

# **Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf**

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin

Aus dem Institut für Humangenetik

Direktor: Prof. Dr. med. Kubisch

## **Mutationsanalyse von Kandidatengenen für das Noonan-Syndrom**

Dissertation

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

vorgelegt von:

Koschan Maroofi

aus Berlin

Hamburg 2014

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 20.03.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, der Vorsitzende: Privatdozent Doktor Georg Rosenberger

Prüfungsausschuss: 2. Gutachterin: Professor Doktor Kerstin Kutsche

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: Privatdozent Doktor Jun Oh

## **Inhaltsverzeichnis**

<b>I.</b>	<b>Fragestellung und Arbeitshypothese</b>	<b>1</b>
<b>II.</b>	<b>Einleitung</b>	<b>2-14</b>
1.	<b>Das Noonan-Syndrom</b>	<b>2</b>
1.1	Klinik des Noonan-Syndroms	2-6
1.2	Die Gruppe der „RASopathien“	6-8
2.	<b>Genetik des Noonan-Syndroms</b>	<b>8-11</b>
3.	<b>Strategien zur Auswahl der Kandidatengene</b>	<b>11-14</b>
<b>III.</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>14-28</b>
1.	<b>Material</b>	<b>15-19</b>
1.1	Patientenbeschreibung	15-16
1.2	Chemikalien und Lösungsmittel	16
1.3	Kits	16
1.4	Enzyme	16
1.5	Längenstandards	17
1.6	Nukleinsäuren	17
1.7	Puffer, Medien, Lösungen und Zusätze	17
1.7.1	PCR-Puffer	17
1.7.2	Puffer und Lösungen für die Agaroseelektrophorese	17
1.7.3	Allgemeine Puffer	17
1.8	Gerätschaften	18
1.9	Oligonukleotide	18
1.9.1	Oligonukleotide für die Mutationsanalyse der Kandidatengene <i>CAVI, CAV2, KIT, FLT3, PIK3CA</i> und <i>JAK2</i>	19
2.	<b>Molekularbiologische Methoden</b>	<b>19-26</b>
2.1	Amplifikation von genomischer DNA	19-21
2.1.1	Reaktionsschritte und -bedingungen für die Amplifikation von genomischer DNA	20

## Inhaltsverzeichnis

2.2	Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	20-22
2.2.1	Standard-PCR-Ansatz	21
2.2.2	Reaktionsschritte und -bedingungen der PCR	21
2.2.3	PCR-Bedingungen der verwendeten Primerpaare unter Angabe der Amplikongrößen	22-23
2.3	Agarosegelelektrophorese	23-24
2.4	Aufreinigung von PCR-Produkten	24
2.4.1	ExoSAP-Ansatz	24
2.5	DNA-Sequenzierung	24-26
2.5.1	Sequenzierungsansatz	25
2.5.2	Sequenzierungsbedingungen	25
2.5.3	Aufreinigungsansatz des Sequenzierprodukts	25
<b>3.</b>	<b>Genbank-Einträge, Computerprogramme und Datenbanken</b>	<b>26-28</b>
3.1	Genbank-Einträge der analysierten Gene	26
3.2	Datenbanken	26
3.3	Computerprogramme	27
3.4	„Online“-Computerprogramme	27-28
<b>IV.</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>29-34</b>
<b>1.</b>	<b>Mutationsanalyse von neun Kandidatengenen bei 35 Patienten mit Noonan-Syndrom</b>	<b>29-34</b>
1.1	PCR-Amplifikation der Kodierregion der Gene <i>PIK3CA</i> , <i>JAK2</i> , <i>FLT3</i> , <i>KIT</i> , <i>SPRED1</i> , <i>CAV1</i> , <i>CAV2</i> , <i>FRS2</i> und <i>FRS3</i> und direkte DNA-Sequenzanalyse	29-33
1.2	Identifizierte Sequenzvarianten	33-34
<b>V.</b>	<b>Diskussion</b>	<b>35-45</b>
<b>1.</b>	<b>Keine pathogene Mutation in den vier Leukämie-assoziierten Genen <i>KIT</i>, <i>FLT3</i>, <i>JAK2</i> und <i>PIK3CA</i>, in den drei funktionellen Kandidatengenen des RAS-MAPK-Signalwegs <i>SPRED1</i>, <i>FRS2</i> und <i>FRS3</i>, sowie in den zwei nach Tiermodellen ausgewählten Kandidatengenen <i>CAV1</i> und <i>CAV2</i> bei 35 Patienten mit Noonan-Syndrom</b>	<b>35-42</b>

## Inhaltsverzeichnis

1.1	Rekapitulation	35-36
1.2	Limitierungen	36-42
1.2.1	Technische Limitierung	36
1.2.2	Methodische Limitierungen	36-37
1.2.3	Limitierung durch das Patientenkollektiv	37-38
1.2.4	Limitierung - unpassende Kandidatengene	38
1.2.4.1	Onkogene	38-39
1.2.4.2	Kandidatengene aufgrund von Tiermodellen	39-40
1.2.4.3	Gene für Signaltransduktionsproteine	40-41
1.2.4.4	Zusammenschau	41-42
<b>2.</b>	<b>Ungeklärte Varianten in den untersuchten Kandidatengen</b>	<b>42-43</b>
<b>3.</b>	<b>Optionen zur Identifizierung weiterer Krankheitsgene - Ausblick</b>	<b>43-45</b>
3.1	Verwendung alternativer Locus-spezifischer Screening-Methoden	43-44
3.2	Rekrutierung eines größeren Patientenkollektivs	44
3.3	Genomweite Analysen: Array cGH und NGS	44-45
<b>VI.</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>46-47</b>
<b>VII.</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>48-51</b>
<b>VIII.</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>52-62</b>
<b>IX.</b>	<b>Danksagung</b>	<b>63</b>
<b>X.</b>	<b>Lebenslauf</b>	<b>64</b>
<b>XI.</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung</b>	<b>65</b>

## **I. Fragestellung und Arbeitshypothese**

Das Noonan-Syndrom (OMIM 163950) ist eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung mit einer Prävalenz von 1:1000-1:2500 (Noonan 1994, Mautner et al. 2010). Die Patienten zeigen typischerweise die Trias bestehend aus charakteristischen fazialen Dysmorphien, kongenitalen Herzfehlern und Kleinwuchs (Mautner et al. 2010).

Bislang wurden Mutationen in den Genen *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *NRAS* und *RIT1* mit dem Noonan-Syndrom assoziiert (Tartaglia et al. 2001, Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007, Razzaque et al. 2007, Pandit et al. 2007, Schubbert et al. 2006, Cirstea et al. 2009, Aoki et al. 2013). Des Weiteren werden Mutationen in *SHOC2* und *CBL* mit Noonan-Syndrom-ähnlichen Phänotypen assoziiert (Cordeddu et al. 2009, Martinelli et al. 2010). Bemerkenswerterweise kodieren alle acht Gene für Proteine aus dem RAS-MAPK-Signalweg. Die große Mehrheit der bisher gefundenen Noonan-Syndrom-assoziierten Mutationen in diesen Genen führt zu einer verstärkten Signaltransduktion, vor allem der RAS-MAPK-Kaskade (Mautner et al. 2010), durch die extrazelluläre Signale von der Zellmembran in den Zellkern übermittelt werden. Zusammengefasst findet man bei 75% der Patienten mit Noonan-Syndrom eines der o. g. Gene mutiert vor (Tartaglia et al. 2011). Dementsprechend sind etwa 25% der klinisch diagnostizierten Patienten mit Noonan-Syndrom mutationsnegativ in diesen Genen. In der vorliegenden Arbeit sollen daher weitere für das Noonan-Syndrom ursächliche Krankheitsgene aufgedeckt werden.

Über drei unterschiedliche Ansätze werden für diese Arbeit Kandidatengene, die bei Mutation das Auftreten des Noonan-Syndroms erklären könnten, ausgewählt: Da Patienten mit Noonan-Syndrom ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Leukämien, vor allem juveniler myelomonozytärer Leukämie (JMML), haben (Tartaglia et al. 2003, Mautner et al. 2010), werden Leukämie-assoziierte Gene als gute Kandidatengene angesehen. Außerdem werden Kandidatengene, deren Genprodukte regulatorisch in die RAS-abhängigen Signalwege eingreifen, ausgewählt, da die noch unbekanntes Krankheitsgene des Noonan-Syndroms wahrscheinlich mit den RAS-abhängigen Signalwegen zu tun haben werden (Zenker und Wiczorek 2007). Aufgrund phänotypischer Überlappungen zwischen Tiermodellen und dem Noonan-Syndrom werden wiederum weitere aussichtsreiche Kandidatengene ausgewählt. In einem Kollektiv von 35 mutationsnegativen Patienten mit Noonan-Syndrom sollen die so ausgewählten Kandidatengene auf Mutationen untersucht werden.

## II. Einleitung

### 1. Das Noonan-Syndrom

#### 1.1 Klinik

Die erste Beschreibung eines Patienten mit Noonan-Syndrom fand im 19. Jahrhundert statt (Koblinsky 1883), wenn auch die Erkrankung erst im Jahr 1963 nach der Kinderärztin und Kinderkardiologin Dr. Jacqueline Noonan benannt wurde. Interessiert an der Frage, warum einige Kinder angeborene Herzfehler und verschiedene andere Abnormalitäten aufwiesen, untersuchte sie 833 Patienten. 1963 veröffentlichte sie eine wissenschaftliche Arbeit mit dem Titel „*Associated non-cardiac malformations in children with congenital heart disease*“. Beschrieben wurden neun Kinder, die zusätzlich zu angeborenen Herzfehlern charakteristische faziale Dysmorphien, Thoraxdeformationen und eine kleine Statur aufwiesen (Noonan und Ehmke 1963). In einer weiteren wissenschaftlichen Arbeit über 19 Patienten mit ähnlichen Phänotypen wie die Patienten aus o. g. Arbeit stellte Frau Dr. Noonan 1968 fest, dass neben Jungen auch häufig Mädchen betroffen waren. Zudem wiesen ihre Chromosomen weder strukturelle noch numerische Aberrationen auf (Noonan 1968). Es dauerte jedoch noch über 30 Jahre bis man das Noonan-Syndrom und seine typische Trias bestehend aus charakteristischen fazialen Dysmorphien, kongenitalen Herzfehlern und Kleinwuchs mit genetischen Mutationen in *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *NRAS* und *RIT1* verknüpfen konnte (Tartaglia et al. 2001, Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007, Razzaque et al. 2007, Pandit et al. 2007, Schubbert et al. 2006, Cirstea et al. 2009, Aoki et al. 2013). Die charakteristischen fazialen Dysmorphien beim Noonan-Syndrom sind Hypertelorismus, eine Ptosis, nach lateral abfallende Lidachsen, ein Epikanthus, ein flacher Nasenrücken und niedrig ansetzende und nach dorsal rotierte Ohren (Abb. 1).



**Abb. 1: Fotos zweier Kinder mit Noonan-Syndrom.**

Die typischen fazialen Dysmorphien sind deutlich zu erkennen. Beide Kinder weisen einen vergrößerten Augenabstand, nach lateral abfallende Lidachsen, niedrig ansetzende und nach dorsal rotierte Ohren und einen flachen Nasenrücken auf. Der Junge auf dem rechten Foto weist zudem einen Epikanthus und eine Ptosis auf (Foto links aus Mautner et al. 2010, Foto rechts aus Allanson et al. 2010).

## II. Einleitung

Bei mehr als 80% der Patienten mit Noonan-Syndrom werden kardiovaskuläre Erkrankungen (Romano et al. 2010) und bei 67 % kongenitale Herzfehler diagnostiziert (Allanson 1987). Im Vordergrund stehen Pulmonalklappenstenosen, hypertrophe (obstruktive) Kardiomyopathie [H(O)CM], Atriumseptumdefekte (ASD), Ventrikelseptumdefekte (VSD) und ein persistierender Ductus arteriosus (Allanson 1987, van der Burgt 2007, Romano et al. 2010). Zudem weisen 58-60% der Noonan-Syndrom-Patienten ein charakteristisches Elektrokardiogramm (EKG) auf (Bertola et al. 2000, Raaijmakers et al. 2008), das keinem spezifischen Herzfehler zuzuordnen ist (Raaijmakers et al. 2008).

Die verminderte Körpergröße ist ein weiteres Hauptmerkmal für das Noonan-Syndrom (van der Burgt 2007), wobei die Ursache nicht vollends geklärt ist. Bei den meisten Noonan-Syndrom-Patienten werden Werte für das Wachstumshormon Somatotropin im Normbereich festgestellt (Kelnar 2000). Regelmäßig wird aber auch von abnormalen Somatotropin-Werten bei Noonan-Syndrom-Patienten berichtet (Noordam et al. 2001).

Postnatal zeigen Noonan-Syndrom-Säuglinge ein Fütterungsproblem (Sharland et al. 1992, Romano et al. 2010), was sich meist von selbst löst (van der Burgt. 2007, Romano et al. 2010). Es kann allerdings sein, dass bis zu einem Kleinkindalter von 18 Monaten nur schwache Gewichtszunahmen erfolgen (Romano et al. 2010). In der Folge wachsen Noonan-Syndrom-Patienten stetig und erreichen im Erwachsenenalter eine Körpergröße im untersten Durchschnittsbereich. Die Pubertät setzt ungefähr zwei Jahre verspätet ein, während der pubertäre Wachstumsspurst reduziert oder ganz ausbleiben kann. Auch das skelettale Alter Betroffener ist um zwei Jahre reduziert. Männliche Erkrankte werden im Durchschnitt 162,5 cm groß, während weibliche Noonan-Syndrom-Patienten eine durchschnittliche Größe von 152,7 cm erreichen (Ranke et al. 1988). Weiterhin haben Noonan-Syndrom-Patienten häufig eine Deformation des Brustkorbs in Form einer Pectus excavatum (Trichterbrust) oder einer Pectus carinatum (Kielbrust) (Allanson 1987, Sharland et al. 1992). Je nach Ausprägungsgrad können bei einer Pectus excavatum Funktionen des Herzens und der Lunge eingeschränkt sein (Jaroszewski et al. 2010). Die Pectus carinatum führt normalerweise zu keinen Funktionseinschränkungen der Lunge oder des Herzens (Moreno et al. 2011).

Neben den erwähnten Hauptcharakteristika kommen bei Patienten mit Noonan-Syndrom Blutgerinnungsstörungen variabler Ausprägung vor (Witt et al. 1988), die durch Thrombozytenfunktionsstörungen (Thrombozytopenien oder Thrombozytopathien), Von-Willebrand-Syndrom oder Mangel an plasmatischen Gerinnungsfaktoren (VII, IX, XI, XII) verursacht werden können (de Haan et al. 1988, Mautner et al. 2010). Weiterhin werden Augenanomalien, wie Strabismus, Brechungsfehler und Nystagmus beobachtet. Ein Teil der

## II. Einleitung

Betroffenen zeigt eine milde kognitive Entwicklungsverzögerung, die sich im Schulalter durch Lernschwierigkeiten und Teilleistungsstörungen manifestiert (Lee et al. 2005). In Tabelle 1 sind alle klinischen Charakteristika des Noonan-Syndroms zusammengefasst (van der Burgt 2007).

