Klone identifiziert werden konnten, wurden zur Eingrenzung des Bruchpunktes neue DNA-Klone ausgewählt. Die Klone RP11-329N22 und RP11-435D7 kartieren in 1p34.3 und der Klon RP11-26F12 in 1p35.1-1p34.3. Der am weitesten distal gelegene BAC-Klon RP11-26F12 wurde als erstes für die FISH-Analyse ausgesucht und ergab auch ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 1 und eines auf dem derivativen Chromosom 1. Es wurden wieder drei weiter distal gelegene BAC-Klone ausgesucht, wobei der BAC-Klon RP11-490K7, der in 1p35.2 am weitesten distal kartiert, als erstes für die FISH-Analyse genutzt wurde und ebenso ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 1 und eines auf dem derivativen Chromosom 1 ergab. Die daraufhin ausgesuchten DNA-Klone RP11-376P8 und RP11-460I13 kartieren in 1p35.2 und 1p35.3, hybridisierten jedoch erneut proximal zum Bruchpunkt. Daraufhin wurden erneut drei weiter distal BAC-Klon kartierende Klone ausgesucht, wobei der RP11-91K11 ein bruchpunktüberspannendes Signal ergab (Abb. 18).



#### Abb. 18: FISH-Analyse mit dem BAC-Klon RP11-91K11 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Vaters des Patienten 3

Die rot-fluoreszierende DNA-Sonde RP11-91K11 hybridisierte auf dem Wildtyp-Chromosom 1 (Chr 1), auf dem derivativen Chromosom 9 [der(9)] sowie dem derivativen Chromosom 1 [der(1)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

BAC-Klone	Region	Signal	
RP11-91K11	1p36.13	WT1+(der)1+(der)9	
RP11-10N16	1p36.11	WT1+(der)1	
RP11-460I13	1p35.3	WT1+(der)1	
RP11-376P8	1p35.2	WT1+(der)1	
RP11490K7	1p35.2	WT1+(der)1	
RP11-26F12	1p35.1-p34.3	WT1+(der)1	
RP11-656D10	1p34.2	WT1+(der)1	
RP11-322N21	1p34.1	WT1+(der)1	

Die Resultate der FISH-Analyse sind in Tab. 10 zusammengefasst.

 

 Tab. 10:
 Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des Bruchpunktes auf Chromosom 1 mit BAC-Klonen

In der folgenden Abb. 19 ist das bisherige Ergebnis schematisch dargestellt. Im weiteren Verlauf der FISH-Analyse sollte der Bruchpunkt auf Chromosom 1 genauer eingegrenzt werden.



Abb. 19: Schematische Darstellung der Region 1p36.13 mit dem bruchpunktüberspannenden BAC-Klon RP11-91K11 und den dort lokalisierten Genen

Durch einen grauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 1p36.13 mit der darüber liegenden Größeneinteilung in Megabasen (Mb) dargestellt, außerdem ist die Orientierung von Centromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Der BAC-Klon RP11-91K11 ist durch einen blauen Balken dargestellt. Die grau gestrichelten vertikalen Linien grenzen den etwa 180 kb großen Bruchpunktbereich ein. Die in der Region liegenden Gene sind durch Pfeile abgebildet, wobei die Pfeilrichtung die 5' $\rightarrow$ 3'-Transkriptionsrichtung angibt. Die physikalische Karte wurde nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly erstellt.

#### 5.3 FISH-Analysen zur Eingrenzung der Bruchpunktregion auf Chromosom 9

Auch hier konnten in den vorher durchgeführten FISH-Analysen nur proximal zum Bruchpunkt hybridisierende BAC-Klone identifiziert werden, so dass drei weiter distal kartierende DNA-Sonden ausgesucht wurden. Die am weitesten distal gelegene BAC-Sonde RP11-555H7, welche in 9q34.3 kartiert, wurde als erstes für die FISH-Analyse ausgesucht und ergab ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 9 und eines auf dem derivativen Chromosom 9. Daraufhin wurden die BAC-Sonden RP11-83N9 und RP11-48C7 ausgesucht, welche in 9q34.3 kartieren. Die BAC-Sonde RP11-83N9 hybridisierte auch proximal vom Bruchpunkt und RP11-48C7 hybridisierte unspezifisch. Im weiteren Verlauf wurden die beiden BAC-Klone RP11-216L13 und RP11-417A4, welche in 9q34.3 kartieren, ausgesucht. Hierbei ergaben beide BAC-Klone ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 9 und eines auf dem derivativen Chromosom 1. Durch die beiden BAC-Sonden RP11-83N9 und RP11-216L13 ergab sich die Eingrenzung des Bruchpunktes auf eine Größe von etwa 480 kb. Daraufhin wurden die BAC-Sonden RP11-707O3 und CTD-2551F21 ausgesucht, welche in dem eingegrenzten Bereich kartieren. Der BAC-Klon RP11-707O3 ergab ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 9 und eines auf dem derivativen Chromosom 9. Die BAC-Sonde

CTD-2551F21 ergab *split signals*, sie hybridisierte somit auf dem Wildtyp-Chromosom 9 und jeweils auf beiden rearrangierten Chromosomen 1 und 9; dadurch konnte die Bruchpunktregion auf einen Bereich von etwa 200 kb eingegrenzt werden (Abb. 20).



Abb. 20: FISH-Analyse mit dem BAC-Klon CTD-2551F21 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen des Vaters des Patienten 3

Die rot-fluoreszierende DNA-Sonde CTD-2551F21 hybridisierte auf dem Wildtyp-Chromosom 9 (Chr 9), auf dem derivativen Chromosom 9 [der(9)] sowie dem derivativen Chromosom 1 [der(1)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Im Folgenden wurden vier Fosmid-Klone ausgesucht, die in dem etwa 200 kb großen, eingegrenzten Bereich kartieren, und weitere FISH-Analysen durchgeführt. Der Fosmid-Klon G248P81654G3 hybridisierte dabei auf dem Wildtyp-Chromosom 9 und dem rearrangierten Chromosomen 9 und der Fosmid-Klon G248P81152G5 auf dem Wildtyp-Chromosom 9 und dem rearrangiertem Chromosom 1 (Abb. 21).



# Abb. 21: FISH-Analyse mit den Fosmiden G248P81654G3 und G248P81152G5 als DNA-Sonden an Metaphasechromosomen des Vaters des Patienten 3

A: Der rot-fluoreszierende Fosmid-Klon G248P81654G3 hybridisierte auf dem Wildtyp-Chromosom 9 (Chr 9) und auf dem derivativen Chromosom 9 [der(9)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

**B**: Der Fosmid-Klon G248P81152G5 (rot-fluoreszierend) ergab ein Signal auf dem Wildtyp-Chromosom 9 (Chr 9) und auf dem derivativen Chromosom 1 [der(1)]. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

BAC- und	Region	Signale	
Fosmid-Klone			
RP11-643E14	9q34.13	WT9+(der)9	
RP11-40A7	9q34.13	WT9+(der)9	
RP11-555H7	9q34.3	WT9+(der)9	
RP11-83N9	9q34.3	WT9+(der)9	
RP11-707O3	9q34.3	WT9+(der)9	
G248P81654G3	9q34.3	WT9+(der)9	
CTD-2551F21	9q34.3	WT9 + (der)9 + (der)1	
G248P81152G5	9q34.3	WT9+(der)1	
RP11-216L13	9q34.3	WT9+(der)1	
RP11-48C7	9q34.3	unspezifisch	
RP11-417A4	9q34.3	WT9+(der)1	

Die Resultate der FISH-Analyse sind in Tab. 11 zusammengefasst.

# Tab. 11:Ergebnisse der FISH-Analysen zur Eingrenzung des 9q34.13-q34.3-Bruchpunktes mit<br/>BAC- und Fosmid-Klonen

Der Bruchpunkt wurde somit auf einen Bereich von etwa 50 kb eingegrenzt, in dem die Gene *EGFL7* und *AGPAT2* liegen (Abb. 22).



Abb. 22: Schematische Darstellung ausgewählter BAC- und Fosmid-Klone in der Bruchpunktregion 9q34.3 mit den dort lokalisierten Genen

Durch einen grauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 9q34.3 mit der darüber liegenden Größeneinteilung in Megabasen (Mb) dargestellt, außerdem ist die Orientierung von Centromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben. Der BAC-Klon CTD-2551F21, welcher ein *split signal* ergab, ist durch einen blauen Balken dargestellt. Die den Bruchpunkt genauer eingrenzenden Fosmide G248P81654G3 und G248P81152G5 sind durch rote Balken dargestellt. Die grau gestrichelten vertikalen Linien geben die Grenzen des etwa 50 kb großen Bereichs, in dem der Bruchpunkt lokalisiert ist. Gene, die in dieser Region liegen, sind durch Pfeile abgebildet, wobei die Pfeilrichtung die 5' $\rightarrow$ 3'-Transkriptionsrichtung angibt. Die physikalische Karte wurde nach UCSC Genome Browser on Human Feb. 2009 (GRCh37/hg19) Assembly erstellt.

### 6 Sequenzanalyse von *JAKMIP1* bei Patienten mit neuronalen Migrationsstörungen und Kleinhirnhypoplasie

#### 6.1 Vorbemerkungen

Aufgrund der Tatsache, dass zwar schon viele, mit Migrationsstörungen assoziierte Krankheitsgene bekannt sind, diese aber die genetische Ursache von vielen neuronalen Migrationsstörungen nicht erklären, werden noch weitere Krankheitsgene vermutet. Die Aufmerksamkeit auf das Kandidatengen *JAKMIP1* wurde durch die Arbeiten der chilenischen Arbeitsgruppe um Professor Dr. Vidal gelenkt. Die Erkenntnisse, dass Marlin-1 ein Mikrotubuli bindendes Protein ist, welches auch mit den GABAB1-Untereinheiten in Neuronen interagiert und vor allem in bestimmten Arealen des ZNS, wie dem Kleinhirn, dem Bulbus olfactorius, dem Hippokampus, der Großhirnrinde, der Pons und der Medulla oblongata exprimiert wird (Vidal et al. 2009), sowie Versuche zur Migration waren ausschlaggebend, die Sequenzanalyse von *JAKMIP1* an DNA-Proben von 75 Patienten mit neuronalen Migrationsstörungen zu beginnen.