<b>Organsystem</b>	<b>Klinisches Merkmal</b>	<b>Anteil in %</b>
<b>Herz</b>	Pulmonalklappenstenose	50 - 62
	Hypertrophe (obstruktive) Kardiomyopathie [H(O)CM]	20
	Vorhofseptumdefekt (ASD)	6 - 10
	Ventrikelseptumdefekt (VSD)	5
	offener Ductus arteriosus (Botalli)	3
	auffälliges EKG: breiter QRS-Komplex große Q-Wellen überdrehter Linkstyp	62
<b>Entwicklung</b>	postnatale Fütterungsprobleme und Gedeihstörung	63
<b>Skelettanomalien</b>	Pectus carinatum/excavatum	70 - 95
	thorakale Skoliose	15
	Cubitus valgus	50
	radioulnäre Synostose	2
	Klino- oder Brachydaktylie	30
	Gelenkhyperextensibilität	50
	Talipes equinovarus	10-15
<b>Geschlechtsorgane</b>	Kryptorchismus	77
<b>Harntrakt</b>	Nierenbecken-Harnleiterstenose und/oder Hydronephrose	10
<b>Hämorrhagie</b>	leichte Blutgerinnungsstörung	55
	starke Blutgerinnungsstörung	3
<b>Lymphgefäße</b>	dysplastisch, hypoplastisch oder aplastisch	20
<b>Pigmentierung</b>	pigmentierte Naevi	25
	Café-au-lait-Flecken	10
	Lentigines	3
	Ulerythema Ophryogenes	14

**Tab. 1: Die klinischen Charakteristika des Noonan-Syndroms (van der Burgt 2007).** In der Tabelle sind die klinischen Merkmale des Noonan-Syndroms nach Organsystem sortiert und ihre prozentuale Häufigkeit bei Erkrankung des jeweiligen Organsystems bei Noonan-Syndrom-Patienten angegeben.

## II. Einleitung

Organsystem	Klinisches Merkmal	Anteil in %
<b>Behaarung</b>	dickes, lockiges Haar	30
	dünnes, spärliches Haar	10
<b>Augen</b>	Strabismus	48 - 63
	Brechungsfehler	61
	Amblyopie	33
	Veränderungen im anterioren Segment	63
	Nystagmus	10
<b>Ohren</b>	Hörverlust aufgrund einer Otitis media	15 - 40
	sensorineurale Schwerhörigkeit niedrige Frequenzen	10
	sensorineurale Schwerhörigkeit hohe Frequenzen	25
<b>Andere</b>	mentale Retardierung (oftmals mild)	15 - 35
	Artikulationsprobleme	72
	Hepatosplenomegalie (meist als Säugling)	26 - 51
	akute Leukämie und myoproliferative Störung (MPD)	

**Fortsetzung Tab. 1: Die klinischen Charakteristika des Noonan-Syndroms (van der Burgt 2007).** In der Tabelle sind die klinischen Merkmale des Noonan-Syndroms nach Organsystem sortiert und ihre prozentuale Häufigkeit bei Erkrankung des jeweiligen Organsystems bei Noonan-Syndrom-Patienten angegeben.

Um die klinische Diagnose für das Noonan-Syndrom zu vereinheitlichen, wurden diverse Scoring-Systeme beschrieben (Duncan et al. 1981, Preus et al. 1984, Sharland et al. 1992), unter anderem von van der Burgt (2007):

Lokalisation	A = Hauptmerkmal	B = Nebenmerkmal
Gesicht	typische faziale Dysmorphien	angedeutete faziale Dysmorphie
Herz	Pulmonalklappenstenose, HOCM und/oder typisches EKG	sonstige Herzfehler
Größe	<P3	<P10
Brustkorb	Pectus excavatum / carinatum	breit angelegter Thorax
Familienanamnese	Verwandter 1. Grades mit Noonan-Syndrom	Verwandter 1. Grades mit nicht eindeutigen Noonan-Syndrom
Sonstige	mentale Retardierung, Kryptorchismus und lymphatische Dysplasie	mentale Retardierung, Kryptorchismus oder lymphatische Dysplasie

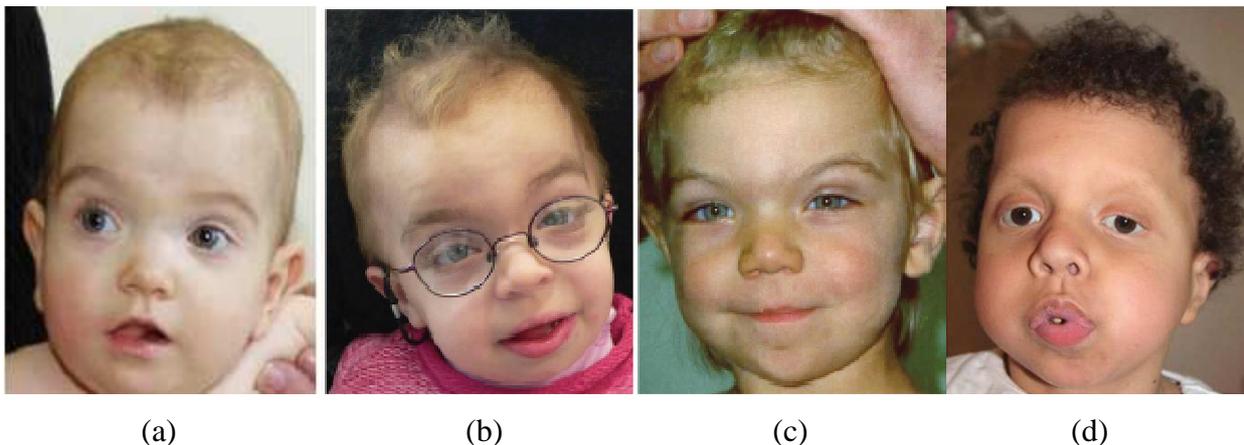
**Tab. 2: Scoring-System für das Noonan-Syndrom (van der Burgt 2007).** Beim Vorliegen von mindestens zwei Hauptmerkmalen, einem Hauptmerkmal in Kombination mit zwei Nebenmerkmalen oder vier Nebenmerkmalen gilt die Diagnose Noonan-Syndrom als gesichert. Die Abkürzungen P3 (3. Perzentile) und P10 (10. Perzentile) stehen für die entsprechenden Perzentilkurven der Körpergrößen von Männern und Frauen.

## II. Einleitung

So eindeutig der Phänotyp des Noonan-Syndroms auf den ersten Blick erscheint, es darf nicht außer Acht gelassen werden, dass andere Erkrankungen mit ähnlichem klinischen Bild existieren, die eine Diagnose erschweren.

### **1.2 Die Gruppe der „RASopathien“**

Das Noonan-Syndrom gehört zur Gruppe der sog. „RASopathien“ (auch bekannt als Neurokardio-fazio-kutane Syndrome, NCFC-Syndrome) und zeigt teilweise phänotypische Überschneiden mit den Erkrankungen aus dieser Gruppe, wie dem kardio-fazio-kutanen Syndrom (*cardio-facio-cutaneous syndrome*, CFC-Syndrom), dem Costello-Syndrom (CS), dem LEOPARD-Syndrom, der Neurofibromatose Typ 1 (NF1) und dem Legius-Syndrom (Mautner et al. 2010). Die begriffliche Zusammenfassung oben genannter Erkrankungen als RASopathien ist der Tatsache geschuldet, dass die genannten Erkrankungen mit Mutationen in Genen assoziiert sind, die für Proteine des RAS-MAPK-Signalwegs (*Rat sarcoma-Mitogen-activated protein kinase*) kodieren (Mautner et al. 2010) (Abb. 3, folgendes Kapitel).



**Abb. 2: Fazies von Patienten mit Erkrankungen aus dem Spektrum der NCFC-Syndrome.**

Patient mit Noonan-Syndrom (a), Patientin mit Costello-Syndrom (b), Patientin mit Neurofibromatose Typ 1 (c), Patient mit CFC-Syndrom (d); Fotos (a), (b), (c) und (d) aus Mautner et al. 2010.

Die phänotypischen Überschneidungen zwischen dem CFC-Syndrom und dem Noonan-Syndrom liegen in den fazialen Dysmorphien, wie z. B. einem flachen Nasenrücken, niedrig ansetzenden und nach dorsal rotierten Ohren, Hypertelorismus und Ptosis (Roberts et al. 2006). Weitere Gemeinsamkeiten sind Kleinwuchs und angeborene Herzdefekte (v. a. Pulmonalklappenstenosen und Atriumseptumdefekte). Klinisch abgrenzbar ist das CFC-Syndrom durch das Auftreten einer Makrozephalie, einer ausgeprägten mentalen Retardierung und das häufige Vorkommen ektodermaler Anomalien, wie z. B. hyperkeratinisierter Haut,

## II. Einleitung

dünnem, lockigem und sprödem Haupthaar sowie fehlenden Augenbrauen und Wimpern (Roberts et al. 2006, Jorge et al. 2009) (siehe Abb. 2).

Das Costello-Syndrom und das Noonan-Syndrom überschneiden sich phänotypisch in den charakteristischen fazialen Dysmorphien, wie einem flachen Nasenrücken und niedrig ansetzenden, nach dorsal rotierten Ohren, und in verschiedenen muskuloskelettalen Anomalien wie Kleinwuchs, einer Trichterbrust (Costello 1996, Davies und Hughes 1994, Izumikawa et al. 1993) und einer Skoliose (Stevenson et al. 2011). Weiterhin treten bei beiden kongenitale Herzfehler, vor allem Pulmonalklappenstenosen (Lin et al. 2002, Pratesi et al. 1998) und Ventrikelseptumdefekte (Teebi und Shaabani 1993, Di Rocco et al. 1993, Kondo et al. 1993, Siwik et al. 1998), und Kryptorchismus bei männlichen Erkrankten auf. Im Gegensatz zu Patienten mit Noonan-Syndrom zeigen Patienten mit Costello-Syndrom weiche, redundante und stark gefaltete Haut an Händen und Füßen (Hennekam 2003, Rauen 2013, Patton und Baraitser 1993, Teebi und Shaabani 1993), eine ausgeprägte mentale Retardierung (Hennekam 2003, Jorge et al. 2009), faziale Papillomata, spärliches, lockiges Haupthaar und ein erhöhtes Risiko für eine maligne Krebserkrankung, unter anderem dem Rhabdomyosarkom (Pratesi et al. 1998, Gripp et al. 2002, Jorge et al. 2009). Obwohl sich die fazialen Dysmorphien bei beiden Erkrankungen ähneln, weisen grobe Gesichtszüge und ein Makrozephalus auf das Costello-Syndrom hin (Teebi und Shaabani 1993) (siehe Abb. 2).

Der Begriff LEOPARD-Syndrom ist ein Akronym für *multiple lentigines, electrocardiographic conduction abnormalities, ocular hypertelorism, pulmonic stenosis, abnormal genitalia, retardation of growth and sensorineural deafness*. Kleinkinder mit LEOPARD-Syndrom sind auf Grund der kongenitalen Herzdefekte und fazialen Dysmorphien fast ununterscheidbar von Gleichaltrigen mit dem Noonan-Syndrom, da die LEOPARD-Syndrom-charakteristischen Lentigines und die typische sensorineurale Schwerhörigkeit erst später auftreten. Weitere Gemeinsamkeiten sind Kleinwuchs, Thoraxdeformationen und Kryptorchismus bei männlichen Erkrankten (Tong et al. 2001, Digilio et al. 2006, Sarkozy et al. 2008, Tartaglia et al. 2011).

Auch Patienten mit Neurofibromatose Typ 1 weisen Noonan-Syndrom-ähnliche faziale Dysmorphien, eine relative Kleinwüchsigkeit und Herzfehler aus dem Spektrum des Noonan-Syndroms auf. Die charakteristischen, differentialdiagnostisch relevanten klinischen Merkmale der Neurofibromatose Typ 1 sind sog. „Café-au-lait“-Flecken und das Auftreten gutartiger Hauttumoren, den Neurofibromen (Friedman 2002, von Deimling et al. 1995) (siehe Abb. 2).

## II. Einleitung

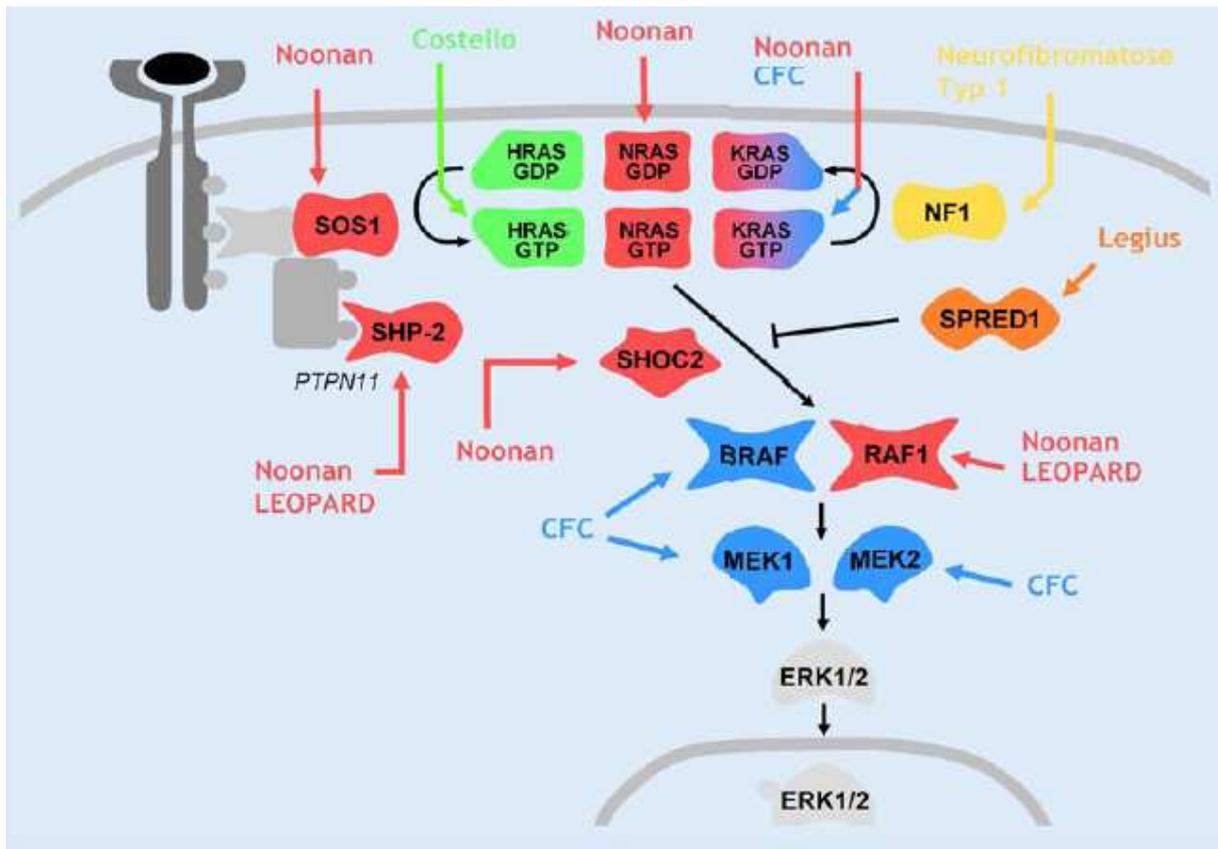
Das Krankheitsbild beim Legius-Syndrom (früher *NFI-like*-Syndrom) ist durch multiple Café-au-lait-Flecken, axilläres Freckling, Makrozephalie und eine an das Noonan-Syndrom erinnernde Fazies gekennzeichnet. Einige Patienten weisen Lernschwierigkeiten auf (Messiaen et al. 2009, Tartaglia et al. 2011).