# 6.2 PCR-Amplifikation ausgewählter Exons des *JAKMIP1*-Gens und anschließende direkte DNA-Sequenzierung

Das JAKMIP1-Gen besteht aus 24 Exons und erstreckt sich auf der genomischen DNA-Ebene über einen Bereich von etwa 175 kb. Bis heute sind 2 Isoformen bekannt, wobei wir uns für die Generierung der PCR-Amplifikate für die Exons 14 bis 21 der Isoform 1 (NM\_001099433; Marlin-1/JAKMIP1-003) sowie der Exons 2 bis 13 der Isoform 2 (NM\_144720; Marlin-1/JAKMIP1-001) entschieden haben. Dadurch konnten alle kodierenden Exons abgedeckt werden. Die beiden Transkripte werden hauptsächlich im Gehirn exprimiert. Die Exons 4 und 5 wurden zusammen amplifiziert. Die exonflankierenden Primer wurden mit Hilfe des Programms Primer3Plus (Untergasser et al. 2007) ausgesucht und die Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen an genomischen Kontroll-DNAs durchgeführt. Anschließend wurden die Exons aus genomischer DNA der Patienten amplifiziert. Da jedoch bei einigen Patienten nicht mehr genügend genomische DNA vorhanden war, wurde diese mit Hilfe des GenomiPhi DNA Amplification Kit amplifiziert und im Verhältnis 1:4 verdünnt. Die generierten PCR-Produkte wurden durch Agarosegelelektrophorese auf Qualität und Quantität hin überprüft (Abb. 23), enzymatisch aufgereinigt und sequenziert.



Exon 2 3 4+5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 100Bp

# Abb. 23: Darstellung eines Agarosegels mit den unterschiedlich großen PCR-Produkten der Exons 2 bis 21 des *JAKMIP1*-Gens

Das Bild zeigt ein 2%-iges Agarosegel, auf das jeweils 10  $\mu$ l der PCR-Produkte der Exons 2 bis 21 des *JAKMIP1*-Gens von links nach rechts aufgetragen wurden. Rechts wurde ein Größenstandard (100 bp-Leiter) aufgetragen, der Pfeil markiert die Größe von 300 bp.

Nach der Sequenzanalyse wurden acht hetero- bzw. homozygot vorliegende Sequenzvarianten identifiziert, von denen sieben in Introns und eine in der 5'-untranslatierten Region des Exons 2 liegen (Tab. 12).

Nukleotidaustausch	Exon/ Intron	Häufigkeit des seltenen Allels	SNP
c100C>T	5'UTR in Exon 2	6/150 (0)	rs116269521
c.129+27_29delGGCinsTTA	Intron 2	68/150 (14)	rs34201695
c.625-15C>T	Intron 3	16/150 (8)	rs73196084
c.834+90G>A	Intron 4	48/150 (21)	rs7666743
c.834+98_99 insTCAC	Intron 4	41/150 (6)	rs59774538
c.835-3T>C	Intron 4	1/150 (0)	-
c.1302+10C>T	Intron 8	1/150 (0)	rs202225279
c.2002+122T>C	Intron 15	1/150 (0)	rs75196639

 Tab. 12:
 Häufigkeit der identifizierten Sequenzvarianten im JAKMIP1-Gen bei 75 Patienten mit neuronalen Migrationsstörungen

In Klammern angegeben: Anzahl der homozygot vorliegenden Sequenzvarianten; SNP: <u>single nucleotide</u> <u>polymorphism</u>; *rs*: <u>R</u>eferenznummer für den <u>S</u>NP nach dbSNP (Datenbank); c: *coding region*; UTR: untranslatierte Region

Drei Elektropherogramme der Sequenzvariante c.129+27\_29delGGCinsTTA (*rs34201695*) im Intron 2 sind in Abb. 24 exemplarisch dargestellt.



# Abb. 24: Exemplarische Darstellung von drei partiellen Sequenzchromatogrammen mit der Wildtypsequenz und Sequenzvariante im Intron 2 des *JAKMIP1*-Gens

(A) Darstellung der Wildtyp-Sequenz und Darstellung der heterozygoten (B) bzw. homozygoten (C) Sequenzvariante c.129+27\_29delGGCinsTTA, welche in den Datenbanken als SNP verzeichnet ist. Jede der vier Basen wird durch eine andere Farbe dargestellt (A grün, T rot, C blau und G schwarz), und jeder Peak repräsentiert eine Base der Sequenz. Die Position der Sequenzvariante ist durch einen schwarzen Rahmen markiert.

Alle acht Mutationen konnten mit großer Wahrscheinlichkeit als nicht-pathogene Sequenzvarianten identifiziert werden, da sie einerseits bereits in der *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Datenbank bekannt sind und andererseits durch das Vorhersageprogramm *MutationTaster* als Polymorphismen eingestuft wurden. Einzig die heterozygote Sequenzvariante im Intron 4, c.835-3T>C, ist bisher in keiner Datenbank (*NCBI, ENSEMBL*) als SNP verzeichnet. Da die *in silico*-Überprüfung dieser Sequenzvariante durch die Programme *MutationTaster, NetGene2, Splice Site Prediction by Neural Network* und *SpliceView* keinen Hinweis auf eine Spleißmutation bzw. eine pathogene Mutation ergaben, ist davon auszugehen, dass sie wahrscheinlich nicht zum Krankheitsphänotyp beiträgt.

## V Diskussion

### 1 Eingrenzung der Bruchpunkte einer 4;7-Translokation bei Patient 1 auf 170 kb bzw. 40 kb

#### 1.1 Durch den Bruch in 4q13.1 wird bei Patient 1 kein Gen unterbrochen

Hilfe serieller FISH-Analysen konnte die 4q13.1-Bruchpunktregion der Mit 4;7-Translokation von Patient 1 durch die bruchpunktüberspannende DNA-Sonde RP11-451H19 auf eine Größe 170 kb von ca. eingegrenzt werden. Datenbankrecherchen ergaben, dass direkt in der Bruchpunktregion kein Gen lokalisiert ist und der Bruchpunkt sich insgesamt in einer genleeren Region befindet (sog. gene dessert). Die nächstgelegenen Gene befinden sich in einem Abstand von etwa 2 Mb proximal (centromerwärts) und distal (telomerwärts) vom Bruchpunkt. Da nach Kleinjan und van Heyningen (1998) auch ein Positionseffekt zu einer Fehlregulation der Genexpression führen kann, sollten auch Gene in der unmittelbaren und weiteren Umgebung der Bruchpunktregion in Betracht gezogen werden, jedoch scheint ein Positionseffekt aufgrund der relativ weiten Entfernungen, die in diesem Ausmaß (>2 Mb) in der Literatur noch nicht beschrieben wurde, in diesem Fall als unwahrscheinlich.

#### 1.2 SHH als mögliches Kandidatengen für den Phänotyp von Patient 1

In der eingegrenzten Bruchpunktregion in 7q36.3 (Abb. 13) liegt das Gen *NOM1* (*nucleolar protein with MIF4G domain 1*). Dieses Gen könnte bei Patient 1 unterbrochen sein. Das Gen wird ubiquitär exprimiert und dem von *NOM1* kodierten Protein wird eine Rolle bei der Translation und dem sog. *nonsense-mediated mRNA decay*, einer zellulären Funktion, bei der fehlerhafte mRNAs erkannt und abgebaut werden, zugeschrieben (Simmons et al. 2005). Des Weiteren wurde eine Interaktion von NOM1 mit der Protein-Phosphatase1 (PP1) aufgezeigt. NOM1 soll dabei eine Rolle beim Transport von PP1 in den Nucleolus spielen (Cohen 2002, Gunawardena et al. 2008). PP1 gehört zu den eukaryotischen Serin/Threonin-Proteinphosphatasen und ist an vielen zellulären Prozessen wie z.B. der Zellteilung, der Signaltransduktion und der Transkription beteiligt (Cohen 2002). Bisher sind keine Erkrankungen bekannt, die mit Mutationen des *NOM1*-Gens in Assoziation gebracht werden. Dieses Gen könnte mit dem Phänotyp des Patienten in Zusammenhang stehen. Aufgrund seiner nicht selektiven

Diskussion

Expression im Gehirn und dem Vorhandensein weiterer, im Kleinhirn exprimierter Gene in der Umgebung der Bruchpunktregion, haben wir diesem Gen in unserer Prioritätenliste einen hinteren Rang eingeräumt.

Distal von NOM1, etwa 20 kb vom Bruchpunkt entfernt, liegt das MNX1-Gen (motor neuron and pancreas homeobox 1), welches auch unter seiner früheren Bezeichnung HLXB9 bekannt ist. Heterozygote Mutationen in diesem Gen sind mit dem Currarino-Syndrom assoziiert (Lynch et al. 2000). Dieses Syndrom, auch als Currarino-Triade bezeichnet, wird autosomal-dominant vererbt und ist gekennzeichnet durch eine partielle Agenesie des Steißbeins mit einer präsakralen Gewebsmasse und ano-rektalen Fehlbildungen (Currarino et al. 1981). Phänotypisch betrachtet scheint ein Positionseffekt auf das MNX1-Gen bei unserem Patienten nicht ursächlich zu sein, jedoch sind Patientenfälle in der jüngsten Literatur beschrieben, die uns dazu bewegen sollten, dieses Gen nicht gänzlich aus den Augen zu verlieren und eventuell bei weiteren Hinweisen erneut in Betracht zu ziehen. Dabei wird eine interessante Patientin mit Merkmalen des Currarino-Syndroms und unter anderem kombiniert mit einer deutlichen kongenitalen Mikrozephalie, einer Hypoplasie des Vermis. Gesichtsdysmorphien und einer Schwerhörigkeit beschrieben (Pavone et al. 2010). Die Patientin zeigte ein komplexes Rearrangemant mit einer 10,3 Mb großen Duplikation von 7q34-q35 und einer 8,8 Mb großen Deletion in 7q36, mit einer Deletion u.a. von MNX1. In diesem Fall sind noch weitere interessante Gene durch das komplexe Rearrangement betroffen, die auch wir in unserem Fall noch diskutieren möchten. So ist das SHH-Gen (sonic hedgehog), welches etwa 1,15 Mb von der Bruchregion des Patienten 1 entfernt liegt, ebenfalls von der Deletion erfasst. Mutationen des SHH-Gens führen zu einer Holoprosencephalie, dessen Spektrum auch Mikroformen mit Hypotelorismus und Mikrozephalie erfasst. Allerdings scheinen die SHH-assoziierten Mikrozephalien milder zu sein als im berichteten Fall. Deshalb wird die Beteiligung weiterer Gene aus dem deletierten Areal an dem Phänotyp des Patienten angenommen. Hier wird das EN2-Gen erwähnt, da die heterozygote En2 +/- Knock-out Maus eine schwere Kleinhirnhypoplasie zeigt (Pavone et al. 2010).

Auch die Arbeitsgruppe um Wei Chen beschäftigte sich mit einem Patientenfall mit einer balancierten *de novo* Translokation t(7;9)(q36;q12) und einer Intelligenzminderung. Hierbei wurde der Bruchpunkt zwischen den Genen *NOM1* und

62

*MNX1* lokalisiert (Chen et al. 2008). Etwa 100 kb proximal zur Bruchpunktregion des Patienten 1 kartiert das *LMBR1*-Gen [*limb region 1 homolog (mouse)*]. Dieses Gen war über klassische Kartierung bei Patienten mit Extremitätenfehlbildungen, im speziellen mit Handfehlbildungen, kartiert und entdeckt worden. Dies führte zu der Namensgebung als *LMBR1*-Gen, über dessen Funktion als ein membranständiges Protein noch wenig bekannt ist. Weitere Studien führten zu der Erkenntnis, dass sich im Intron 5 des *LMBR1*-Gens eine *cis*-regulatorische Sequenz befindet, welche die Expression des *SHH*-Gens beeinflusst und damit die Entwicklung der Extremitäten reguliert (Lettice et al. 2003). Punktmutationen in diesem ~1 Mb vom *SHH*-Gen entfernten Kontrollelement verursachen eine autosomal-dominant erbliche präaxiale Polydaktylie, eine Skelettfehlbildung der Hände (Lettice et al. 2002).

Das SHH-Gen befindet sich etwa 1,15 Mb von der Bruchregion des Patienten 1 entfernt. Da in dieser Reichweite Positionseffekte in der Vergangenheit schon beschrieben wurden, muss diese Möglichkeit diskutiert werden. Mutationen in SHH. Translokationen bis zu 275 kb vom Gen entfernt oder Punktmutationen in einem ~460 kb entfernten Enhancerelement sind mit einer Holoprosencephalie assoziiert, bei der es sich um eine Entwicklungsstörung des Vorderhirns und Gesichts handelt (Roessler et al. 1996, Roessler et al. 1997, Jeong et al. 2008). Phänotypisch passt dies zunächst nicht zu unserem Patienten. Jüngere Forschungsergebnisse können jedoch eine Beteiligung implizieren. Shh scheint bei der Entwicklung des Zerebellums von Bedeutung zu sein. Shh ist unter anderem am Umfang der Ausbildung der zerebellären Läppchen beteiligt (Corrales et al. 2006). Des Weiteren wird durch Shh die Proliferation der zerebellären Vorläuferzellen der neuronalen Körnerzellen induziert (Vaillant und Monard 2009).

Eine weitere wichtige Erkenntnis stellt die wahrscheinliche Beteiligung der durch die Gene Zic1 (Zic family member 1) und Zic4 (Zic family member 4) kodierten Proteine am Shh-Signalweg dar. In der Vergangenheit konnte bei einigen Patienten mit einer Dandy-Walker-Malformation (DWM) eine heterozygote Deletion, die die Gene ZIC1 und ZIC4 betraf, bestätigt werden (Tohyama et al. 2011). Versuche an Mäusen zeigten bei einer Deletion der beiden Gene eine veränderte Größe des Zerebellums sowie eine veränderte Größe des Zerebellums bei diesen Mäusen resultierte aus einer verminderten Proliferation der

Vorläuferzellen der neuronalen Körnerzellen. Ebenso konnte der für uns wichtige Zusammenhang zu Shh aufgezeigt werden, da Zic1 und Zic4 eine von Shh abhängige Funktion bei dieser Proliferation haben (Blank et al. 2011).

Diese Befunde unterstützen die Möglichkeit, dass die durch einen Positionseffekt veränderte Expression von *SHH* die zerebellären Merkmale unseres Patienten erklären kann und somit *SHH* für uns das vorrangige Kandidatengen in diesem Fall darstellt.

In weiterer Entfernung kartieren proximal vom Bruchpunkt zwei weitere, für den Phänotyp des Patienten 1 interessante Kandidatengene, jedoch wurde in der Vergangenheit ein Positionseffekt mit solch einer Reichweite noch nicht beschrieben. Etwa 1,4 Mb entfernt liegt das *CNPY1*-Gen [*canopy 1 homolog (zebrafish)*], für dessen Ortholog *cnpy1* im Zebrafisch eine spezifische Expression in der Übergangsregion von Mesencephalon zu Rhombencephalon und eine Funktion während der korrekten Entwicklung des Tectums und Zerebellums aufgezeigt wurde (Hirate und Okamoto 2006).

Das *EN2*-Gen (*engrailed homeobox 2*) kartiert etwa 1,5 Mb vom Bruchpunkt entfernt und kodiert für einen Transkriptionsfaktor. Es konnte schon früh eine Beteiligung von *En2* an der zerebellären Läppchenbildung aufgezeigt werden (Joyner et al. 1991). Jüngste Daten weisen darauf hin, dass En2 und das Homolog En1 die unterschiedlichen Muster der Folierung des Kleinhirnwurms und der Kleinhirnhemispähren festlegen (Cheng et al. 2010). Zusammenfassend lässt sich feststellen, dass die in weiter Entfernung und proximal zum Bruchpunkt liegenden Gene *SHH, CNPY1* und *EN2* als attraktive Kandidatengene für die Kleinhirnanomalien von Patient 1 angesehen werden können und durch weitere Untersuchungen ein möglicher Zusammenhang bestätigt werden müsste.

### 2 Eingrenzung der Bruchpunkte einer 7;17-Translokation bei Patient 2

#### 2.1 Die Eingrenzung des Bruchpunktes auf Chromosom 7 wurde abgebrochen, aufgrund der Erkenntnisse zum Chromosom 17-Bruchpunkt

Im Zuge der FISH-Analyse konnte der Bruchpunkt auf Chromosom 7 auf einen Bereich von ungefähr 3 Mb eingegrenzt werden. Wir haben jedoch im Weiteren auf eine genauere Eingrenzung des Bruchpunktes verzichtet, da sich im Zuge der FISH- Analysen für Chromosom 17 gezeigt hat, dass mit großer Wahrscheinlichkeit eine Unterbrechung des *LIS1*-Gens für die vorliegende klassische Lissenzephalie des Patienten 2 ursächlich ist.

#### 2.2 Der Bruchpunkt in 17p13.3 bei Patient 2 disruptiert das Krankheitsgen *LIS1*

Im Zuge der FISH-Analysen für Chromosom 17 habe ich mich mit der Eingrenzung des Bruchpunktes immer weiter an das *LIS1*-Gen herangetastet, so dass schließlich der Bruchpunkt im *LIS1*-Gen lokalisiert werden konnte.

Das *LISI*-Gen (*PAFAH1B1*-Gen in 17p13.3) wurde als erstes mit der klassischen Lissenzephalie assoziiert (Dobyns et al. 1993). Es kodiert für das PAFAHB1-Protein aus 410 Aminosäuren. Dieses kontrolliert die Ausrichtung des aus Mikrotubuli bestehenden Spindelapparates während der Mitose in den neuronalen Stammzellen und Gliazellen (Gressens 2006, Kerjan und Gleeson 2007). Das Fehlen des Pafah1b1-Proteins verursacht auch Fehlfunktionen des Proteins Dynein, welches ebenso eine Rolle bei der Migration spielt (Wynshaw-Boris und Gambello 2001).

Bei Patient 2 wurde das Vorliegen einer klassischen Lissenzephalie beschrieben. Bei bis zu 65% der Fälle ist die isolierte klassische Lissenzephalie (ILS) mit Mutationen im *LIS1*-Gen assoziiert und stellt die häufigste Ursache für eine ILS dar (Cardoso et al. 2002). Dabei werden zumeist bei 40% der Patienten Deletionen des gesamten *LIS1*-Gens festgestellt und bei 25% der Patienten kleinere, intragenische Deletionen im *LIS1*-Gen sowie andere Mutationstypen (Cardoso et al. 2002). Im Gegensatz dazu scheint in diesem Fall keine Deletion des *LIS1*-Gens für den Phänotyp ursächlich zu sein, sondern eine Unterbrechung des Gens, welche durch die Translokation verursacht wurde. Solch ein Fall wurde in der Vergangenheit in der Literatur schon beschrieben (Kurahashi et al. 1998).