## **2. Genetik des Noonan-Syndroms**

Das Noonan-Syndrom ist eine genetisch heterogene Erkrankung mit einem autosomal-dominanten Erbgang, wobei in über 50% der Fälle Neumutationen auftreten (Mautner et al. 2010). Derzeit können in etwa 75% der Fälle mit Noonan-Syndrom krankheitsverursachende Mutationen in den Genen *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *NRAS* und *RIT1* identifiziert werden (Tartaglia et al. 2001, Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007, Razzaque et al. 2007, Pandit et al. 2007, Schubbert et al. 2006, Cirstea et al. 2009, Tartaglia et al. 2011, Aoki et al. 2013). Zudem werden Mutationen in *SHOC2* und *CBL* mit Noonan-Syndrom-ähnlichen Phänotypen assoziiert (Cordeddu et al. 2009, Martinelli et al. 2010). Alle acht Gene kodieren für Proteine der RAS-MAPK-Signalwege, die eine Vielzahl zellulärer Prozesse, wie Zellwachstum und -differenzierung, sowie Mitose, Organogenese und Seneszenz regulieren (Tidyman und Rauen 2009, Tartaglia et al. 2011). Dysregulationen dieser Signalwege sind seit Langem aus Krebserkrankungen, im Besonderen Leukämien, bekannt (Niemeyer und Kratz 2003, Tartaglia et al. 2005). Seit der Aufklärung der genetischen Ursachen der RASopathien weiß man, dass Dysregulierungen in diesen Signalkaskaden auch zu grundlegenden Entwicklungsstörungen führen können. Die große Mehrheit der Noonan-Syndrom-assoziierten Mutationen führt zu einer Verstärkung der Signaltransduktion in den RAS-MAPK-Kaskaden (Mautner et al. 2010) (Abb. 3).

Abb. 3 zeigt den Zusammenhang zwischen dem RAS-MAPK-Signalweg und den RASopathien (Abbildung aus Mautner et al. 2010).

## II. Einleitung



**Abb. 3: RASopathien (NCFC-Syndrome) und ihre Assoziation mit dem RAS-MAPK-Signalweg.**

Mutationen in *PTPN11* (kodiert für SHP-2), *SOS1*, *RAF1*, *NRAS* oder *SHOC2* (rote Symbole) sind mit Noonan-Syndrom assoziiert, während spezifische Mutationen in *PTPN11* bzw. *RAF1* das LEOPARD-Syndrom verursachen. Keimbahnmutationen in *BRAF*, *MAP2K1* (*MEK1*), *MAP2K2* (*MEK2*) oder *KRAS* (blaue Symbole) führen zum CFC-Syndrom und Mutationen im *HRAS*-Gen (grüne Symbole) führen zum Costello-Syndrom. Schließlich sind Funktionsverlustmutationen im *NF1*-Gen für Neurofibromatose Typ 1 (gelbes Symbol) verantwortlich und *SPRED1*-Mutationen (orangefarbenes Symbol) wurden bei Patienten mit Legius-Syndrom beschrieben (Mautner et al. 2010).

50% der Noonan-Syndrom-Patienten weisen eine Mutation im *PTPN11*-Gen auf (Tartaglia et al. 2001). *PTPN11* kodiert für SHP-2, eine *Src-homology 2* enthaltende Protein-Tyrosin-Phosphatase (PTP). PTPs steuern eine Vielzahl zellulärer Prozesse einschließlich Zellwachstum und -differenzierung sowie Mitose und onkogene Transformationen. Darüber hinaus sind Mutationen des *PTPN11*-Gens die Ursache für 34% der JMML-Fälle, die nicht mit einem Syndrom assoziiert sind (Tartaglia et al. 2003).

Bei 10% der Noonan-Syndrom-Patienten wird eine Mutation im *SOS1*-Gen identifiziert (Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007, Tartaglia et al. 2011). Das kodierte Protein ist ein RAS-spezifischer Guanin-Nukleotid-Austauschfaktor (RAS-GEF), der die Konversion von inaktivem RAS-GDP zu aktivem RAS-GTP katalysiert. Die Noonan-Syndrom-assoziierten Mutationen des *SOS1*-Gens verstärken die RAS- und ERK-Aktivierung (Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007).

## II. Einleitung

Ein mutiertes *RAF1*-Gen wird mit 5-15% der Noonan-Syndrom-Fälle in Verbindung gebracht (Razzaque et al. 2007, Pandit et al. 2007, Tartaglia et al. 2011). *RAF1* ist das zelluläre Homolog zum viralen Gen *v-raf*. Das kodierte Protein ist eine Kinase, welche nachgeschaltet zu den RAS-Proteinen, an die es direkt bindet, einen Platz in der RAS-MAPK-Kaskade einnimmt. Im aktiven Zustand phosphoryliert und aktiviert das RAF1-Protein die dual-spezifischen Proteinkinasen MEK1 und MEK2, die ihrerseits die Serin-/Threonin-spezifischen Kinasen ERK1 und ERK2 phosphorylieren und aktivieren. Diese sind pleiotropische Regulatoren der Zellphysiologie und spielen eine wichtige Rolle bei der Genexpression bezüglich der Zellteilung, der Apoptose, der Zelldifferenzierung, der Zellmigration (Wellbrock et al. 2004) etc.

Etwa 2% der Patienten mit Noonan-Syndrom tragen eine Mutation im *KRAS*-Gen (Schubbert et al. 2006) und nur sehr wenige Fälle sind bekannt mit Mutationen im *NRAS*-Gen (Cirstea et al. 2009). *KRAS* ist das Akronym für *Kirsten rat sarcoma viral oncogene* und *NRAS* für *Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene*. Mutationen in *KRAS* und *NRAS* werden darüber hinaus mit JMML assoziiert (Lachenaud et al. 2014, Flotho et al. 1999). Die RAS-Proteine sind monomere GTPasen, die je nach gebundenem Nukleotid – GDP (Guanosin-Diphosphat) oder GTP (Guanosin-Triphosphat) – in inaktiver bzw. aktiver Form vorliegen. Durch Abspaltung des gamma-Phosphats von gebundenem GTP kommt es zur Inaktivierung von RAS (Goldfinger 2008, Kratz et al. 2007). Die Guanosin-Triphosphatase-Aktivität (GTPase-Aktivität) von RAS ist bei Noonan-Syndrom-Patienten mit Mutationen in einem *RAS*-Gen erheblich herabgesetzt (Kratz et al. 2007, Cirstea et al. 2009).

Erst kürzlich wurden bei Patienten mit dem Noonan-Syndrom Mutationen im *RIT1*-Gen identifiziert (Aoki et al. 2013). *RIT1* trägt zur Aktivierung von ELK1 über die RAS-MAPK-Signalwege bei (Shi und Andreas 2005, Aoki et al. 2013).

Neben dem klassischen Noonan-Syndrom existieren noch dem Noonan-Syndrom ähnliche Erkrankungen, beispielsweise ein Noonan-Syndrom-ähnlicher Phänotyp mit lockerem Anagenhaar (NS/LAH, *Noonan-like syndrome with loose anagen hair*), der durch eine bestimmte *missense*-Mutation im *SHOC2*-Gen verursacht wird. Bei den NS/LAH-Patienten findet man den Basenaustausch 4A>G im *SHOC2*-Gen (p.S2G) (Cordeddu et al. 2009). Schon lange ist bekannt, dass auch *SHOC2* die RAS-MAPK-Signaltransduktion positiv moduliert (Sieburth et al. 1998, Selfors et al. 1998).

Ein weiterer Noonan-Syndrom-ähnlicher Phänotyp wird durch heterozygote Keimbahnmutationen im *CBL*-Gen verursacht (Martinelli et al. 2010). *CBL* reguliert den Vesikelbasierten Transport von Wachstumsfaktorrezeptoren und greift so in Wachstumsfaktor-ab-

## II. Einleitung

hängiges RAS-MAPK-Signaling ein.

### **3. Strategien zur Auswahl der Kandidatengene**

Ein großer Teilbereich der Humangenetik umfasst die Identifizierung von menschlichen Krankheitsgenen. Für etwa 4174 Mendel'sche Erkrankungen konnte bereits die genetische Ursache entschlüsselt werden. Dagegen wurde der zugrundeliegende molekulare Defekt von ca. 1693 Erkrankungen mit Mendel'schem Erbgang noch nicht identifiziert, ebenso wie von ca. 1851 Erkrankungen mit putativer Mendel'scher Vererbung (*OMIM*, Stand 12. August 2014).

Es existieren verschiedene Herangehensweisen, um ein neues Krankheitsgen für eine gegebene Erkrankung zu identifizieren. Beim sogenannten Kandidatengen-Ansatz wählt man solche Kandidatengene, die bei Mutation das Auftreten der vorliegenden Erkrankung erklären könnten. Man kann sich z. B. die Tatsache zu Nutzen machen, dass Mutationen in ein und demselben Gen zu verschiedenen Erkrankungen mit jedoch einigen klinischen Gemeinsamkeiten führen können. Das heißt also, die molekulargenetische Analyse eines bereits bekannten Krankheitsgens kann zur Identifizierung dieses Gens als Krankheitsgen für eine noch ungeklärte genetische Erkrankung führen. Patienten mit Noonan-Syndrom haben ein erhöhtes Risiko an Leukämie, vor allem JMML, zu erkranken (Tartaglia et al. 2003, Mautner et al. 2010). Konstitutionelle Mutationen in den Genen *PTPN11*, *KRAS* und *NRAS* verursachen etwa 52% der Fälle von Noonan-Syndrom (Tartaglia et al. 2001, Cirstea et al. 2009, Schubbert et al. 2006), jedoch findet man Mutationen in diesen drei Genen auch bei etwa 51% der Fälle von JMML (Flotho et al. 1999, Tartaglia et al. 2003). Dies brachte uns zur Annahme, dass Mutationen weiterer Leukämie-assoziiierter Gene ebenfalls das Noonan-Syndrom verursachen könnten. Daher wählten wir mit Hilfe einer Datenbank [([www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/](http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/)) (COSMIC)] geeignete Kandidatengene aus. In der COSMIC-Datenbank sind detaillierte Informationen zu somatischen Mutationen bei Krebserkrankungen gespeichert. Wir haben in dieser Datenbank nach den am häufigsten mit Leukämie assoziierten Genen gesucht und so die drei Gene *KIT*, *FLT3* und *JAK2* als Kandidatengene für das Noonan-Syndrom postuliert.

Das *KIT*-Gen (*v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog*) kodiert für ein Transmembranglykoprotein, ein Mitglied der Typ-III Rezeptor-Tyrosinkinase (Typ-III RTK), dessen Ligand der Stammzellfaktor (*stem cell factor*, SCF) ist. Bindet SCF an KIT, führt dies zur Dimerisierung und Transphosphorylierung von KIT, was wiederum zur

## II. Einleitung

Aktivierung der nachgeschalteten RAS-abhängigen Signalwege führt, die dann vor allem die Proliferation, Differenzierung, Migration und das Überleben von Blutstammzellen regulieren (Renneville et al. 2008, Liang et al. 2013). Bei 20-30% der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) wird ein mutiertes *KIT*-Gen entdeckt (Fröhling et al. 2005, Renneville et al. 2008).

Das *FLT3*-Gen (*FMS-like tyrosine kinase 3*) kodiert ebenfalls für eine Typ-III RTK, die nach Aktivierung mehrere zytoplasmatische Effektoren der RAS-abhängigen Signalwege für Apoptose, Proliferation und Differenzierung hämatopoetischer Zellen beeinflusst. Mutationen, die eine übermäßige Aktivierung dieses Rezeptors bewirken, führen zu hämatopoetischen Malignitäten (Birg et al. 1994), wie akuter myeloischer Leukämie (AML) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL). Bei ungefähr 25-45% der Patienten mit AML ist eine Mutation im *FLT3*-Gen zu finden (Mattison et al. 2007, Renneville et al. 2008, Sanz et al. 2009).

Das *JAK2*-Gen kodiert für die JAK2-Nichtrezeptor-Tyrosinkinase, welche den RAS-MAPK-Signalweg aktiviert und u. a. das Zellwachstum reguliert (Rane und Reddy 2000). Im Jahr 2005 wurde die p.V617F-Mutation im *JAK2* beschrieben, die zu einer konstitutiven JAK2-Aktivierung und damit einer verstärkten Zellproliferation führt. Daten von fünf Arbeitsgruppen zeigten, dass es auf Grund dieser Mutation zu folgenden myeloproliferativen Erkrankungen kommt: 77% (335/434) der Fälle von Polycythaemia vera, 35% (96/280) der Fälle von essentieller Thrombozythämie und 43% (40/92) der Fälle der idiopathischen Myelofibrose (Baxter et al. 2005, Zhao et al. 2005, Kralovics et al. 2005, Levine et al. 2005, James et al. 2005b).

Mehrere wissenschaftliche Arbeiten haben in den letzten Jahren auf den konstitutiv aktivierten PI3K/AKT-Signalweg bei der AML aufmerksam gemacht (Min et al. 2003, Xu et al. 2003, Kubota et al. 2004, Zhao et al. 2004, Grandage et al. 2005). Die PI3K (*Phosphoinositid-3-kinase*) gehört zu den Lipidkinasen und reguliert zelluläre Schlüsselfunktionen, wie Zellwachstum, -proliferation, -migration, -differenzierung und -adhäsion. Da das für eine katalytische Einheit der PI3-Kinase kodierende *PIK3CA*-Gen (*Phosphoinositid-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide*) mit erhöhter Frequenz in diversen menschlichen Malignitäten mutiert ist (Samuels und Velculescu 2004, Saal et al. 2005), dient es dieser Arbeit auch als Kandidatengen.