# 3 Eingrenzung der Bruchpunkte einer 1;9-Translokation bei dem Vater des Patienten 3 auf 180 kb bzw. 50 kb

# 3.1 Der Phänotyp des Patienten 3 ist wahrscheinlich unabhängig vom 1p36.13-Translokationsbruchpunkt

Bei Patient 3 handelt es sich um einen männlichen Fetus aus der 22. Schwangerschaftswoche, bei dem es aufgrund eines Hydrozephalus internus zum Abort
kam. Es lag eine Agenesie des Corpus callosum vor; der Verdacht auf ein Walker-Warburg-Syndrom wurde geäußert. Die Eingrenzung der Bruchpunktregionen erfolgte an Chromosomenpräparaten des Vaters.

Der Bruchpunkt auf Chromosom 1 konnte im Zuge der FISH-Analysen auf einen Bereich von etwa 180 kb in 1p36.13 eingegrenzt werden. In diesem Bereich sind die Gene *TMCO4* (*Transmembrane and coiled-coil domains 4*), *RNF186* (*Ring finger protein 186*) und *OTUD3* (*OTU domain-containing protein 3*) lokalisiert. Keines dieser Gene wurde bis jetzt mit dem Walker-Warburg-Syndrom oder das jeweilige Expressionsmuster mit den Kleinhirnfunktionen in Verbindung gebracht, so dass sich keine weitere Betrachtung dieser Gene ergibt.

## 3.2 Der Bruchpunkt 9q34.3 befindet sich in einer etwa 50 kb großen Region, in der die Gene *EGFL7* und *AGPAT2* lokalisiert sind

Durch serielle FISH-Analysen konnte der Bruchpunkt auf Chromosom 9 bei dem Vater des Patienten 3 auf einen Bereich von 50 kb eingegrenzt werden, in dem die Gene *EGFL7* und *AGPAT2* lokalisiert sind. Ggf. ist eins der beiden Gene unterbrochen. Homozygote und *compound* heterozygote Mutationen des *AGPAT2*-Gens (*1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 2*) sind mit dem Berardinelli-Seip-Syndrom (BSCL) assoziiert (Agarwal et al. 2002). Diese autosomal-rezessiv vererbte Krankheit wird auch als congenitale generalisierte Lipodystrophie (CGL) bezeichnet und äußert sich in einer Lipoatrophie, Hypertriglyzeridämie, Hepatomegalie, akromegaloiden Zeichen sowie einer Insulinresistenz; die Patienten fallen vor allem durch das nahezu gänzlich fehlende Fettgewebe auf (Seip und Trygstad 1996, Garg 2000). Das vom *AGPAT2*-Gen kodierte Protein besteht aus 278 Aminosäuren, es gehört zu der Familie der Acyltransferasen und hat eine Funktion als Schlüsselenzym bei der Biosynthese von Triglyceriden und Glycerophospholipiden (Leung 2001). Aufgrund des klinischen Bildes des Berardinelli-Seip-Syndroms stellt das *AGPAT2*-Gen kein wahrscheinliches Kandidatengen für den Phänotyp des Patienten 3 dar.

Das *EGFL7*-Gen (*epidermal growth factor-like domain 7*) könnte jedoch ein interessantes Kandidatengen in diesem Fall darstellen. Es wird in den Endothelzellen exprimiert und das durch *Egfl7* kodierte Protein war bislang vor allem als Modulator bei der Gefäßentstehung und der damit verbundenen Migration der Endothelzellen bekannt (Fitch et al. 2004, Schmidt et al. 2007). Es konnte jedoch gezeigt werden, dass EGFL7

eine Rolle im Notch-Signalweg spielt, bei dem es als Antagonist agiert. Es wurde aufgezeigt, dass EGFL7 die Proliferation und Differenzierung der neuronalen Stammzellen zu Neuronen und deren Selbsterneuerung beeinflusst (Bicker und Schmidt 2008, Schmidt et al. 2009). Somit scheint EGFL7 bei der Neurogenese eine bedeutende Rolle zu spielen, jedoch konnte in weiteren Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe keine Mutation im *EGFL7*-Gen bei einer entsprechenden Patientenkohorte mit Gehirnfehlbildungen festgestellt werden.

# 4 Keine pathogene Mutation in *JAKMIP1* bei 75 Patienten mit neuronalen Migrationsstörungen und Kleinhirnhypoplasie

Im Zuge der Mutationsanalyse des *JAKMIP1*-Gens konnten nach der Sequenzanalyse acht hetero- bzw. homozygot vorliegende Sequenzvarianten identifiziert werden. Von diesen konnten sieben Mutationen mit großer Wahrscheinlichkeit als nicht krankheitsursächlich für die neuronalen Migrationsstörungen der untersuchten Patienten eingestuft werden, da sie bereits in der *single nucleotide polymorphism* (SNP)-Datenbank als häufig vorkommende Varianten (Heterozygotenfrequenz > 10%) erfasst sind. Nur die Sequenzvariante c.835-3T>C im Intron 4 ist bisher in keiner Datenbank (*NCBI, ENSEMBL*) als SNP verzeichnet. Die Überprüfung der Sequenzvariante anhand der webbasierten Programme *MutationTaster, NetGene2, Splice Site Prediction by Neural Network* und *SpliceView* ergab keine Veränderungen im Hinblick auf neu entstandene oder verloren gegangene Spleißstellen und somit keinen Hinweis auf eine potentielle pathogene Eigenschaft der Sequenzveränderung. Es kann davon ausgegangen werden, dass die im Zuge dieser Doktorarbeit gefundene Sequenzvariante wahrscheinlich nicht zum Krankheitsphänotyp der neuronalen Migrationsstörungen bzw. anderer Gehirnfehlbildungen beigetragen hat.

Da das *JAKMIP1*-Gen jedoch nach den Befunden von Professor Dr. Vidal ein vielversprechendes Kandidatengen für die neuronalen Migrationsstörungen zu sein schien (Vidal et al. 2012), ergibt sich die Fragestellung nach möglichen Fehlerquellen im Zuge dieser Untersuchungen. Zum einen könnte eine ungünstige Auswahl des Patientenkollektives vorliegen. Bei der Zusammenstellung des Patientenkollektives haben wir uns, aufgrund der unter anderem im Zerebellum festgestellten Expression des *Jakmip1*-Gens (Vidal et al. 2009), vor allem auf Patienten mit einer Affektion des Kleinhirns konzentriert. Bei drei Patienten lag eine Kleinhirnagenesie vor, sieben

Patienten zeigten eine Dandy-Walker-Malformation, 27 eine pontocerebelläre Hypoplasie und die restlichen 38 Patienten eine Lissenzephalie Typ I mit Kleinhirnhypoplasie (LCH). Diese Auswahl könnte sich im Nachhinein als zu speziell und eng erwiesen haben. Auch sollte man in Betracht ziehen, dass Mutationen des JAKMIP1-Gens möglicherweise nur in sehr seltenen Fällen krankheitsursächlich für neuronale Migrationsstörungen sind und somit in unserem Kollektiv keine Patienten mit JAKMIP1-assoziierten Fehlbildungen waren und ein viel größeres Patientenkollektiv von Nöten wäre, um dies festzustellen. Technische Probleme bei der PCR-basierten Sequenzanalyse könnten auch weitere Fehler bedingt haben. Im Rahmen der Mutationsanalyse wurde zunächst die Amplifikation der kodierenden Exons des JAKMIP1-Gens durchgeführt. Die dafür benötigten exonflankierenden Primer wurden anhand des Programms Primer3Plus (Untergasser et al. 2007) ausgesucht, wobei darauf geachtet wurde, dass diese keine bekannten SNPs in ihrer Sequenz aufwiesen, um eine Amplifikation beider Allele zu ermöglichen. Die Verteilung und Häufigkeit von SNPs im humanen Genom ist in ihrer Gänze erst zum Teil bekannt, so dass man davon ausgehen muss, dass ein großer Anteil bis heute nicht bekannt und verzeichnet ist (Stephens et al. 2001, Venter et al. 2001, Frazer et al. 2007). Diese noch unbekannten und nicht in den Datenbanken verzeichneten SNPs stellen eine mögliche Fehlerquelle dar. Liegt ein solcher SNP zufällig genau in der Primerbindesequenz, kann der Primer nicht an dieses Allel hybridisieren, wodurch dieses gar nicht oder nur sehr gering amplifiziert wird. Dieser sog. allelic drop out kann dazu führen, dass eine pathogene Mutation durch die selektive Amplifikation des normalen Allels unentdeckt bleibt (Zajickova et al. 2003, Heinrich et al. 2004, Ward et al. 2006). Dieses kann jedoch bei den untersuchten Sequenzabschnitten (Exons) ausgeschlossen werden, welche eine heterozygote Variante aufgewiesen haben.

Außerdem kann bei der hier durchgeführten Mutationsanalyse des *JAKMIP1*-Gens, die zwar die Übergänge zwischen den Exons und Introns umfasste, nicht ausgeschlossen werden, dass pathogene Mutationen in den 5'- oder 3'-untranslatierten Bereichen, in den intronischen Sequenzabschnitten, in den Promotorregionen oder in anderen regulatorischen Elementen bei den hier untersuchten Patienten vorliegen.

Auch darf man nicht aus den Augen verlieren, dass eine veränderte Genexpression, die krankheitsursächlich sein kann, durch Deletionen oder Duplikationen verursacht werden

kann. Solche können nur einige Basenpaare groß sein, so dass man sie bei der PCRbasierten Sequenzanalyse entdecken würde. Jedoch können sie ebenso das ganze Gen oder Teile des Gens (einzelne Exons) betreffen und bei der PCR-basierten Sequenzanalyse übersehen werden. Um dieses Problem zu vermeiden, wäre es notwendig, eine Methode wie die quantitative PCR (qPCR) oder die MLPA (*multiple ligation-dependent probe amplification*) zu verwenden, die eine Quantifizierung erlauben.