Eine weitere Möglichkeit der Auswahl von Kandidatengenen für eine erbliche Erkrankung liegt im Vergleich mit Tiermodellen mit einem zur humanen Erkrankung analogen Phänotyp. So kann man Gene, die bei Mutation in z. B. der Maus einen bestimmten Phänotyp

## II. Einleitung

verursachen, als Kandidatengene beim Menschen mit einem entsprechenden Phänotyp postulieren (Strachan und Read 2005). Mittels dieser Strategie wurde das *PTPN11*-Gen, welches bereits früher mit Herzdefekten bei Mäusen assoziiert wurde (Chen et al. 2000), als Krankheitsgen für das Noonan-Syndrom identifiziert (Tartaglia et al. 2001).

Auch in dieser Arbeit wurden unter Verwendung der gleichen Strategie die Gene *CAV1* und *CAV2* als Kandidatengene für das Noonan-Syndrom ermittelt. Die Genprodukte *CAV1* und *CAV2* sind Negativregulatoren der RAS-MAPK-Signalwege (Williams et al. 2004, Burgermeister et al. 2011, Treff et al. 2004, Wang et al. 2004) und Caveoline spielen eine Rolle bei der kardiovaskulären Funktion (Panneerselvam et al. 2012). Bei Mäusen führt die Deletion des *Cav1*-Gens zu Herzfehlern, u. a. einer Herzhypertrophie oder einer dilatativen Kardiomyopathie (Hnasko und Lisanti 2003, Zhao et al. 2003, Cohen et al. 2003). In vielen Geweben, in denen das *CAV1* exprimiert wird, findet man auch das paraloge *CAV2* (Razani et al. 2002). *CAV1* und *CAV2* sind zellphysiologisch an der Regulation von Lipidstoffwechsel, Zellwachstum und Apoptose beteiligt (Sowa 2011, Williams und Lisanti 2004, Boscher und Nabi 2012, Razani et al. 2002, Le Lay et al. 2006, Lee et al. 2011, Ikezu et al. 1998).

Schließlich besteht die Möglichkeit sogenannte funktionelle Kandidatengene auszuwählen, indem man die zelluläre Funktion der kodierten Proteine berücksichtigt: Liegt ein Protein in einem Signalweg, in welchem sich Proteine befinden, die von bereits bekannten Krankheitsgenen für eine vorliegende Erkrankung kodiert werden, so kann dies ein Hinweis auf ein gutes Kandidatengen sein (Strachan und Read 2005). Diese Strategie wurde unter anderem erfolgreich zur Identifizierung von *SOS1* als Krankheitsgen für das Noonan-Syndrom angewandt (Roberts et al. 2007). Mittels dieser Strategie postulieren wir in dieser Arbeit *SPRED1* als funktionelles Kandidatengen für das Noonan-Syndrom. Das von *SPRED1* kodierte Protein gehört zu einer Familie Membran-assoziiertes Proteine, welche nach Stimulation mit verschiedenen Wachstumsfaktoren phosphoryliert werden und über eine Interaktion mit RAF-Kinasen die RAS-MAPK-Signalwege negativ regulieren können (Brems und Legius 2013). Somit spielt *SPRED1* eine wichtige Rolle in einer Vielfalt zellulärer Mechanismen. Ein Funktionsverlust von *SPRED1* könnte zur konstitutiven Aktivierung des RAS-MAPK-Signalwegs führen. Tatsächlich führen *loss-of-function*-Mutationen im *SPRED1*-Gen zum Legius-Syndrom (*NF1-like syndrome*), einem Vertreter der RASopathien (Brems et al. 2007). Als zwei weitere funktionelle Kandidatengene für das Noonan-Syndrom gelten für uns *FRS2* und *FRS3* (*fibroblast growth factor receptor substrate 2* und *3*). Diese kodieren für Substrate von Wachstumsfaktor-Rezeptoren, die nach Aktivierung und

## II. Einleitung

Phosphorylierung an SHP-2 (*PTPN11*) und GRB2 binden und die RAS-MAPK-Signalkaskade stimulieren (Hadari et al. 1998, Ong et al. 2000).

Zusammengefasst stellen die in diesem Kapitel beschriebenen Gene vielversprechende Kandidatengene für das Noonan-Syndrom dar und sollen deshalb in einem Kollektiv aus mutationsnegativen Patienten mit Noonan-Syndrom analysiert werden.

### III. Material und Methoden

#### 1. Material

##### 1.1 Patientenbeschreibung

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv besteht aus 35 Patienten mit phänotypischen Charakteristika des Noonan-Syndroms. Über Kontakte zu klinischen Genetikern in der ganzen Welt konnten Patienten-DNAs asserviert werden. Allein Prof. Dr. Martin Zenker stellte für diese Arbeit 13 Patienten-DNAs zur Verfügung. Alle Patienten bzw. deren Eltern wurden über Art und Ziel der Studie aufgeklärt und nahmen freiwillig an der Untersuchung teil. Die verwendete genomische DNA wurde aus lymphoblastoiden Zelllinien und/oder EDTA-Blut der Patienten gewonnen.

Lediglich 27 der 35 Patienten waren klinisch beschrieben und sind daher in der nachfolgenden „Tab. 3: Übersicht der klinischen Merkmale von 27 Patienten mit Noonan-Syndrom“ aufgeführt.

Klinische Charakteristika \ Patient	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15
Kryptorchismus	+	n. d.	n. d.	x	n. d.	-	x	-	n. d.	+	+	x	-	+
Brustkorbanomalien	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	+	n. d.	n. d.	-	+	n. d.	n. d.	+	-	n. d.
Andere Herzdefekte	n. d.	n. d.	+	n. d.	n. d.	+	+	-	+	+	+	n. d.	n. d.	+
Pulmonalklappenstenose	n. d.	n. d.	n. d.	+	n. d.	-	+	+	+	-	-	+	n. d.	+
Flache/r Nasenwurzel/-rücken	n. d.	+	n. d.	n. d.	+	n. d.	+	+	+	+	+	+	+	+
Tief ansetzende, dorsal rotierte Ohren	+	+	n. d.	n. d.	+	-	n. d.	+	+	-	+	+	+	n. d.
Ptoxis	n. d.	+	n. d.	n. d.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	n. d.
Hypertelorismus	n. d.	+	n. d.	n. d.	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Epikanthus	n. d.	+	n. d.	n. d.	+	+	+	+	+	+	n. d.	n. d.	-	n. d.
Lidachse von medial nach lateral abfallend	+	+	n. d.	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+
Mentale Retardierung	n. d.	+	+	n. d.	n. d.	+	n. d.	+	+	+	+	-	+	n. d.
Kleinwuchs	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	+	n. d.	n. d.	+	+	n. d.	n. d.	+	+	n. d.
Sprachentwicklung verzögert	n. d.	n. d.	+	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	+	n. d.	+	-	-	+	n. d.
Postnatale Gedeihstörung	n. d.	n. d.	n. d.	n. d.	+	+	n. d.	+	n. d.	+	n. d.	n. d.	+	+
Geburtsgröße Normbereich	+	n. d.	n. d.	n. d.	-	+	+	+	-	+	n. d.	n. d.	-	+

**Tab. 3: Übersicht der klinischen Merkmale von 27 Patienten mit Noonan-Syndrom.** Die Patientenziffern in der obersten Zeile dienen der Zuordnung der Patienten zum aus 35 Patienten bestehenden Kollektiv, wobei die Zahlen willkürlich verteilt wurden. Folgende Zeichen und Abkürzungen werden verwendet: +, entsprechendes Merkmal ist beim Patienten vorhanden; -, entsprechendes Merkmal ist beim Patienten nicht vorhanden; x, Geschlecht lässt das entsprechende Merkmal nicht zu; n. d., nicht dokumentiert.

### III. Material und Methoden

Klinische Charakteristika \ Patient	16	20	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31
Kryptorchismus	+	-	+	n. d.	x	-	+	+	x	x	x	x	x
Brustkorbanomalien	+	+	-	n. d.	-	+	-	+	-	+	-	+	+
Andere Herzdefekte	+	+	+	n. d.	-	+	-	+	-	-	+	-	-
Pulmonalklappenstenose	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
Flache/r Nasenwurzel/-rücken	+	+	+	+	n. d.								
Tief ansetzende, dorsal rotierte Ohren	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Ptoxis	+	+	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-
Hypertelorismus	-	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-	+	+
Epikanthus	-	+	+	+	n. d.								
Lidachse von medial nach lateral abfallend	-	+	+	+	-	+	+	-	+	+	-	-	+
Mentale Retardierung	+	n. d.	+	n. d.	+	+	-	n. d.	+	+	+	+	-
Kleinwuchs	-	n. d.	+	n. d.	+	-	-	-	+	+	+	-	+
Sprachentwicklung verzögert	+	n. d.											
Postnatale Gedeihstörung	+	n. d.	+	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
Geburtsgröße Normbereich	+	+	n. d.	+	n. d.								

**Fortsetzung Tab. 3: Übersicht der klinischen Merkmale von 27 Patienten mit Noonan-Syndrom.** Die Patientenziffern in der obersten Zeile dienen der Zuordnung der Patienten zum aus 35 Patienten bestehenden Kollektiv, wobei die Zahlen willkürlich verteilt wurden. Folgende Zeichen und Abkürzungen werden verwendet: +, entsprechendes Merkmal ist beim Patienten vorhanden; -, entsprechendes Merkmal ist beim Patienten nicht vorhanden; x, Geschlecht lässt das entsprechende Merkmal nicht zu; n. d., nicht dokumentiert.

#### 1.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Agarose (Ultra Pure Agarose)	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid 30% (mit 0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Merck, Darmstadt
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Wasser für Chromatographie (HPLC)	Merck, Darmstadt

#### 1.3 Kits

<i>ExoSAP-IT</i> <sup>®</sup>	USB Corporation (Cleveland, OH)
GenomiPhi <sup>™</sup> DNA Amplification Kit	Amersham Biosciences (Freiburg)
Fail Safe <sup>™</sup> PCR PreMix Selection Kit	Epicenter (Madison, WI, USA)

#### 1.4 Enzyme

BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
<i>Taq</i> -DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe

### III. Material und Methoden

#### 1.5 Längenstandards

DNA-Standard (1000, 100 und 50 bp-Leiter)	Invitrogen (Karlsruhe)
---	------------------------

#### 1.6 Nukleinsäuren

Nukleotidmix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) (je 10 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
--	------------------------

#### 1.7 Puffer, Medien, Lösungen und Zusätze

##### 1.7.1 PCR-Puffer

10x PCR-Puffer Qiagen (Hilden)	15 mM	MgCl <sub>2</sub> Tris-Cl KCl (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> pH 8,7	} [genauere Konzentrationen werden vom Hersteller nicht angegeben]
Fail Safe PCR PreMix A-L Epicenter (Madison, WI, USA)	100 mM 100 mM 400 µM je nach Puffer 3-7 mM je nach Puffer 0-8x	Tris-HCl (pH 8,3) KCl eines jeden dNTPs MgCl <sub>2</sub> Fail Safe PCR-Enhancer mit Betain (Trimethylglycin)	

##### 1.7.2 Puffer und Lösungen für die Agarosegelelektrophorese

10x Ladepuffer für DNA	25 ml 25 ml 20 mg	Glycerin (100%) 1x TBE Orange-G
10x TBE	890 mM 890 mM 20 mM	Tris Borsäure EDTA pH 8,0
Ethidiumbromid	0,05%	(in Aqua dest.)

##### 1.7.3 Allgemeine Puffer

10x TE Puffer	100 mM 10 mM	Tris EDTA pH 8,0 HCl
---------------	-----------------	-------------------------

### III. Material und Methoden

#### 1.8 Gerätschaften

ABI Prism 377 DNA Sequenziergerät	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Digitalkamera	OLYMPUS, Hamburg
Drucker „Digital Graphic Printer“	SONY, Japan
Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
Heizblock (Typ: 52526101)	Liebisch, Bielefeld
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG, Hamburg
Kunststoff-Tubes (Falcon)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
PCR-Cycler “MJ Research PTC 200”	MJ Research, Inc., Watertown, USA
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH, Oldenburg
Pipetten „Finnpipetten“	Thermo Labsystems, Helsinki, Finnland
Spannungsgeber „Power Pac 300“	BioRad, München
Spannungsgeber „Electrophoresis power supply PS3002“	Life Technologies, Karlsruhe
Spannungsgeber “Standard Power Pack P25“	Biometra, Göttingen
Tischzentrifuge „Biofuge Pico“	Heraeus, Hannover
UV-Transilluminator „UVT-28M“	Herolab, Wiesloch
Vortex-Gerät „Vortex Genie 2“	Scientific Industries, INC., Bohemia, New York, USA
Waage “Sartorius ISO 9001”	Sartorius, Göttingen

#### 1.9 Oligonukleotide

In der vorliegenden Arbeit wurden die Oligonukleotide (Primer) manuell oder mit Hilfe des Computerprogramms „Primer 3“ designt. Es wurde versucht, einen GC-Gehalt von ca. 50% zu erhalten, ein Guanin bzw. Cytosin am 3'-Ende der Primersequenz auszuwählen und keinen bekannten SNP (*single nucleotide polymorphism*) in der Primersequenz zu haben, damit eine allelspezifische Amplifikation vermieden wird. Die Spezifität der Primer wurde mit „BLAST“-Analysen der Primersequenz gegen das humane Genom und *in-silico*-PCR-Analysen überprüft. Über die Internetseite von Sigma-Aldrich wurden die Oligonukleotideigenschaften, wie Schmelztemperatur und die Neigung zur Bildung von Sekundärstrukturen und Primer-Dimeren, überprüft und optimiert. Vor Verwendung wurde jeder Primer in 1 x TE gelöst, um eine Konzentration von 100 pmol/μl zu erhalten. Anschließend wurden die Aliquots der Stammlösungen mit HPLC-H<sub>2</sub>O auf 10 pmol/μl verdünnt und dann für die PCR-Amplifikation verwendet. Die für diese Arbeit eingesetzten Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

### III. Material und Methoden

#### 1.9.1 Oligonukleotide für die Mutationsanalyse der Kandidatengene *CAVI*, *CAV2*, *KIT*, *FLT3*, *PIK3CA*, *JAK2*, *SPRED1*, *FRS2* und *FRS3*