Abschließend lässt sich feststellen, dass keine pathogenen Mutationen im *JAKMIP1*-Gen identifiziert werden konnten, das *JAKMIP1*-Gen jedoch im Zusammenhang mit Gehirnfehlbildungen nicht gänzlich aus den Augen verloren werden sollte.

## VI Zusammenfassung

Die neuronalen Migrationsstörungen bilden eine heterogene Gruppe von kortikalen Fehlbildungen, die klinisch durch Intelligenzminderung und Epilepsie charakterisiert sind und durch unterschiedliche Störungen der neuronalen Migrationsphasen während der Kortikogenese entstehen. Eine Vielzahl von migrationsassoziierten Genen ist bekannt, jedoch lassen sich nicht alle Fälle und die Vielfalt der Migrationsstörungen auf Mutationen in diesen Genen zurückführen. Im Zuge dieser Doktorarbeit wurde eine Mutationsanalyse des funktionellen Kandidatengens JAKMIP1 durchgeführt. Für das von JAKMIP1 kodierte Protein Marlin-1 konnte eine Assoziation mit dem Mikrotubuliapparat, dem eine bedeutende Rolle bei der Migration zugeschrieben wird, gezeigt werden sowie eine Expression in bestimmten Arealen des zentralen Nervensystems (ZNS), wie dem Kleinhirn. Durch Herunterregulierung der Expression von Jakmip1 in Mäuseembryonen wurde festgestellt, dass die Neuronen in ihrer Wanderungsbewegung während der Kortikogenese gestört sind. Durch DNA-Sequenzanalyse des JAKMIP1-Gens konnten in einer Kohorte von 75 Patienten mit verschiedenen Gehirnfehlbildungen, u. а das Kleinhirn betreffend. acht Sequenzvarianten aufgedeckt werden, die aber mit großer Wahrscheinlichkeit nicht pathogen sind.

Der zweite Teil dieser Doktorarbeit beschäftigte sich mit der Identifizierung neuer positioneller Kandidatengene für Gehirnfehlbildungen. Es wurden drei Patienten mit jeweils einer balancierten Chromosomentranslokation und verschiedenen Gehirnfehlbildungen untersucht. Durch serielle Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) wurden die Bruchpunkte der Chromosomenaberrationen eingegrenzt, um Kandidatengene in den feinkartierten Regionen für den jeweiligen Krankheitsphänotyp aufzufinden.

Der 4q13.1-Bruchpunkt der 4;7-Translokation bei Patient 1 mit einer Dandy-Walker-Variante mit Kleinhirnaffektion konnte auf ~40 kb und der Bruchpunkt in 7q36.3 auf ~170 kb eingegrenzt werden. Als mögliche Kandidatengene wurden *MNX1, LMBR1, SHH, CNPY1* und *EN2* identifiziert, welche durch einen Positionseffekt den Phänotyp von Patient 1 erklären könnten, wobei *SHH* zum vielversprechendsten Kandidatengen zählt. Die 7;17-Translokation bei Patient 2 mit einer klassischen Lissenzephalie ergab im Zuge der FISH-Analysen, dass der Bruchpunkt das für die Typ 1-Lissenzephalie ursächliche Gen *LIS1* auf dem Chromosom 17 direkt unterbricht und diese Disruption mit großer Wahrscheinlichkeit kausal für den neurologischen Phänotyp und die Gehirnfehlbildungen des Patienten 2 ist.

Die 1;9-Translokation, die sowohl bei dem Patienten 3 mit Gehirnfehlbildungen und Verdacht auf das Walker-Warburg-Syndrom als auch bei seinem gesunden Vater vorlag, konnte in 1q36.13 auf ~180 kb und in 9q34.3 auf ~50 kb eingegrenzt werden. Als mögliches Kandidatengen für den neurologischen Phänotyp wird *EGFL7* diskutiert.

## VII Literaturverzeichnis

Agarwal AK, Arioglu E, De Almeida S, Akkoc N, Taylor SI, Bowcock AM, Barnes RI, Garg A (2002) AGPAT2 is mutated in congenital generalized lipodystrophy linked to chromosome 9q34. <u>Nat Genet</u> 31: 21-3

Aigner L UG, Couillard-Despres S et al. (2003) Somatic mosaicism and variable penetrance in doublecortin-associated migration disorders. <u>Neurology</u> 60: 329-332

Alkuraya FS, Cai X, Emery C, Mochida GH, Al-Dosari MS, Felie JM, Hill RS, Barry BJ, Partlow JN, Gascon GG, Kentab A, Jan M, Shaheen R, Feng Y, Walsh CA (2011) Human mutations in NDE1 cause extreme microcephaly with lissencephaly [corrected]. <u>Am J Hum Genet</u> 88: 536-47

Allanson JE, Ledbetter DH, Dobyns WB (1998) Classical lissencephaly syndromes: does the face reflect the brain? J Med Genet 35: 920-3

Anderson SA, Marin O, Horn C, Jennings K, Rubenstein JL (2001) Distinct cortical migrations from the medial and lateral ganglionic eminences. <u>Development</u> 128: 353-63

Angevine JB, Jr., Sidman RL (1961) Autoradiographic study of cell migration during histogenesis of cerebral cortex in the mouse. <u>Nature</u> 192: 766-8

Anthony TE, Klein C, Fishell G, Heintz N (2004) Radial glia serve as neuronal progenitors in all regions of the central nervous system. <u>Neuron</u> 41: 881-90

**Banna M, Malabarey T** (1989) Lissencephaly and pachygyria. <u>Can Assoc Radiol J</u> 40: 156-8

**Barkovich A, Kuzniecky R, Jackson G, Guerrini R, Dobyns W** (2005) A developmental and genetic classification for malformations of cortical development. <u>Neurology</u> 65: 1873-87

**Barkovich AJ** (1996) Imaging of the cobblestone lissencephalies. <u>AJNR Am J</u> <u>Neuroradiol</u> 17: 615-8

**Barkovich AJ, Guerrini R, Kuzniecky RI, Jackson GD, Dobyns WB** (2012) A developmental and genetic classification for malformations of cortical development: update 2012. <u>Brain</u> 135: 1348-69

**Barkovich AJ, Millen KJ, Dobyns WB** (2009) A developmental and genetic classification for midbrain-hindbrain malformations. <u>Brain</u> 132: 3199-230

Beltran-Valero de Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki AE, Cruces J, Voit T, Walsh CA, van Bokhoven H, Brunner HG (2002) Mutations in the O-mannosyltransferase gene POMT1 give rise to the severe neuronal migration disorder Walker-Warburg syndrome. <u>Am J Hum Genet</u> 71: 1033-43

Beltran-Valero de Bernabe D, Voit T, Longman C, Steinbrecher A, Straub V, Yuva Y, Herrmann R, Sperner J, Korenke C, Diesen C, Dobyns WB, Brunner HG, van Bokhoven H, Brockington M, Muntoni F (2004) Mutations in the FKRP gene can cause muscle-eye-brain disease and Walker-Warburg syndrome. J Med Genet 41: e61

Benko S, Fantes JA, Amiel J, Kleinjan DJ, Thomas S, Ramsay J, Jamshidi N, Essafi A, Heaney S, Gordon CT, McBride D, Golzio C, Fisher M, Perry P, Abadie V, Ayuso C, Holder-Espinasse M, Kilpatrick N, Lees MM, Picard A, Temple IK, Thomas P, Vazquez MP, Vekemans M, Crollius HR, Hastie ND, Munnich A, Etchevers HC, Pelet A, Farlie PG, Fitzpatrick DR, Lyonnet S (2009) Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence. Nat Genet 41: 359-64

**Bicker F, Schmidt MH** (2008) EGFL7: a new player in homeostasis of the nervous system. <u>Cell Cycle</u> 9: 1263-9

Blank MC, Grinberg I, Aryee E, Laliberte C, Chizhikov VV, Henkelman RM, Millen KJ (2011) Multiple developmental programs are altered by loss of Zic1 and Zic4 to cause Dandy-Walker malformation cerebellar pathogenesis. <u>Development</u> 138: 1207-16

**Boycott KM, Flavelle S, Bureau A, Glass HC, Fujiwara TM, Wirrell E, Davey K, Chudley AE, Scott JN, McLeod DR, Parboosingh JS** (2005) Homozygous deletion of the very low density lipoprotein receptor gene causes autosomal recessive cerebellar hypoplasia with cerebral gyral simplification. <u>Am J Hum Genet</u> 77: 477-83

**Bystron I, Blakemore C, Rakic P** (2008) Development of the human cerebral cortex: Boulder Committee revisited. <u>Nat Rev Neurosci</u> 9: 110-22

Cardoso C, Leventer RJ, Dowling JJ, Ward HL, Chung J, Petras KS, Roseberry JA, Weiss AM, Das S, Martin CL, Pilz DT, Dobyns WB, Ledbetter DH (2002) Clinical and molecular basis of classical lissencephaly: Mutations in the LIS1 gene (PAFAH1B1). <u>Hum Mutat</u> 19: 4-15

Cardoso C, Leventer RJ, Ward HL, Toyo-Oka K, Chung J, Gross A, Martin CL, Allanson J, Pilz DT, Olney AH, Mutchinick OM, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Dobyns WB, Ledbetter DH (2003) Refinement of a 400-kb critical region allows genotypic differentiation between isolated lissencephaly, Miller-Dieker syndrome, and other phenotypes secondary to deletions of 17p13.3. <u>Am J Hum Genet</u> 72: 918-30

Chen W, Kalscheuer V, Tzschach A, Menzel C, Ullmann R, Schulz MH, Erdogan F, Li N, Kijas Z, Arkesteijn G, Pajares IL, Goetz-Sothmann M, Heinrich U, Rost I, Dufke A, Grasshoff U, Glaeser B, Vingron M, Ropers HH (2008) Mapping translocation breakpoints by next-generation sequencing. <u>Genome Res</u> 18: 1143-9