Name	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5' → 3'
CAV1_1F CAV1_2F CAV1_3F	GAAACGTTCTCACTCGCTCTCTGC TCCTGCGGGTCCTGCGTGCTGAGCC ATGTCTATGGATACTGAATAGTGG	CAV1_1R CAV1_2R CAV1_3R	CAGGGCAGCAGTCGGGATATTTGG GGCAATGCTAAAGAAGGATGCAC TAGCAACTTGGAAGTTGAAATTGG
CAV2_2F CAV2_3F	GCACGTCTTCCCTCCTGCTTCC CTCTCAACCAAATTTAAGTAAATGG	CAV2_2R CAV2_3R	CTTGGGAAGTATGCGCGTTTCTC AGTTTTCTTAATTAGAACAGCTAGG
KIT_10/11F KIT_12/13F KIT_17F	CAGTTTGGGACTGAGTGGCTGTGG TGAAACTGCACAAATGGTCTTTC AGCAGTCTGAGAAGAAAACAGC	KIT_10/11R KIT_12/13R KIT_17R	ACAAAGGAAGCCACTGGAGTTCC GCAGTTTATAATCTAGCATTGCC AATGTGTGATATCCCTAGACAGG
FLT3_13/14F FLT3_14/15F FLT3_16F FLT3_20F	GTGAGAGATTATAATGAGTTGTCCAC TTCATTATTCTTTCTCTATCTGC ATGCAGATTGACTCTGAGCTGAG CCTACTGAAGTTGAGTCTAGAAG	FLT3_13/14R FLT3_14/15R FLT3_16R FLT3_20R	CAAAGACAAATGGTGAGTACGTGC GAAAAGAGAAGAAGGCATGGGTGG CAAACATCTCTTTGTCTATCAAGC GATGGAAGATTCCCTGAAGCTGC
PIK3CA_9F1 PIK3CA_20F1 JAK2_14F	GTCTTAGATTGGTTCTTTCTGTC TAGCTTTGTCTACGAAAGCCTCTC CATGCTGAAAGTAGGAGAAAGTGC	PIK3CA_9R1 PIK3CA_20R1 JAK2_14R	CCAATAGGTATGGTAAAAACATGC GCTGTTTATGGATTGTGCAATTCC TACTGACACCTAGCTGTGATCC
SPRED1_1F SPRED1_2F SPRED1_3F SPRED1_4F SPRED1_5F SPRED1_6F SPRED1_7F SPRED1_8F1 SPRED1_8F2	GAGGGACTACTTCGCCTCCT GGTACCGTTCTGGGTGAGG AAACACCTTAGTCACCACATGTTA AGCGTTGTATCACCTCAGTTTG TTAATTGCCAGGCAGTCCAG CATTTGAGTTTTGGGAATTGCT GGGGGAAATGATTCTATTTTTATTC TGCTTTCCTCATAGTCCACC AGACGCAGCCTTTCCTCATT	SPRED1_1R SPRED1_2R SPRED1_3R SPRED1_4R SPRED1_5R SPRED1_6R SPRED1_7R SPRED1_8R1 SPRED1_8R2	AGGCAAACCGATCGTTCC AAGTTTCGGATGGGTCTG TGCCTTTAACACAGAAACAGC TGAGGTTTCAAAGCCTGGTC ATGAGGGATGCTCAACCTGT GGGCAGATGGTTTTAACGTC CAGCGTTTAAAGCACATAGGC GGAGCATCCTGACATTTTCC AGTTAGGCATGGCGTGAAAC
FRS2_7F FRS2_8F FRS2_9F	CTGAGTAAAATCAACTAGCTAGTTG CACACATTGGTTGATGAATGAAC GATTTCTGACTCGGTGCGTAGAATG	FRS2_7R FRS2_8R FRS2_9R	GAAAGTTTGGTGATAAAAGCCAG CTATATCTTTCCTTAAACAATCTG CTTCTGTTATCCAGTGGTGATTC
FRS3_3F FRS3_4F FRS3_5F	CACAGTCTCTGGACAGAGTAGGTG CATTAGTAGAGTCTGTGATAGTC CTGGGACTGGAGTTGAGGGACATTC	FRS3_3R FRS3_4R FRS3_5R	GAGCCATGAAAACAGCAGTGGTCTG CACACTCTACTGCCACAGGTGATG GAAGGTTGCCTCACCAGCCTTCTC

## 2. Molekularbiologische Methoden

### 2.1 Amplifikation von genomischer DNA

Da von einigen Patienten nur noch geringe Mengen an DNA-Proben vorhanden waren, wurde in diesen Fällen die DNA-Menge mittels *whole genome amplification* (WGA)-Reaktion und dem eigens dafür gedachten *GenomiPhi<sup>TM</sup> DNA Amplification Kit* erhöht. Die WGA-Reaktion wurde nach den Angaben des Herstellers im *PTC-200 Thermocycler* durchgeführt. Zuerst wurde 1 µl (>1 ng/µl) der zu vervielfältigenden DNA bei 95°C für 3 min in 9 µl eines speziellen Puffers (exakte Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben) denaturiert, um einzelsträngige DNA zu erzeugen. Im Anschluss für mehr als eine Minute auf Eis inkubiert,

### III. Material und Methoden

danach 1 µl der *Phi29*-DNA-Polymerase und 9 µl eines Reaktionspuffers (genaue Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben) hinzugegeben und das Ganze für 90 min bei 30°C amplifiziert. Zuletzt musste die Polymerase nur noch bei 65°C für 10 min inaktiviert werden. Die *Phi29*-DNA-Polymerase bietet zwei Vorteile: Erstens ist die Prozessivität sehr hoch und zweitens eine *strand displacement*-Aktivität, die es ermöglicht, dass im Verlauf der Reaktion neusynthetisierte Einzelstränge als Matrize verwendet werden können. Daraus resultiert eine potenzierte Amplifikation der Ausgangs-DNA (Dean et al. 2001, Hosono et al. 2003) und es ist so möglich, mit einer Menge von 10 ng an DNA 4–7 µg DNA zu erzeugen.

#### **2.1.1 Reaktionsschritte und -bedingungen für die Amplifikation von genomischer DNA**

1. Hitzedenaturierung	- 1 µl Ausgangs-DNA mischen mit 9 µl „Sample Puffer“ - 3 min Inkubation bei 95°C - sofort abkühlen auf Eis
2. Vorbereitung der Amplifikationsreaktion	- auf Eis 9 µl Reaktions-Puffer mit 1 µl <i>Phi29</i> -DNA-Polymerase mischen - das Gemisch zur gekühlten Probe geben - 90 min Inkubation bei 30°C
3. Hitzeinaktivierung	- 10 min Inkubation bei 65°C und Lagerung bei 4°C

#### **2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)**

Bei der Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) werden DNA-Fragmente selektiv amplifiziert. Die PCR stellt ein *in-vitro*-Verfahren dar, für das man hitzestabile DNA-Polymerasen sowie zwei Primer benötigt, die zu je einem Abschnitt der DNA revers komplementär sind (Mullis und Faloona 1987).

Üblicherweise kamen für einen PCR-Ansatz 100 ng DNA (Matrize), je 5 pmol der beiden Primer, 0,5 µl Desoxynukleotide (2,5 mM je Nukleotid) und 0,1 µl (5 U/µl) *Taq*-Polymerase, die aus *Thermus aquaticus* isoliert wurde, zur Verwendung. Zudem wurden 2,5 µl 10x PCR-Puffer und 19,9 µl HPLC-H<sub>2</sub>O beigemischt, so dass ein Reaktionsvolumen von ungefähr 25 µl entstand.

### III. Material und Methoden

#### 2.2.1 Standard-PCR-Ansatz

1,0 µl	DNA (100 ng/µl)
2,5 µl	10xPCR-Puffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )
0,5 µl	Primer For (10 µM)
0,5 µl	Primer Rev (10 µM)
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,1 µl	DNA-Polymerase (5 U/µl)
19,9 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
25,0 µl	Gesamtvolumen

In der Folge wurden alle Amplifikationsreaktionen im *PTC-200 Thermocycler* durchgeführt. Grundsätzlich unterteilt man die PCR-Kettenreaktion in fünf Schritte, wobei die Reaktionsschritte 2.-4. repetitive Reaktionszyklen sind.

#### 2.2.2 Reaktionsschritte und -bedingungen der PCR

1. Initiale	95°C	5 min	
2. Denaturierung	95°C	15 s	} 30-35 Zyklen
3. Annealing	50 – 62°C	10 s	
4. Elongation	72°C	30 – 40 s	
5. Finale Elongation	72°C	5 min	

Bei der Denaturierung wird die DNA im Reaktionsgemisch in ihre Einzelstränge aufgetrennt. Anschließend erfolgt die komplementäre Hybridisierung der eingesetzten Oligonukleotide im dritten Reaktionsschritt, dem Annealing, wobei die Schmelztemperatur der Primer die Anlagerungstemperatur bedingt. In der Elongation kommt es zur Polymerisation von Desoxynukleotiden komplementär zu der Ausgangs-DNA. Innerhalb einer Minute können während der Elongationsphase 500-1000 Bp polymerisieren, weswegen die Elongationszeit von der Länge der zu synthetisierenden Amplikons abhängt. Wie bereits erwähnt, wiederholt sich die Kette Denaturierung, Annealing und Elongation 30-35 Mal. Dadurch, dass bei jedem neuen Zyklus die neusynthetisierten DNA-Stränge sich von der Matrize lösen und selbst als Matrize zu Verfügung stehen, erzielt man am Ende der PCR eine exponentielle Menge des Ausgangsmaterials. Die finale Elongation schließt die Polymerisationsreaktion des DNA-Materials ab.

Um die Spezifität der PCR-Produkte zu erhöhen, wurde die sog. *Touchdown-PCR* durchgeführt, bei der die Anlagerungstemperatur für die Primer schrittweise zweimal um 2°C

### III. Material und Methoden

reduziert wird. Ein Beispiel: Wurden die ersten vier Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 58°C durchgeführt, folgten die nächsten vier Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 56°C und die restlichen 27 Zyklen mit einer Temperatur von 54°C.

Für den Fall, dass mit angegebenem PCR-Ansatz und unterschiedlichen Amplifikationsbedingungen kein PCR-Produkt zustande kam, wurde die PCR erneut mit den *FailSafe PreMixes A – L* des *FailSafe™ PCR PreMix Selection Kit* durchgeführt.

Neben den vier Desoxynukleotiden in gepufferter Salzlösung enthalten die *PreMix*-Puffer des *FailSafe™ PCR PreMix Selection Kits* unterschiedliche Konzentrationen an MgCl<sub>2</sub> und diverse Verstärker (*Enhancer*) für die PCR. Betain ist solch ein PCR-Verstärker, der die Ausbeute und Spezifität des PCR-Produktes erhöht und zudem die Polymerase vor zu großer Hitzeeinwirkung schützt.

**2.2.3.** gibt Auskunft über die PCR-Bedingungen der Primerpaare für die jeweiligen Amplikons. Aus **2.2.3** wird auch deutlich, dass die PCR-Bedingungen sehr unterschiedlich sein können.

#### **2.2.3 PCR-Bedingungen der verwendeten Primerpaare unter Angabe der Amplikongrößen**

Gen	Exon (Amplikon)	Primerpaar	TD-Programm	Fail-Safe-Puffer	Amplikongröße (bp)
<i>CAVI</i>	1	CAV1_1F+1R	TD 58	D	394
	2	CAV1_2F+2R			591
	3	CAV1_3F+3R	TD58		504
<i>CAV2</i>	2	CAV2_2F+2R	TD 62		411
	3	CAV2_3F+3R	TD 62		375
<i>KIT</i>	10 (1)	KIT_10/11F+10/11R	TD 58		485
	11 (1)	KIT_10/11F+10/11R	TD 58		485
	12 (2)	KIT_12/13F+12/13R	TD 58		466
	13 (2)	KIT_12/13F+12/13R	TD 58		466
	17 (3)	KIT_17F+17R	TD 56		490
<i>FLT3</i>	13 (1)	FLT3_13/14F+13/14R	TD 56		496
	14 (1)	FLT3_13/14F+13/14R	TD 56		496
	14 (2)	FLT3_14/15F+14/15R	TD 62		474
	15 (2)	FLT3_14/15F+14/15R	TD 62		474
	16 (3)	FLT3_16F+16R	TD 58		274
	20 (4)	FLT3_20F+20R	TD 56		258
<i>PIK3CA</i>	9 (1)	PIK3CA_9F+9R	TD 60		417
	20 (2)	PIK3CA_20F+20R	TD 56		486
<i>JAK2</i>	14 (1)	JAK2_14F+14R	TD 62		295

**2.2.3 PCR-Bedingungen der verwendeten Primerpaare unter Angabe der Amplikongrößen**

Gen	Exon (Amplikon)	Primerpaar	TD-Programm	Fail-Safe-Puffer	Amplikongröße (bp)
<i>SPRED1</i>	1	SPRED1_1F+1R		H	274
	2	SPRED1_2F+2R	TD 56		269
	3	SPRED1_3F+3R	TD 58		431
	4	SPRED1_4F+4R	TD 56		398
	5	SPRED1_5F+5R	TD 56		340
	6	SPRED1_6F+6R	TD 56		398
	7	SPRED1_7F+7R	TD 56		397
	8 1. Teil (8)	SPRED1_8F+8R	TD 58		552
	8 2. Teil (9)	SPRED1_8F2+8R2	TD 58		567
<i>FRS2</i>	7 (1)	FRS2_7F+7R	TD 62		369
	8 (2)	FRS2_8F+8R	TD 60		424
	9 (3)	FRS2_9F+9R	TD 62		387
<i>FRS3</i>	3 (1)	FRS3_3F+3R	TD 58		402
	4 (2)	FRS3_4F+4R	TD 58		453
	5 (3)	FRS3_5F+5R	TD 58		387

**2.3 Agarosegelelektrophorese**

Die Elektrophorese im Agarosegel ist ein übliches Mittel zur Überprüfung von PCR-Produkten. In der vorliegenden Arbeit wurde ein Gel mit einer 2%-igen Agarosekonzentration verwendet. Die Agarose wurde in 1x Tris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer aufgekocht, dann auf ca. 50°C heruntergekühlt und in einen entsprechenden Gelträger mit eingesetzten Probenkammern gegossen, wo sie dann aushärtete. In die DNA-Proben wurde etwa ein 1/4 Volumen DNA-Ladepuffer (Orange G) hinzugegeben und anschließend in die Geltaschen pipettiert. Als Größenstandard wurde ein DNA-Standard-Marker in jede Reihe mit DNA-Proben pipettiert. Daraufhin wurde eine Spannung von 160 V angelegt und eine Laufzeit von min. 25 min abgewartet. DNA wandert im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wegen der negativen Gesamtladung der DNA, die durch die Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat der DNA entsteht. Kleinere Fragmente wandern schneller durch die Poren des Agarosegels als größere, da die Laufstrecke der Fragmente umgekehrt proportional dem Logarithmus ihres Molekulargewichts ist. Nachdem die Wanderung der Fragmente abgeschlossen war, wurde das Gel in einer 0,05%igen Ethidiumbromid-Lösung für mindestens 15 min inkubiert. Auf einem Transilluminator-Tisch konnte anschließend die ungefähre Größe der DNA-Fragmente mit Hilfe des aufgetragenen Längenstandards

### III. Material und Methoden

abgeschätzt werden, da der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid die DNA interkaliert und so die DNA mit UV-Licht (254 nm) zur Fluoreszenz gebracht wird.

#### **2.4 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Da Primer nachfolgende Arbeitsschritte stören können, wurden die PCR-Produkte vor der DNA-Sequenzierung mit Hilfe des Enzymmix *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> der Firma USB aufgereinigt. Der Enzymmix *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> setzt sich aus der Exonuklease I und der Shrimp Alkali-Phosphatase, die aus *Pandalus borealis* isoliert wurde, zusammen.