**Cheng Y, Sudarov A, Szulc KU, Sgaier SK, Stephen D, Turnbull DH, Joyner AL** (2010) The Engrailed homeobox genes determine the different foliation patterns in the vermis and hemispheres of the mammalian cerebellum. <u>Development</u> 137: 519-29

Cohen PT (2002) Protein phosphatase 1--targeted in many directions. <u>J Cell Sci</u> 115: 241-56

**Cooper JA** (2008) A mechanism for inside-out lamination in the neocortex. <u>Trends</u> <u>Neurosci</u> 31: 113-9

Cormand B, Pihko H, Bayes M, Valanne L, Santavuori P, Talim B, Gershoni-Baruch R, Ahmad A, van Bokhoven H, Brunner HG, Voit T, Topaloglu H, Dobyns WB, Lehesjoki AE (2001) Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. <u>Neurology</u> 56: 1059-69

**Corrales JD, Blaess S, Mahoney EM, Joyner AL** (2006) The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. <u>Development</u> 133: 1811-21

Couve A, Restituito S, Brandon JM, Charles KJ, Bawagan H, Freeman KB, Pangalos MN, Calver AR, Moss SJ (2004) Marlin-1, a novel RNA-binding protein associates with GABA receptors. J Biol Chem 279: 13934-43

Currarino G, Coln D, Votteler T (1981) Triad of anorectal, sacral, and presacral anomalies. <u>AJR Am J Roentgenol</u> 137: 395-8

**Datson NA, Semina E, van Staalduinen AA, Dauwerse HG, Meershoek EJ, Heus JJ, Frants RR, den Dunnen JT, Murray JC, van Ommen GJ** (1996) Closing in on the Rieger syndrome gene on 4q25: mapping translocation breakpoints within a 50-kb region. <u>Am J Hum Genet</u> 59: 1297-305

des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrie A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala M, Kahn A, Beldjord C, Chelly J (1998) A novel CNS gene required for neuronal migration and involved in X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly syndrome. <u>Cell</u> 92: 51-61

**Dobyns WB, Reiner O, Carrozzo R, Ledbetter DH** (1993) Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. JAMA 270: 2838-42

**Dobyns WB, Truwit CL** (1995) Lissencephaly and other malformations of cortical development: 1995 update. <u>Neuropediatrics</u> 26: 132-47

**Dracopoli NC HJ, Korf BR, Morton CC, Seidman CE, Seidman JG, Smith DR** (2000) <u>Current protocols in human genetics</u>. John Wiley & Sons, New York

Fantes J, Redeker B, Breen M, Boyle S, Brown J, Fletcher J, Jones S, Bickmore W, Fukushima Y, Mannens M, et al. (1995) Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. <u>Hum</u> Mol Genet 4: 415-22

**Faulkner NE DD, Tai CY, Vaughan KT, O'Connel CB, Wang Y, Vallee RB** (2000) A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. <u>Nat</u> <u>Cell Biol</u> 2(11): 784-791

Feuk L, Carson AR, Scherer SW (2006) Structural variation in the human genome. Nat Rev Genet 7: 85-97

**Fitch MJ, Campagnolo L, Kuhnert F, Stuhlmann H** (2004) Egfl7, a novel epidermal growth factor-domain gene expressed in endothelial cells. <u>Dev Dyn</u> 230: 316-24

Forman MS, Squier W, Dobyns WB, Golden JA (2005) Genotypically defined lissencephalies show distinct pathologies. J Neuropathol Exp Neurol 64: 847-57

Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA (1998) Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. Neuron 21: 1315-25

Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J (1999) Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. <u>Neuron</u> 23: 247-56

Frazer KA, Ballinger DG, Cox DR, Hinds DA, Stuve LL, Gibbs RA, Belmont JW, Boudreau A, Hardenbol P, Leal SM, Pasternak S, Wheeler DA, Willis TD, Yu F, Yang H, Zeng C, Gao Y, Hu H, Hu W, Li C, Lin W, Liu S, Pan H, Tang X, Wang J, Wang W, Yu J, Zhang B, Zhang Q, Zhao H, Zhou J, Gabriel SB, Barry R, Blumenstiel B, Camargo A, Defelice M, Faggart M, Goyette M, Gupta S, Moore J, Nguyen H, Onofrio RC, Parkin M, Roy J, Stahl E, Winchester E, Ziaugra L, Altshuler D, Shen Y, Yao Z, Huang W, Chu X, He Y, Jin L, Liu Y, Sun W, Wang H, Wang Y, Xiong X, Xu L, Waye MM, Tsui SK, Xue H, Wong JT, Galver LM, Fan JB, Gunderson K, Murray SS, Oliphant AR, Chee MS, Montpetit A, Chagnon F, Ferretti V, Leboeuf M, Olivier JF, Phillips MS, Roumy S, Sallee C, Verner A, Hudson TJ, Kwok PY, Cai D, Koboldt DC, Miller RD, Pawlikowska L, Taillon-Miller P, Xiao M, Tsui LC, Mak W, Song YQ, Tam PK, Nakamura Y, Kawaguchi T, Kitamoto T, Morizono T, Nagashima A, Ohnishi Y, Sekine A, Tanaka T, Tsunoda T, et al. (2007) A second generation human haplotype map of over 3.1 million SNPs. <u>Nature</u> 449: 851-61

Garg A (2000) Lipodystrophies. Am J Med 108: 143-52

Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA (1998) Doublecortin, a brainspecific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. <u>Cell</u> 92: 63-72

**Gleeson JG, Walsh CA** (2000) Neuronal migration disorders: from genetic diseases to developmental mechanisms. <u>Trends Neurosci</u> 23: 352-9

Gressens P (2006) Pathogenesis of migration disorders. Curr Opin Neurol 19: 135-40

**Guerrini R, Dobyns WB, Barkovich AJ** (2008) Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. <u>Trends</u> <u>Neurosci</u> 31: 154-62

Guerrini R, Parrini E (2009) Neuronal migration disorders. Neurobiol Dis

Gunawardena SR, Ruis BL, Meyer JA, Kapoor M, Conklin KF (2008) NOM1 targets protein phosphatase I to the nucleolus. J Biol Chem 283: 398-404

**Hanson I, Van Heyningen V** (1995) Pax6: more than meets the eye. <u>Trends Genet</u> 11: 268-72

Hartmann H, Uyanik G, Gross C, Hehr U, Lucke T, Arslan-Kirchner M, Antosch B, Das AM, Winkler J (2004) Agenesis of the corpus callosum, abnormal genitalia and intractable epilepsy due to a novel familial mutation in the Aristaless-related homeobox gene. <u>Neuropediatrics</u> 35: 157-60

**Heinrich M, Muller M, Rand S, Brinkmann B, Hohoff C** (2004) Allelic drop-out in the STR system ACTBP2 (SE33) as a result of mutations in the primer binding region. Int J Legal Med 118: 361-3

**Hiesberger T, Trommsdorff M, Howell BW, Goffinet A, Mumby MC, Cooper JA, Herz J** (1999) Direct binding of Reelin to VLDL receptor and ApoE receptor 2 induces tyrosine phosphorylation of disabled-1 and modulates tau phosphorylation. <u>Neuron</u> 24: 481-9

Hill RE, Heaney SJ, Lettice LA (2003) Sonic hedgehog: restricted expression and limb dysmorphologies. J Anat 202: 13-20

**Hirate Y, Okamoto H** (2006) Canopy1, a novel regulator of FGF signaling around the midbrain-hindbrain boundary in zebrafish. <u>Curr Biol</u> 16: 421-7

Hirotsune S, Takahara T, Sasaki N, Hirose K, Yoshiki A, Ohashi T, Kusakabe M, Murakami Y, Muramatsu M, Watanabe S, et al. (1995) The reeler gene encodes a protein with an EGF-like motif expressed by pioneer neurons. <u>Nat Genet</u> 10: 77-83

Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. <u>Nat Genet</u> 26: 93-6

Horesh D, Sapir T, Francis F, Wolf SG, Caspi M, Elbaum M, Chelly J, Reiner O (1999) Doublecortin, a stabilizer of microtubules. <u>Hum Mol Genet</u> 8: 1599-610

Howard ML, Davidson EH (2004) cis-Regulatory control circuits in development. Dev Biol 271: 109-18

**Imaizumi K, Kimura J, Matsuo M, Kurosawa K, Masuno M, Niikawa N, Kuroki Y** (2002) Sotos syndrome associated with a de novo balanced reciprocal translocation t(5;8)(q35;q24.1). <u>Am J Med Genet</u> 107: 58-60

Jeong Y, Leskow FC, El-Jaick K, Roessler E, Muenke M, Yocum A, Dubourg C, Li X, Geng X, Oliver G, Epstein DJ (2008) Regulation of a remote Shh forebrain enhancer by the Six3 homeoprotein. <u>Nat Genet</u> 40: 1348-53

Jeziorska DM, Jordan KW, Vance KW (2009) A systems biology approach to understanding cis-regulatory module function. <u>Semin Cell Dev Biol</u> 20: 856-62

**Jiao H, Xiong H, Zhang YZ, Wang S, Yang YL, Wu XR** (2011) [Clinical and mutation analysis of a Chinese family with muscle eye brain disease]. <u>Zhonghua Yi Xue</u> <u>Yi Chuan Xue Za Zhi</u> 28: 481-4

**Joyner AL, Herrup K, Auerbach BA, Davis CA, Rossant J** (1991) Subtle cerebellar phenotype in mice homozygous for a targeted deletion of the En-2 homeobox. <u>Science</u> 251: 1239-43

**Kerjan G, Gleeson JG** (2007) Genetic mechanisms underlying abnormal neuronal migration in classical lissencephaly. <u>Trends Genet</u> 23: 623-30

Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, Omichi K, Suzuki R, Kato-Fukui Y, Kamiirisa K, Matsuo M, Kamijo S, Kasahara M, Yoshioka H, Ogata T, Fukuda T, Kondo I, Kato M, Dobyns WB, Yokoyama M, Morohashi K (2002) Mutation of ARX causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. <u>Nat Genet</u> 32: 359-69

Kleinjan DA, Seawright A, Schedl A, Quinlan RA, Danes S, van Heyningen V (2001) Aniridia-associated translocations, DNase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6. <u>Hum Mol</u> <u>Genet</u> 10: 2049-59

**Kleinjan DA, van Heyningen V** (2005) Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. <u>Am J Hum Genet</u> 76: 8-32

Kleinjan DJ, van Heyningen V (1998) Position effect in human genetic disease. <u>Hum</u> <u>Mol Genet</u> 7: 1611-8

Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. <u>Nature</u> 394: 388-92

Kurahashi H, Sakamoto M, Ono J, Honda A, Okada S, Nakamura Y (1998) Molecular cloning of the chromosomal breakpoint in the LIS1 gene of a patient with isolated lissencephaly and balanced t(8;17). <u>Hum Genet</u> 103: 189-92

Kurotaki N, Imaizumi K, Harada N, Masuno M, Kondoh T, Nagai T, Ohashi H, Naritomi K, Tsukahara M, Makita Y, Sugimoto T, Sonoda T, Hasegawa T, Chinen Y, Tomita Ha HA, Kinoshita A, Mizuguchi T, Yoshiura Ki K, Ohta T, Kishino T, Fukushima Y, Niikawa N, Matsumoto N (2002) Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. <u>Nat Genet</u> 30: 365-6

Kutsche K, Yntema H, Brandt A, Jantke I, Nothwang HG, Orth U, Boavida MG, David D, Chelly J, Fryns JP, Moraine C, Ropers HH, Hamel BC, van Bokhoven H, Gal A (2000) Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. <u>Nat Genet</u> 26: 247-50

**Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E** (2003) A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. <u>Hum Mol Genet</u> 12: 1725-35

Lettice LA, Horikoshi T, Heaney SJ, van Baren MJ, van der Linde HC, Breedveld GJ, Joosse M, Akarsu N, Oostra BA, Endo N, Shibata M, Suzuki M, Takahashi E, Shinka T, Nakahori Y, Ayusawa D, Nakabayashi K, Scherer SW, Heutink P, Hill RE, Noji S (2002) Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 99: 7548-53

Leung DW (2001) The structure and functions of human lysophosphatidic acid acyltransferases. <u>Front Biosci</u> 6: D944-53

Leventer RJ, Mills PL, Dobyns WB (2000) X-linked malformations of cortical development. <u>Am J Med Genet</u> 97: 213-20

Lu J, Sheen V (2005) Periventricular heterotopia. Epilepsy Behav 7: 143-9

Lynch SA, Wang Y, Strachan T, Burn J, Lindsay S (2000) Autosomal dominant sacral agenesis: Currarino syndrome. J Med Genet 37: 561-6

Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, Mewborn SK, Dudlicek LL, Ramocki MB, Pilz DT, Mills PL, Das S, Ross ME, Ledbetter DH, Dobyns WB (2001) Mutation analysis of the DCX gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. <u>Eur J Hum Genet</u> 9: 5-12

**Miura H, Yanazawa M, Kato K, Kitamura K** (1997) Expression of a novel aristaless related homeobox gene 'Arx' in the vertebrate telencephalon, diencephalon and floor plate. <u>Mech Dev</u> 65: 99-109

**Mullis KB, Faloona FA** (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. <u>Methods Enzymol</u> 155: 335-50

**Nadarajah B, Brunstrom JE, Grutzendler J, Wong RO, Pearlman AL** (2001) Two modes of radial migration in early development of the cerebral cortex. <u>Nat Neurosci</u> 4: 143-50

Nobrega MA, Ovcharenko I, Afzal V, Rubin EM (2003) Scanning human gene deserts for long-range enhancers. <u>Science</u> 302: 413

**Noctor SC, Martinez-Cerdeno V, Kriegstein AR** (2007) Neural stem and progenitor cells in cortical development. <u>Novartis Found Symp</u> 288: 59-73; discussion 73-8, 96-8

Ogawa M, Miyata T, Nakajima K, Yagyu K, Seike M, Ikenaka K, Yamamoto H, Mikoshiba K (1995) The reeler gene-associated antigen on Cajal-Retzius neurons is a crucial molecule for laminar organization of cortical neurons. <u>Neuron</u> 14: 899-912

**Osoegawa K, Mammoser AG, Wu C, Frengen E, Zeng C, Catanese JJ, de Jong PJ** (2001) A bacterial artificial chromosome library for sequencing the complete human genome. <u>Genome Res</u> 11: 483-96

Parrini E, Ramazzotti A, Dobyns W, Mei D, Moro F, Veggiotti P, Marini C, Brilstra E, Dalla Bernardina B, Goodwin L, Bodell A, Jones M, Nangeroni M, Palmeri S, Said E, Sander J, Striano P, Takahashi Y, Van Maldergem L, Leonardi G, Wright M, Walsh C, Guerrini R (2006) Periventricular heterotopia: phenotypic heterogeneity and correlation with Filamin A mutations. <u>Brain</u> 129: 1892-906

Pavone P, Ruggieri M, Lombardo I, Sudi J, Biancheri R, Castellano-Chiodo D, Rossi A, Incorpora G, Nowak NJ, Christian SL, Pavone L, Dobyns WB (2010) Microcephaly, sensorineural deafness and Currarino triad with duplication-deletion of distal 7q. <u>Eur J Pediatr</u> 169: 475-81

**Pilz DT, Kuc J, Matsumoto N, Bodurtha J, Bernadi B, Tassinari CA, Dobyns WB, Ledbetter DH** (1999) Subcortical band heterotopia in rare affected males can be caused by missense mutations in DCX (XLIS) or LIS1. <u>Hum Mol Genet</u> 8: 1757-60

Poirier K, Keays DA, Francis F, Saillour Y, Bahi N, Manouvrier S, Fallet-Bianco C, Pasquier L, Toutain A, Tuy FP, Bienvenu T, Joriot S, Odent S, Ville D, Desguerre I, Goldenberg A, Moutard ML, Fryns JP, van Esch H, Harvey RJ, Siebold C, Flint J, Beldjord C, Chelly J (2007) Large spectrum of lissencephaly and pachygyria phenotypes resulting from de novo missense mutations in tubulin alpha 1A (TUBA1A). <u>Hum Mutat</u> 28: 1055-64

**Porter BE, Brooks-Kayal A, Golden JA** (2002) Disorders of cortical development and epilepsy. <u>Arch Neurol</u> 59: 361-5

**Puche A, Rodriguez T, Domingo R, Casas C, Vicente T, Martinez-Lage JF** (1998) X-linked subcortical laminar heterotopia and lissencephaly: a new family. <u>Neuropediatrics</u> 29: 276-8

**Rakic P** (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. <u>Brain</u> <u>Res</u> 33: 471-6

**Roessler E, Belloni E, Gaudenz K, Jay P, Berta P, Scherer SW, Tsui LC, Muenke M** (1996) Mutations in the human Sonic Hedgehog gene cause holoprosencephaly. <u>Nat Genet</u> 14: 357-60

**Roessler E, Ward DE, Gaudenz K, Belloni E, Scherer SW, Donnai D, Siegel-Bartelt J, Tsui LC, Muenke M** (1997) Cytogenetic rearrangements involving the loss of the Sonic Hedgehog gene at 7q36 cause holoprosencephaly. <u>Hum Genet</u> 100: 172-81

**Ross ME, Swanson K, Dobyns WB** (2001) Lissencephaly with cerebellar hypoplasia (LCH): a heterogeneous group of cortical malformations. <u>Neuropediatrics</u> 32: 256-63

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> 74: 5463-7

Schmidt M, Paes K, De Maziere A, Smyczek T, Yang S, Gray A, French D, Kasman I, Klumperman J, Rice DS, Ye W (2007) EGFL7 regulates the collective migration of endothelial cells by restricting their spatial distribution. <u>Development</u> 134: 2913-23

Schmidt MH, Bicker F, Nikolic I, Meister J, Babuke T, Picuric S, Muller-Esterl W, Plate KH, Dikic I (2009) Epidermal growth factor-like domain 7 (EGFL7) modulates Notch signalling and affects neural stem cell renewal. <u>Nat Cell Biol</u> 11: 873-80

Seip M, Trygstad O (1996) Generalized lipodystrophy, congenital and acquired (lipoatrophy). <u>Acta Paediatr Suppl</u> 413: 2-28

Selypes A, Laszlo A (1988) Miller-Dieker syndrome and monosomy 17p13: a new case. <u>Hum Genet</u> 80: 103-4

Semina EV, Reiter R, Leysens NJ, Alward WL, Small KW, Datson NA, Siegel-Bartelt J, Bierke-Nelson D, Bitoun P, Zabel BU, Carey JC, Murray JC (1996) Cloning and characterization of a novel bicoid-related homeobox transcription factor gene, RIEG, involved in Rieger syndrome. <u>Nat Genet</u> 14: 392-9

**Shaffer LG** (2005) American College of Medical Genetics guideline on the cytogenetic evaluation of the individual with developmental delay or mental retardation. <u>Genet Med</u> 7: 650-4

**Shaffer LG, Lupski JR** (2000) Molecular mechanisms for constitutional chromosomal rearrangements in humans. <u>Annu Rev Genet</u> 34: 297-329

Sheen V, Ganesh V, Topcu M, Sebire G, Bodell A, Hill R, Grant P, Shugart Y, Imitola J, Khoury S, Guerrini R, Walsh C (2004) Mutations in ARFGEF2 implicate vesicle trafficking in neural progenitor proliferation and migration in the human cerebral cortex. Nat Genet 36: 69-76

Sheen VL, Walsh CA (2005) Periventricular heterotopia: new insights into Ehlers-Danlos syndrome. <u>Clin Med Res</u> 3: 229-33