##### **2.4.1 ExoSAP-Ansatz**

2 µl	PCR-Produkt
0,6 µl	ExoSAP-IT
4,4 µl	HPLC-H <sub>2</sub> O
7 µl	Gesamtvolumen

Die Aufreinigung der PCR-Produkte fand im *PTC-200 Thermocycler* der Firma MJ Research statt. Erst für 15 min bei 37°C und danach wurde das *ExoSAP-IT*<sup>®</sup> bei 80°C für 15 min aktiviert.

#### **2.5 DNA-Sequenzierung**

Die angewendete DNA-Sequenzierung beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977) und wurde mit dem *ABI Prism BigDye*<sup>®</sup> *Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (PE Applied Biosystems, Darmstadt) und dem Sequenzierungsgerät *ABI Prism 377 DNA Sequencer* (PE Applied Biosystems, Darmstadt) durchgeführt. Hauptsächlich besteht die zyklische Sequenzierreaktion eines PCR-Produkts aus Wiederholungen von Denaturierung, Annealing und Elongation. Neben 2'-Desoxyribonukleotiden (dNTPs) werden auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) verwendet bzw. eingebaut. Die ddNTPs dienen dem Abbruch der Amplifizierungsreaktion. Ihnen fehlt die 3'-OH-Gruppe, die für die Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke mit der Phosphatgruppe eines weiteren dNTPs bzw. ddNTPs notwendig ist. Didesoxynukleotide werden zufällig eingebaut und lassen DNA-Stränge unterschiedlicher Länge, die sich jeweils um eine Base unterscheiden, entstehen. Die vier ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen mit verschiedenen Fluoreszenzmaxima markiert. Bei der Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese werden die

### III. Material und Methoden

ddNTPs dann von einem Laser zur Fluoreszenz angeregt. Es folgt eine elektronische Messung und eine computergestützte Auswertung der Signale, woraufhin ein Chromatogramm erstellt werden kann.

Für die DNA-Sequenzierung wurde nur ein Primer verwendet, um nur einen DNA-Strang als Matrize zu nutzen. Das Ergebnis ist eine lineare Amplifikation des zu sequenzierenden Produktes.

#### **2.5.1 Sequenzierungsansatz**

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

Die DNA-Sequenzierreaktion wurde mit folgendem Programm im *PTC-200 Thermocycler* durchgeführt:

#### **2.5.2 Sequenzierungsbedingungen**

96°C	5 min	} 30 Zyklen
96°C	50 s	
50°C	30 s	
60°C	4 min	

Damit Verunreinigungen des Sequenzierprodukts mit nicht eingebauten dNTPs und ddNTPs entfernt werden, wurde das entstandene Sequenzierprodukt mittels Natriumacetat (NaAc)-Fällung aufgereinigt.

#### **2.5.3 Aufreinigungsansatz des Sequenzierprodukts**

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

Nachdem dieser Fällungsansatz kurz auf dem Vortex bei 14.000 rpm gehalten wurde, wurde er für 20 min zentrifugiert und anschließend wurde der Überstand abpipettiert und verworfen. Das DNA-Pellet wurde in 250 µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen und ein zweites Mal

### III. Material und Methoden

zentrifugiert und der Überstand verworfen. Schließlich wurde das DNA-Pellet bei 37°C für ca. 15 min getrocknet und bei -20°C gelagert bis es im *ABI Prism 377 DNA Sequencer* elektrophoretisch aufgetrennt werden konnte.

## 3. Genbank-Einträge, Computerprogramme und Datenbanken

### 3.1 Genbank-Einträge der analysierten Gene

Gen	Exons	Genbank Accession No.
<i>CAVI</i>	3	NM_001753
<i>CAV2</i>	3	NM_001233
<i>KIT</i>	21	NM_000222
<i>FLT3</i>	24	NM_004119
<i>JAK2</i>	25	NM_004972
<i>PIK3CA</i>	20	NM_006218
<i>SPRED1</i>	8	NM_152594
<i>FRS2</i>	5	NM_006654
<i>FRS3</i>	5	NM_006653

### 3.2 Datenbanken (zuletzt zugegriffen im Dezember 2012)

Name / Web Adresse	Daten
<b>NCBI</b> ( <u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <b>te</b> chnology <u>I</u> nformation) <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>	Genom-Sequenzen, BAC-Klonsequenzen, physikalische Darstellung der Organisation des Genoms, SNP-Datenbank.
<b>UCSC</b> ( <u>U</u> niversity of <u>C</u> alifornia, <u>S</u> anta <u>C</u> ruz UCSC) <a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>	Genom-Sequenzen, BAC- und Fosmid-Klonsequenzen, graphische Darstellung der Organisation des Genoms.
<b>Ensembl</b> (The European Bioinformatics Institute and Genome Research) <a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a>	Genom-Sequenzen, physikalische Darstellung der Organisation des Genoms, SNP-Datenbank.

### 3.3 Computerprogramme

Name	Funktion (Hersteller)
ABI Prism™ 377 XL Collection	Steuerung sowie Gel- und Sequenzauswertung des ABI 377 Sequenzierers. (Applied Biosystems)
Sequence Pilot 2.3	Auswertung von DNA-Sequenzelektropherogrammen. (JSI GmbH, Medical Systems)
EditSeq	Editieren von DNA-Sequenzen. (Dnastar)
SeqMan	Homologievergleiche multipler Sequenzen. (Dnastar)
Chromas 2.3	Editieren von DNA-Sequenzchromatogrammen.
DIGI CAM Digital Camera Control	Dokumentation von Agarosegelen

### 3.4 „Online“-Computerprogramme (zuletzt zugegriffen Dezember 2011)

Name / Web Adresse	Funktion
<b>Primer3</b> <a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3</a>	Ableiten von Oligonukleotiden.
<b>In-silico PCR (UCSC)</b> <a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr</a>	Computeranalyse der Spezifität eines Primer-Paars.
<b>Oligo Calculator</b> <a href="https://www.sigmaaldrich.com">https://www.sigmaaldrich.com</a>	Berechnung der Oligonukleotid-Eigenschaften wie GC-Gehalt, Schmelzpunkt, Neigung zur Bildung von Sekundärstrukturen und Dimeren.
<b><u>B</u>asic <u>L</u>ocal <u>A</u>lignment <u>S</u>earch <u>T</u>ool (BLAST)</b> <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/</a>	Homologievergleich von DNA- bzw. Aminosäuresequenzen.
<b><u>B</u>asic <u>L</u>ocal <u>A</u>lignment <u>T</u>ool (BLAT)</b> <a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat</a>	Ermittlung der Exon-Intron-Struktur in der genomischen DNA-Sequenz eines Gens durch Einspeisung der cDNA-Sequenz.
<b>COSMIC</b> <a href="http://www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/">www.sanger.ac.uk/genetics/CGP/cosmic/</a>	Ermittlung somatischer Mutationen bei neoplastischen Erkrankungen

### III. Material und Methoden

Name / Web Adresse	Funktion
<b>Splice Site Prediction by Neural Network</b> (Berkeley Drosophila Genome Project)  <a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a>	Erkennen und Voraussage von Spleißstellen.
<b><i>SpliceView</i></b> - Splice Prediction using Consensus Sequences  <a href="http://zeus2.itb.cnr.it/.../wwwspliceview_ex.html">zeus2.itb.cnr.it/.../wwwspliceview_ex.html</a>	Erkennen und Voraussage humaner Spleißstellen.

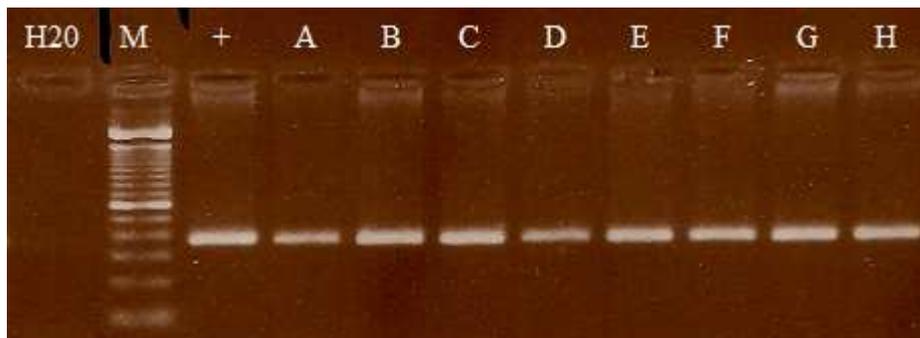
## IV. Ergebnisse

### 1. Mutationsanalyse von neun Kandidatengenen bei 35 Patienten mit Noonan-Syndrom

#### 1.1 PCR-Amplifikation der Kodierregion der Gene *PIK3CA*, *JAK2*, *FLT3*, *KIT*, *SPRED1*, *CAVI*, *CAV2*, *FRS2* und *FRS3* und direkte DNA-Sequenzanalyse

Zur Durchführung einer Mutationsanalyse der neun Kandidatengene *PIK3CA*, *JAK3*, *FLT3*, *KIT*, *SPRED1*, *CAVI*, *CAV2*, *FRS2* und *FRS3* bei 35 Patienten mit dem Noonan-Syndrom wurde zunächst die Exon-Intron-Struktur der Gene ermittelt. Da für das Mutationsscreening die kodierenden Bereiche und Exon/Intron-Grenzen analysiert werden sollten, wurden die Primer für die PCR-Amplifikation so abgeleitet, dass die Exons von mindestens 40 bp intronischer Sequenz flankiert werden. Die Etablierung optimaler PCR-Bedingungen erfolgte für jedes Amplikon an genomischen Kontroll-DNAs. Anschließend wurden die Exons aus genomischer DNA amplifiziert und nach qualitativer und quantitativer Überprüfung der Produkte in einem Agarosegel direkt sequenziert.

In der nachfolgenden Abb. 4 ist exemplarisch ein Agarosegel mit PCR-Produkten von Exon 7 des *FRS2*-Gens dargestellt.



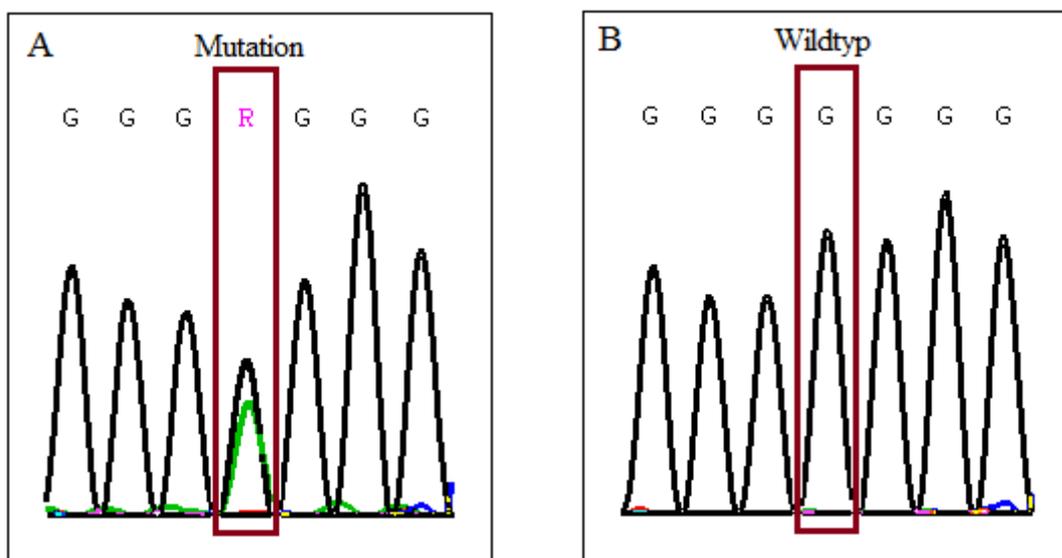
**Abb. 4: Exemplarische Darstellung eines mit Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels mit PCR-Produkten, die Exon 7 des *FRS2*-Gens umfassen.** Das Bild zeigt die 369 bp großen PCR-Produkte, die Exon 7 des *FRS2*-Gens umfassen. Die PCR-Produkte stammen von einem Teil der 35 untersuchten Patienten mit Noonan-Syndrom sowie von einer Kontrollperson (mit + bezeichnet). Als Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O) diente ein Ansatz ohne DNA. Ein 100 bp-DNA-Marker wurde rechts als Größenstandard aufgetragen (M); die 600 bp- und 1200 bp-Banden erscheinen kräftig.

#### IV. Ergebnisse

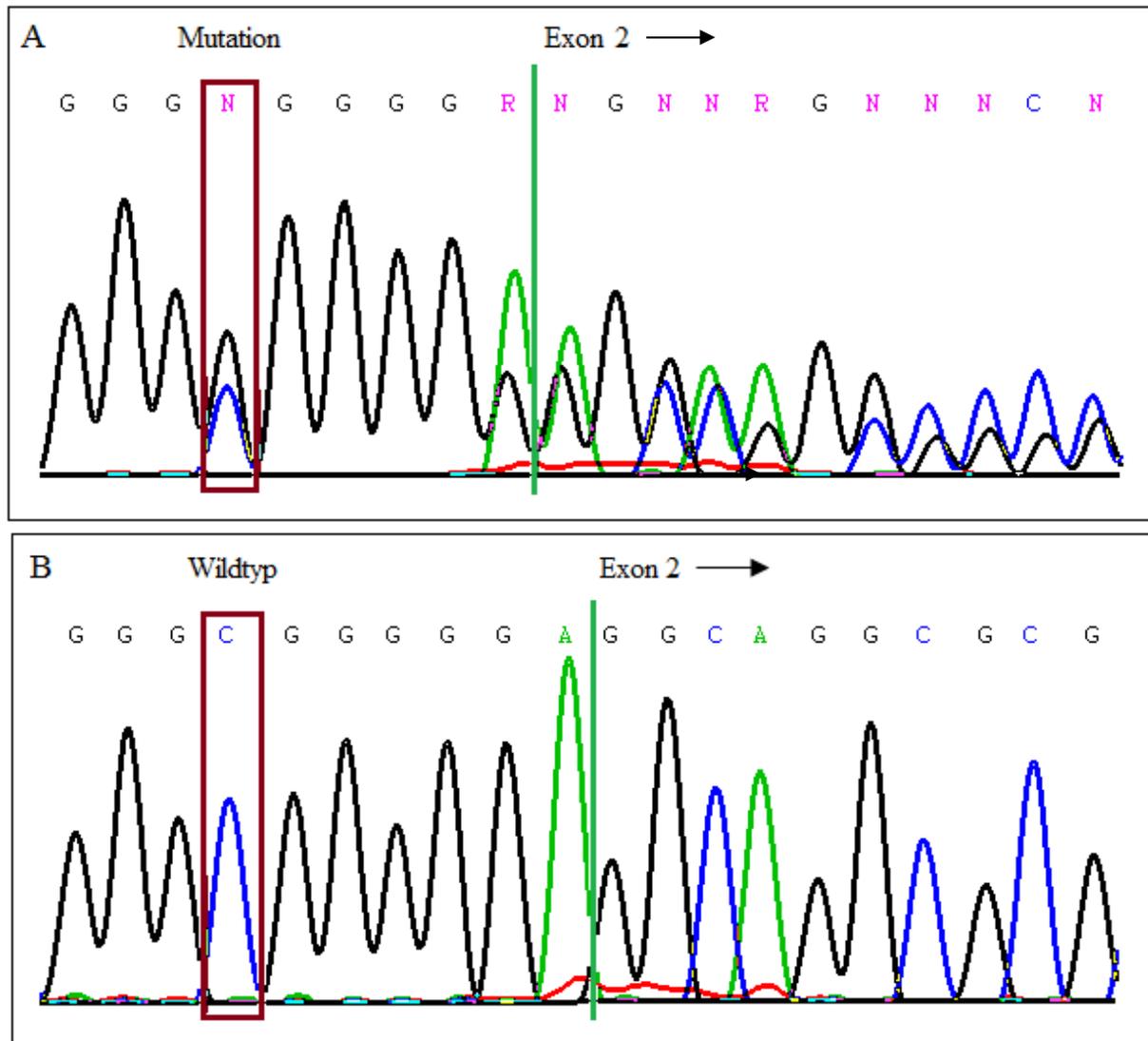
Nachfolgend werden die Ergebnisse der PCR-basierten Sequenzierung der neun Kandidatengene besprochen:

Das *CAVI*-Gen besitzt lediglich drei kodierende Exons. Zur Mutationsanalyse der drei Exons wurden drei Amplikons mit einer PCR-Produktgröße von 394 bp, 591 bp bzw. 504 bp generiert und dann sequenziert. Nach der EDV-gestützten Auswertung der DNA-Sequenzen (zugegriffen im Dezember 2012) konnten zwei unbekannte Veränderungen festgestellt werden (Die Patienten 13 und 18 zeigen eine heterozygote c.30+16G>A-Substitution im Intron 1 (Abb. 5), die in den Datenbanken bisher nicht verzeichnet ist. Es handelt sich dabei um eine synonyme Mutation, es kommt demnach auf Proteinebene nicht zu einem Austausch einer Aminosäure.

Bei Patient 11 wurde die heterozygote Deletion c.75-7C/- im Intron 1 entdeckt (Abb. 6), die in den Datenbanken nicht verzeichnet ist.



**Abb. 5: Sequenzchromatogrammausschnitte aus dem Intron 1 des *CAVI*-Gens.** Darstellung der heterozygoten Mutation c.30+16G>A bei Patient 18 (A) im Vergleich zur Wildtypsequenz bei einer gesunden Kontrollperson (B). Die Sequenzvariante sowie die entsprechende Position in der Wildtypsequenz sind rot eingerahmt und entsprechend mit „Mutation“ bzw. „Wildtyp“ beschriftet. Unterschiedliche Farben entsprechen verschiedenen Nukleotiden (A, grün; G, schwarz). Jeder Peak repräsentiert ein Nukleotid der Sequenz.



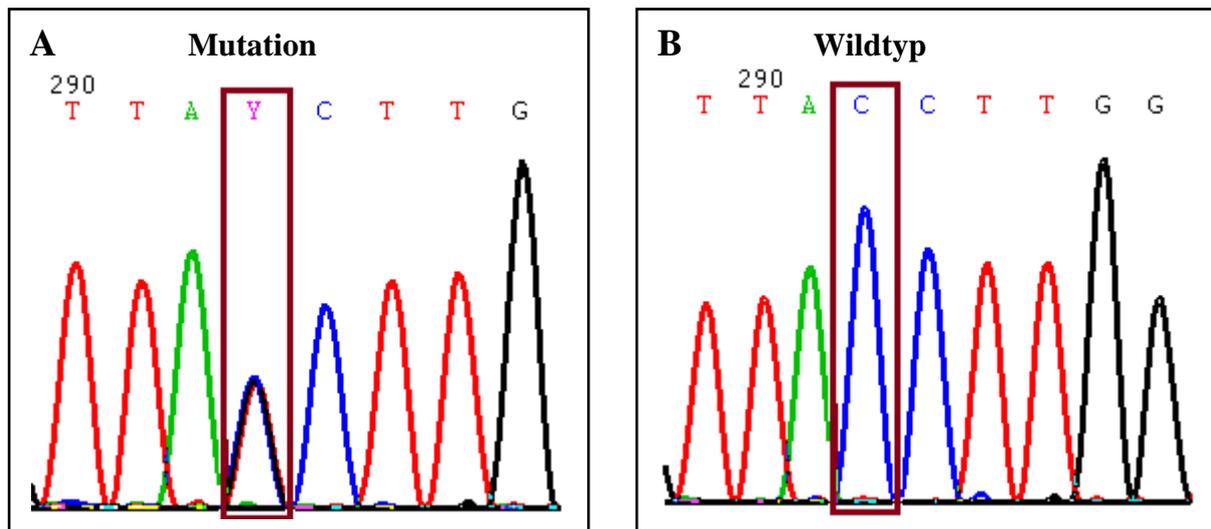
**Abb. 6: Sequenzchromatogrammausschnitte aus dem Intron-Exon-Übergang des Exons 2 des *CAVI*-Gens.** Darstellung der heterozygoten Mutation *c.75-7C/-* bei Patient 11 (A) im Vergleich zur Wildtypsequenz bei einer gesunden Kontrollperson (B). Die Sequenzvariante sowie die entsprechende Position in der Wildtypsequenz sind rot eingerahmt und entsprechend mit „Mutation“ bzw. „Wildtyp“ beschriftet. Die grüne Linie zeigt den Beginn des Exons 2 an. Unterschiedliche Farben entsprechen verschiedenen Nukleotiden. (A, grün; C, blau; G, schwarz). Jeder Peak repräsentiert ein Nukleotid der Sequenz.

Das *KIT*-Gen besteht aus 21 kodierenden Exons. In der Literatur wurden bereits die Exons 11, 13 (Debiec-Rychter et al. 2001) und 17 (Renneville et al. 2008, Lee et al. 2013) als die Regionen beschrieben, deren Mutationen zu einem Funktionsgewinn und tumorösen Entartungen führen. Zusätzlich zu den drei Exons 11, 13 und 17 wurden die Exons 10 und 12 untersucht, da aufgrund von kleinen Introns die Generierung von PCR-Amplikons mit zwei Exons möglich war: Ein Amplikon (Größe: 485 bp) beinhaltet die Exons 10 und 11, das zweite Amplikon (Größe: 466 bp) beinhaltet die Exons 12 und 13 und das dritte Amplikon (Größe: 490 bp) umfasst das Exon 17. Nach Sequenzierung und datenbankgestützter Auswertung der DNA-Sequenzen (zugegriffen im Dezember 2012) konnten vier

#### IV. Ergebnisse

Veränderungen im *KIT*-Gen identifiziert werden, wobei alle vier die Kodierregion betreffen (Tab. 4). Drei der Sequenzvarianten waren in Datenbanken bereits als SNP registriert.

Beim Patienten 17 zeigte sich die heterozygote c.1938C>T-Substitution in Exon 13 (Abb. 7), die bislang in den Datenbanken nicht vermerkt ist. Es handelt sich dabei um eine synonyme Mutation.



**Abb. 7: Sequenzchromatogrammausschnitte aus dem Exon 13 des *KIT*-Gens.** Darstellung der heterozygoten Mutation c.1938C>T bei Patient 17 (A) im Vergleich zur Wildtypsequenz bei einer gesunden Kontrollperson (B). Die Sequenzvariante sowie die entsprechende Position in der Wildtypsequenz sind rot eingrahmt und mit „Mutation“ bzw. „Wildtyp“ beschriftet. Unterschiedliche Farben entsprechen unterschiedlichen Nukleotiden (A, grün; T, rot; C, blau; G, schwarz). Jeder Peak repräsentiert ein Nukleotid der Sequenz.

Das *FLT3*-Gen besteht aus 24 Exons. Die Mutationsanalyse wurde auf die Exons 13, 14, 15, 16 und 20 beschränkt, da diese die *Hotspot*-Regionen des *FLT3*-Gens darstellen: Mutationen in den Exons 14 und 15 findet man bei 20-25% der Patienten mit AML und Veränderungen in Exon 20 bei 7% der Patienten mit AML (Reilly 2003). Wegen kleiner Introns war auch hier die Generierung von Amplikons mit zwei Exons möglich: Ein Amplikon (Größe: 496 bp) beinhaltet das Exon 13 und 14, ein anderes (Größe: 474 bp) beinhaltet Exon 14 und 15, wiederum ein anderes (Größe: 274 bp) beinhaltet Exon 16 und das letzte (Größe: 258 bp) beinhaltet Exon 20. Nach Sequenzierung der Amplikons ergab die EDV-gestützte Auswertung der DNA-Sequenzen eine Variante im *FLT3*-Gen bei fünf Patienten, die in den einschlägigen Datenbanken bereits als SNP beschrieben wurde (Tab. 4).

Das *CAV2*-Gen enthält drei kodierende Exons. Auf Mutationen untersucht wurden die beiden hinteren Exons, wofür zwei Amplikons mit PCR-Produktgrößen von 411 bp und 375 bp generiert wurden. Nach Sequenzierung und EDV-gestützter Auswertung der DNA-Sequenzen

## IV. Ergebnisse

konnten drei Veränderungen im kodierenden Bereich des *CAV2*-Gens gefunden werden, die jedoch in Online-Datenbanken als SNPs verzeichnet sind (Tab. 4).

Das *PIK3CA*-Gen besteht aus 20 kodierenden Exons. In die Mutationsanalyse des *PIK3CA*-Gens wurden nur die Exons 9 und 20 miteinbezogen, da diese als *Hotspot*-Regionen für Veränderungen bei diversen Tumoren beschrieben wurden (Velho et al. 2005, Velasco et al. 2006, Fenic et al. 2007, Lai et al. 2008). Die PCR-Produktgrößen der zwei generierten Amplikons waren 417 bp und 486 bp groß. Nach Sequenzierung der Amplikons und EDV-gestützter Auswertung der DNA-Sequenzen konnte eine Variante im *PIK3CA*-Gen identifiziert werden, die in Datenbanken bereits als SNP beschrieben wurde (Tab. 4).

Das *JAK2*-Gen besteht aus 25 kodierenden Exons. Der Aminosäureaustausch (V617F) in der autoinhibitorischen JH2-Domäne des *JAK2*-Proteins ist mit malignen, myeloischen Erkrankungen assoziiert (James et al. 2005a), das entsprechende Codon befindet sich im Exon 14. Es wurde ein Amplikon, das Exon 14 umfasste, mit einer PCR-Produktgröße von 295 bp generiert und anschließend sequenziert. Im untersuchten Patientenkollektiv wurde jedoch keine Mutation im *JAK2*-Gen gefunden.

Ein weiteres interessantes Kandidatengen für die Mutationsanalyse, das *SPRED1*-Gen, besteht aus acht kodierenden Exons. Für die Mutationsanalyse wurden neun Amplikons mit PCR-Produktgrößen von 274 bp, 269 bp, 431 bp, 398 bp, 340 bp, 398 bp, 397 bp, 552 bp und 567 bp generiert, da aufgrund seiner Größe für das Exon 8 zwei Amplikons generiert werden mussten. Nach Sequenzierung der Amplikons und EDV-gestützter Auswertung der DNA-Sequenzen konnten vier Varianten identifiziert werden, die in den Datenbanken bereits als SNP verzeichnet waren (Tab. 4).

Schließlich wurden in dieser Arbeit zwei weitere Gene, nämlich *FRS2* und *FRS3*, der Mutationsanalyse unterzogen. Beide Gene besitzen fünf kodierende Exons, von denen jeweils die ersten drei auf Mutationen analysiert wurden. Hierfür wurden je drei Amplikons mit den Größen von 369 bp, 424 bp und 387 bp für die Exons von *FRS2* und 402 bp, 453 bp und 387 bp für die Exons von *FRS3* generiert und dann sequenziert. Jedoch konnten nach der EDV-gestützten Auswertung der DNA-Sequenzen keine Varianten oder Mutationen identifiziert werden.

### **1.2 Identifizierte Sequenzvarianten**

Alle identifizierten Sequenzvarianten sind in „Tab. 4: Identifizierte Sequenzvarianten in den Genen *KIT*, *CAV1*, *CAV2*, *FLT3*, *SPRED1* und *PIK3CA*“ zusammengefasst.

#### IV. Ergebnisse

Gen	Nukleotid-austausch	Aminosäureaustausch	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
<i>KIT</i>	c.1621A>C	p.M541L	7/70	rs3822214
	c.1638A>G	p.K546	1/70	rs55986963
	c.1938C>T	p.Y646	1/70	
	c.2394C>T	p.I798	3/70	rs55789615
<i>CAVI</i>	c.30+16G>A		2/70	
	c.75-7C/-		1/70	
	c.144C>T	p.M48I	2/70	rs56014347
<i>CAV2</i>	c.341+11G/-		3/70	rs3214317
	c.341+23G>T		16/70 (2) <sup>b</sup>	rs2270188
	c.388C>G	p.Q130E	7/70	rs8940
<i>FLT3</i>	c.1650A>G	p.L550	5/70	rs34374211
<i>SPRED1</i>	c.288G>A	p.K96	67/70 (32) <sup>b</sup>	rs7182445
	c.452-8 C>A		67/70 (32) <sup>b</sup>	rs7180446
	c.452-18 G>A		17/70 (2) <sup>b</sup>	rs7179118
	c.1041 T>C	p.V347	61/70 (29) <sup>b</sup>	rs3751526
<i>PIK3CA</i>	c.3075 C>T	p.T1025	1/70	rs17849079

**Tab. 4: Identifizierte Sequenzvarianten in den Genen *KIT*, *CAVI*, *CAV2*, *FLT3*, *SPRED1* und *PIK3CA*.**

<sup>b</sup>: In der Klammer ist die Anzahl der homozygot vorliegenden Fälle angegeben; dbSNP: Datenbank *single nucleotide polymorphisms*; rs: Referenznummer für den SNP in der dbSNP-Datenbank.