**Simmons HM, Ruis BL, Kapoor M, Hudacek AW, Conklin KF** (2005) Identification of NOM1, a nucleolar, eIF4A binding protein encoded within the chromosome 7q36 breakpoint region targeted in cases of pediatric acute myeloid leukemia. <u>Gene</u> 347: 137-45

**Smith HO, Birnstiel ML** (1976) A simple method for DNA restriction site mapping. <u>Nucleic Acids Res</u> 3: 2387-98

**Steindler C, Li Z, Algarte M, Alcover A, Libri V, Ragimbeau J, Pellegrini S** (2004) Jamip1 (marlin-1) defines a family of proteins interacting with janus kinases and microtubules. J Biol Chem 279: 43168-77

Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, Jiang R, Messer CJ, Chew A, Han JH, Duan J, Carr JL, Lee MS, Koshy B, Kumar AM, Zhang G, Newell WR, Windemuth A, Xu C, Kalbfleisch TS, Shaner SL, Arnold K, Schulz V, Drysdale CM, Nandabalan K, Judson RS, Ruano G, Vovis GF (2001) Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. <u>Science</u> 293: 489-93

Strachan T, Read AP (1999) <u>Human molecular genetics 2/ Tom Strachan and Andrew</u> P. Read., 2nd ed. edn. New York : Wiley-Liss

Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, de Grassi A, Lee C, Tyler-Smith C, Carter N, Scherer SW, Tavare S, Deloukas P, Hurles ME, Dermitzakis ET (2007) Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. <u>Science</u> 315: 848-53 Tohyama J, Kato M, Kawasaki S, Harada N, Kawara H, Matsui T, Akasaka N, Ohashi T, Kobayashi Y, Matsumoto N (2011) Dandy-Walker malformation associated with heterozygous ZIC1 and ZIC4 deletion: Report of a new patient. <u>Am J Med Genet A</u> 155A: 130-3

Ton CC, Hirvonen H, Miwa H, Weil MM, Monaghan P, Jordan T, van Heyningen V, Hastie ND, Meijers-Heijboer H, Drechsler M, et al. (1991) Positional cloning and characterization of a paired box- and homeobox-containing gene from the aniridia region. <u>Cell</u> 67: 1059-74

**Trommsdorff M, Gotthardt M, Hiesberger T, Shelton J, Stockinger W, Nimpf J, Hammer RE, Richardson JA, Herz J** (1999) Reeler/Disabled-like disruption of neuronal migration in knockout mice lacking the VLDL receptor and ApoE receptor 2. <u>Cell</u> 97: 689-701

Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. <u>Nucleic Acids Res</u> 35: W71-4

**Uyanik G, Aigner L, Martin P, Gross C, Neumann D, Marschner-Schafer H, Hehr U, Winkler J** (2003) ARX mutations in X-linked lissencephaly with abnormal genitalia. <u>Neurology</u> 61: 232-5

Uyanik G, Morris-Rosendahl DJ, Stiegler J, Klapecki J, Gross C, Berman Y, Martin P, Dey L, Spranger S, Korenke GC, Schreyer I, Hertzberg C, Neumann TE, Burkart P, Spaich C, Meng M, Holthausen H, Ades L, Seidel J, Mangold E, Buyse G, Meinecke P, Schara U, Zeschnigk C, Muller D, Helland G, Schulze B, Wright ML, Kortge-Jung S, Hehr A, Bogdahn U, Schuierer G, Kohlhase J, Aigner L, Wolff G, Hehr U, Winkler J (2007) Location and type of mutation in the LIS1 gene do not predict phenotypic severity. <u>Neurology</u> 69: 442-7

**Vaillant C, Monard D** (2009) SHH pathway and cerebellar development. <u>Cerebellum</u> 8: 291-301

Vallee RB, Faulkner NE, Tai CY (2000) The role of cytoplasmic dynein in the human brain developmental disease lissencephaly. <u>Biochim Biophys Acta</u> 1496: 89-98

van der Flier A, Sonnenberg A (2001) Structural and functional aspects of filamins. Biochim Biophys Acta 1538: 99-117

van Reeuwijk J, Grewal PK, Salih MA, Beltran-Valero de Bernabe D, McLaughlan JM, Michielse CB, Herrmann R, Hewitt JE, Steinbrecher A, Seidahmed MZ, Shaheed MM, Abomelha A, Brunner HG, van Bokhoven H, Voit T (2007) Intragenic deletion in the LARGE gene causes Walker-Warburg syndrome. <u>Hum Genet</u> 121: 685-90 van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C, Beltran-Valero de Bernabe D, Sabatelli P, Merlini L, Boon M, Scheffer H, Brockington M, Muntoni F, Huynen MA, Verrips A, Walsh CA, Barth PG, Brunner HG, van Bokhoven H (2005) POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. J Med Genet 42: 907-12

Velagaleti GV, Bien-Willner GA, Northup JK, Lockhart LH, Hawkins JC, Jalal SM, Withers M, Lupski JR, Stankiewicz P (2005) Position effects due to chromosome breakpoints that map approximately 900 Kb upstream and approximately 1.3 Mb downstream of SOX9 in two patients with campomelic dysplasia. <u>Am J Hum Genet</u> 76: 652-62

Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gocayne JD, Amanatides P, Ballew RM, Huson DH, Wortman JR, Zhang Q, Kodira CD, Zheng XH, Chen L, Skupski M, Subramanian G, Thomas PD, Zhang J, Gabor Miklos GL, Nelson C, Broder S, Clark AG, Nadeau J, McKusick VA, Zinder N, Levine AJ, Roberts RJ, Simon M, Slayman C, Hunkapiller M, Bolanos R, Delcher A, Dew I, Fasulo D, Flanigan M, Florea L, Halpern A, Hannenhalli S, Kravitz S, Levy S, Mobarry C, Reinert K, Remington K, Abu-Threideh J, Beasley E, Biddick K, Bonazzi V, Brandon R, Cargill M, Chandramouliswaran I, Charlab R, Chaturvedi K, Deng Z, Di Francesco V, Dunn P, Eilbeck K, Evangelista C, Gabrielian AE, Gan W, Ge W, Gong F, Gu Z, Guan P, Heiman TJ, Higgins ME, Ji RR, Ke Z, Ketchum KA, Lai Z, Lei Y, Li Z, Li J, Liang Y, Lin X, Lu F, Merkulov GV, Milshina N, Moore HM, Naik AK, Narayan VA, Neelam B, Nusskern D, Rusch DB, Salzberg S, Shao W, Shue B, Sun J, Wang Z, Wang A, Wang X, Wang J, Wei M, Wides R, Xiao C, Yan C, et al. (2001) The sequence of the human genome. <u>Science</u> 291: 1304-51

**Vidal RL, Fuentes P, Valenzuela JI, Alvarado-Diaz CP, Ramirez OA, Kukuljan M, Couve A** (2012) RNA interference of Marlin-1/Jakmip1 results in abnormal morphogenesis and migration of cortical pyramidal neurons. <u>Mol Cell Neurosci</u> 51: 1-11

**Vidal RL, Ramirez OA, Sandoval L, Koenig-Robert R, Hartel S, Couve A** (2007) Marlin-1 and conventional kinesin link GABAB receptors to the cytoskeleton and regulate receptor transport. <u>Mol Cell Neurosci</u> 35: 501-12

Vidal RL, Valenzuela JI, Lujan R, Couve A (2009) Cellular and subcellular localization of Marlin-1 in the brain. <u>BMC Neurosci</u> 10: 37

**Warburton D** (1991) De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. <u>Am J Hum Genet</u> 49: 995-1013

Ward KJ, Ellard S, Yajnik CS, Frayling TM, Hattersley AT, Venigalla PN, Chandak GR (2006) Allelic drop-out may occur with a primer binding site polymorphism for the commonly used RFLP assay for the -1131T>C polymorphism of the Apolipoprotein AV gene. Lipids Health Dis 5: 11

**Wynshaw-Boris A, Gambello MJ** (2001) LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. <u>Genes Dev</u> 15: 639-51

Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T, Endo T (2001) Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. <u>Dev Cell</u> 1: 717-24

**Zajickova K, Krepelova A, Zofkova I** (2003) A single nucleotide polymorphism under the reverse primer binding site may lead to BsmI mis-genotyping in the vitamin D receptor gene. J Bone Miner Res 18: 1754-7

## VIII Anhang

#### 1 Danksagung

Dank gebührt allen, die mich bei dieser Arbeit in jeglicher Weise unterstützt und mich immer wieder ermutigt haben.

Besonders danke ich Dr. Gökhan Uyanik für seine engagierte Betreuung sowie für seine positive und humorvolle Art. Ebenso Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche für ihre Unterstützung und ihren stetigen Elan sowie der ganzen Arbeitsgruppe.

Ich spreche Herrn Prof. Dr. Andreas Gal meinen Dank für die Ermöglichung der Promotion am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf aus.

Weiterhin möchte ich mich beim ganzen Laborteam, insbesondere Inka Jantke für ihre große Hilfe und die vielen lustigen Momente bedanken.

Natürlich danke ich auch meinen Kolleginnnen und Kollegen am Institut für Humangenetik, vor allem danke ich Sybille Lorenz und Max Flindt für die lustigen Stunden im Labor sowie Birte Lübker für die kompetente Einweisung in die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung, Frau Anette Stryczek und Frau Karin Ziegler für die Herstellung der Chromosomenpräparate sowie Frau Dr. Sigrid Fuchs für ihre Ratschläge.

Von ganzem Herzen danke ich meiner Mutter, die immer für mich da ist sowie meinen Freunden, insbesondere Hilke Böttcher. Ebenso meinem Vater und Gebhard Huckfeldt, die sich über das Gelingen dieser Arbeit sicherlich sehr gefreut hätten.

## 2 Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

#### **3** 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: .....