## **V. Diskussion**

### **1. Keine pathogene Mutation in den vier Leukämie-assoziierten Genen *KIT*, *FLT3*, *JAK2* und *PIK3CA*, in den drei funktionellen Kandidatengenen des RAS-MAPK-Signalwegs *SPRED1*, *FRS2* und *FRS3* sowie in den zwei nach Tiermodellen ausgewählten Kandidatengenen *CAVI* und *CAV2* bei 35 Patienten mit Noonan-Syndrom**

#### **1.1 Rekapitulation**

Aufgrund des häufigen Auftretens myeloproliferativer Erkrankungen, vor allem JMML und CMML, beim Noonan-Syndrom (Kratz et al. 2005) wurden die vier Leukämie-assoziierten Gene *KIT*, *FLT3*, *JAK2* und *PIK3CA* bei 35 Patienten mit Noonan-Syndrom auf Mutationen analysiert. Durch die Sequenzanalyse von *Hotspot*-Regionen konnte in dieser Arbeit in den o. g. Genen keine pathogene Mutation entdeckt werden. Allerdings konnten in *KIT* vier Veränderungen ermittelt werden, von denen eine in den Datenbanken von Ensembl, NCBI und UCSC nicht registriert ist. Auch in *PIK3CA* konnte eine Veränderung ermittelt werden, die jedoch bereits als SNP bekannt ist. Eine gemeinsame Konsequenz der derzeit bekannten ursächlichen Genmutationen für das Noonan-Syndrom ist die Dysregulation der RAS-MAPK-Signalkaskade (Roberts et al. 2013). Deswegen wurden in dieser Arbeit die drei Gene *SPRED1*, *FRS2* und *FRS3*, deren Proteinprodukte regulatorisch in die RAS-MAPK-Signalwege eingreifen, als funktionelle Kandidatengene auf Mutationen analysiert. Jedoch wurden weder eine krankheitsassoziiierende Mutation noch ein unbeschriebener Polymorphismus in den drei funktionellen Kandidatengenen gefunden. Bei Patienten mit Noonan-Syndrom werden überdurchschnittlich häufig Herzdefekte diagnostiziert, wobei Pulmonalklappenanomalien am häufigsten diagnostiziert werden (van der Burgt 2007, Roberts et al. 2013). Pulmonalklappenanomalien wurden u. a. auch bei *Ptpn11*-defizienten Mäusen beobachtet (Chen et al. 2000). Dem Maus-Modell entsprechend galt das *PTPN11*-Gen als Kandidatengene für Pulmonalklappenanomalien beim Menschen und schon kurz darauf wurde bei Patienten mit Noonan-Syndrom *PTPN11* als erstes Krankheitsgen für das Noonan-Syndrom beschrieben (Tartaglia et al. 2001). Man folgte also der Strategie, Tiermodelle mit einem zur humanen Erkrankung analogen Phänotyp zur Genidentifikation zu nutzen. Auch in der vorliegenden Arbeit wurde diese Strategie angewendet: Bei Mäusen führt die Deletion des

## V. Diskussion

*Cav1*-Gens zu diversen Herzfehlern (Hnasko und Lisanti 2003, Zhao et al. 2002, Cohen et al. 2003). Caveoline spielen eine Rolle in der kardiovaskulären Funktion (Panneerselvam et al. 2012) und CAV1 und CAV2 sind zudem Negativregulatoren der RAS-MAPK-Signalwege (Williams et al. 2004, Burgermeister et al. 2011, Treff et al. 2004). Die Mutationsanalyse der Kandidatengene *CAV1* und *CAV2* mittels DNA-Sequenzierung bei 35 Patienten mit Noonan-Syndrom deckte jedoch keine krankheitsursächliche Mutation auf.

### **1.2 Limitierungen**

Zusammengenommen stellt sich die Frage, warum keine eindeutig pathogene Mutation in den neun Kandidatengen bei den 35 Patienten mit Noonan-Syndrom gefunden wurde.

#### **1.2.1 Technische Limitierung**

Es wäre möglich, dass ein technisches Problem bei der PCR-basierten Sequenzanalyse die Ursache war. Wenn sich in einer Primerbindesequenz ein SNP oder ein DIP (Deletions-Insertions-Polymorphismus) befindet, kann es sein, dass ein Allel selektiv amplifiziert wird. Mittels Datenbanken wie *Ensembl Genome Browser* und *NCBI-dbSNP* wurden Primersequenzen sorgfältig ausgewählt, um dieses Problem möglichst zu vermeiden. Dennoch wäre es denkbar, dass auf einem Allel eines Patienten ein noch den Datenbanken unbekannter SNP/DIP in der Primerbindesequenz vorliegt, woraufhin die Hybridisierung des Primers an dieses Allel ausbleiben und dieses geringer oder überhaupt nicht amplifiziert wurde. Beim Vorliegen einer pathogenen Mutation auf diesem Allel könnte diese, durch die selektive Amplifikation des gesunden Allels, der Analyse entgehen (Ward et al. 2006). Für PCR-Produkte, die in der Sequenzanalyse eine Heterozygotie aufweisen, kann dieser sogenannte *allelic drop out* allerdings ausgeschlossen werden (Zajickova et al. 2003, Heinrich et al. 2004).

#### **1.2.2 Methodische Limitierung**

Die rein methodisch bedingte Limitierung der Mutationsanalyse mittels direkter DNA-Sequenzierung kann dazu führen, dass eine krankheitsursächliche Mutation unentdeckt bleibt: So wurden in dieser Arbeit keine Promotoren, 5'- bzw. 3'-untranslatierte Bereiche (UTRs)

und nur die den Exons angrenzenden intronischen Bereiche auf mögliche Mutationen hin untersucht. Darüber hinaus könnten sich pathogene Sequenzvarianten auch in regulatorischen Einheiten, z. B. *cis*-regulatorischen Elementen, befinden. Prinzipiell könnte eine regulatorische Mutation zu einer verstärkten Transkription bzw. Translation, damit zu mehr Signalmolekülen und so durchaus zu einer stärkeren Signalweiterleitung in der RAS-MAPK-Kaskade führen. Weil aber alle pathogenen Mutationen bei Patienten mit Noonan-Syndrom in kodierenden Bereichen oder Exon/Intron-Übergängen liegen (Tartaglia et al. 2001, Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007, Razzaque et al. 2007, Pandit et al. 2007, Schubbert et al. 2006, Cirstea et al. 2009, Aoki et al. 2013), wurden in der vorliegenden Arbeit nur diese Genabschnitte der Kandidatengene auf Mutationen hin untersucht. Auch Rearrangements wie etwa Deletionen oder Duplikationen müssen als Krankheitsursache in Betracht gezogen werden. Wenige Basenpaare involvierende, exonische Rearrangements würden zwar mittels der PCR-basierten DNA-Sequenzanalyse entdeckt werden, jedoch Exon überspannende Deletionen oder Duplikationen, Inversionen sowie *copy number variations* (CNVs) würden mit diesem Analyseverfahren nicht aufgedeckt werden. CNVs entstehen auf Grund von submikroskopischen Deletionen oder Duplikationen und umfassen zwischen 1 Kb und 3 Mb DNA-Material (Feuk et al. 2006). CNVs können ganze Gene beinhalten, Teile von Genen oder auch genleere, chromosomale Regionen (Hastings et al. 2009).

### **1.2.3 Limitierung durch das Patientenkollektiv**

Das aus 35 Patienten bestehende Patientenkollektiv ist gut ausgewählt. Für 27 dieser Patienten sind klinisch detaillierte Beschreibungen vorhanden, die auf das Noonan-Syndrom schließen lassen. Besonders die charakteristische Fazies, die ein sehr wichtiges klinisches Kennzeichen darstellt, ist bei diesen Patienten sehr ausgeprägt. Für die restlichen acht Patienten waren entweder Bilder vorhanden, wurden in Arztbriefen in jüngerem Alter Noonan-Syndrom-typische Merkmale beschrieben oder es wurde nur die Diagnose gestellt ohne klinische Merkmale anzugeben. Eine richtige Diagnose ist allerdings sehr von der Erfahrung und dem Wissen des jeweiligen Arztes abhängig. Insbesondere kann es zu Verwechslungen mit Syndromen aus dem Kreis der RASopathien, wie z. B. dem Costello-Syndrom, dem CFC-Syndrom, dem Legius-Syndrom oder dem LEOPARD-Syndrom kommen. Daher wurden zur Erleichterung der Diagnosestellung Scoring-Systeme erstellt, unter anderem das bedeutende Scoring-System von van der Burgt aus dem Jahr 2007 (Tab. 2: Scoring-System für das Noonan-Syndrom).

## V. Diskussion

Wie in der Einleitung erwähnt, ist das Noonan-Syndrom eine autosomal-dominant vererbte Erkrankung. Bei autosomal-dominanten Erkrankungen kann eine variable Expressivität auftreten, sodass klinische Merkmale nicht immer beispielhaft ausgeprägt sein müssen. Die variable Expressivität kann nicht nur inter-, sondern auch intrafamiliär sehr hoch sein. Man geht davon aus, dass die phänotypischen Konsequenzen der jeweils vorliegenden Genveränderung durch Umweltfaktoren und/oder weitere genetische Faktoren beeinflusst wird/werden und es dadurch zu dieser variablen phänotypischen Ausprägung kommt. Selbst bei den 27, hinsichtlich der Klinik genauestens beschriebenen Patienten, wurden gewisse, für das Noonan-Syndrom typische klinische Kennzeichen nicht dokumentiert. Dies heißt aber nicht zwangsläufig, dass sie nicht vorhanden waren; sie könnten auch einfach unerkannt geblieben sein, z. B. wegen nur sehr schwacher Ausprägung, oder sie fanden keine Beachtung, weil sie als unwichtig erachtet wurden (was wiederum sehr an die Erfahrung und das Wissen des jeweils betreuenden Arztes gebunden ist).

### **1.2.4 Limitierung – unpassende Kandidatengene**

#### **1.2.4.1 Onkogene**

In dieser Arbeit wurden Leukämie-assoziierte Gene als Kandidatengene für das Noonan-Syndrom angesehen. Die Kandidatengene *KIT*, *FLT3*, *JAK2* und *PIK3CA* waren bereits als myeloproliferative Onkogene aus zahlreichen Studien bekannt (Birg et al. 1994, Fröhling et al. 2005, Baxter et al. 2005, Zhao et al. 2005, Kralovics et al. 2005, Levine et al. 2005, James et al. 2005a, James et al. 2005b, Min et al. 2003, Xu et al. 2003, Kubota et al. 2004, Zhao et al. 2004, Brandts et al. 2005, Grandage et al. 2005).

Das *KIT*-Gen kodiert für ein Transmembranglykoprotein, was zur Aktivierung der nachgeschalteten RAS-abhängigen Signalwege beitragen kann. Ein mutiertes *KIT*-Gen wird bei 20-30% der Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML) entdeckt (Fröhling et al. 2005). Die Überlebensrate der Menschen mit AML und einem mutierten *KIT*-Gen ist gering, was die AML in diesen Fällen zu einer aggressiven Form der Leukämie macht (Won et al. 2013).

*FLT3* kodiert für eine Typ-III Rezeptortyrosinkinase, die nach Aktivierung mehrere zytoplasmatische Effektoren innerhalb der RAS-abhängigen Signalwege beeinflusst. Mutationen im *FLT3*-Gen führen zu hämatopoetischen Malignitäten, wie akuter myeloischer Leukämie (AML) und akuter lymphatischer Leukämie (ALL) (Birg et al. 1994, Chillon et al.

## V. Diskussion

2012). Bei ungefähr 25-30% der Patienten mit AML ist eine Mutation im *FLT3*-Gen zu finden (Mattison et al. 2007, Sanz et al. 2009). Mutationen in *FLT3* sind also für einen beträchtlichen Teil der AML-Erkrankungen verantwortlich. Die Überlebensrate der Menschen mit AML oder ALL und einem mutierten *FLT3*-Gen ist wiederum gering (Chillon et al. 2012, Li et al. 2013). Somit sind mit *FLT3*-Mutationen assoziierte myeloproliferative Erkrankungen als aggressiv einzustufen.

Das *JAK2*-Gen kodiert für die JAK2-Tyrosinkinase, welche den RAS-MAPK-Signalweg beeinflussen kann (Rane und Reddy 2000). Die häufigste JAK2-Mutation (p.V617F) wird mit verschiedenen myeloproliferativen Erkrankungen assoziiert: Polycythaemia vera (77% mit dieser Mutation), essentielle Thrombozythämie (35%), idiopathische Myelofibrose (43%) und CMML (Baxter et al. 2005, Zhao et al. 2005, Kralovics et al. 2005, Levine et al. 2005, James et al. 2005b, Pich et al. 2009). Zusammengenommen sind das alles aggressive Formen der Leukämie.

Der konstitutiv aktivierte PIK3/AKT-Signalweg spielt bei der AML eine entscheidende Rolle (Min et al. 2003, Xu et al. 2003, Kubota et al. 2004, Zhao et al. 2004, Brandts et al. 2005, Grandage et al. 2005). Das für die katalytische Einheit kodierende *PIK3CA*-Gen (*Phosphoinositid-3-Kinase, catalytic, alpha polypeptide*) ist mit erhöhter Frequenz in menschlichen Tumoren mutiert (Samuels und Velculescu 2004, Saal et al. 2005). Allerdings werden Mutationen im *PIK3CA*-Gen nur sehr selten bei hämatopoetischen Erkrankungen gefunden, welche jedoch dann meist einen aggressiven Verlauf zeigen (Khwaja 2010).

Zusammengefasst sind *FLT3*, *JAK2*, *PIK3CA* und *KIT* gute Kandidatengene, da Mutationen in diesen Genen sehr wohl mit Leukämie assoziiert sind; allerdings muss eingeräumt werden, dass es sich dabei vor allem um aggressive Formen mit geringer Überlebensrate handelt. Die myeloproliferativen Entartungen bei Patienten mit Noonan-Syndrom sind hingegen eher milde Formen der JMML, die zumeist Kinder betreffen und bis zum Erwachsenenalter auch ohne Behandlung spontan remittieren (Bastida et al. 2011). Die Zahl erwachsener Patienten mit Noonan-Syndrom mit einer schwerwiegenden malignen, myeloproliferativen Erkrankung, wie AML, ist Studien zufolge gering (Hasle et al. 2009). Der Ansatz JMML-assozierte Kandidatengene auf Mutationen bei Patienten mit Noonan-Syndrom zu untersuchen war dennoch vielversprechend, wie auch die Identifikation von *CBL*, einem bekannten Onkogen für JMML, als Krankheitsgen für ein Noonan-like-Syndrom bewies (Loh et al. 2009, Martinelli et al. 2010, Niemeyer et al. 2010, Perez et al. 2010).

### **1.2.4.2 Kandidatengene aufgrund von Tiermodellen**

Bei einem Großteil der Patienten mit Noonan-Syndrom werden Herzdefekte, oft Pulmonalklappenstenosen (van der Burgt 2007), diagnostiziert. Mittels der Strategie über Tiermodelle mit einem zur humanen Erkrankung analogen Phänotyp wurden die Gene *CAV1* und *CAV2* ausgewählt. Das *CAV1*-Protein ist essentiell für die kardiopulmonale Funktion (Zhao et al. 2002). Bei *Cav1*-defizienten Mäusen finden sich eine Herzhypertrophie und eine dilatative Kardiomyopathie (DCM). Interessanterweise tritt bei diesen Mäusen auch eine verstärkte Signalweiterleitung der RAS-MAPK-Kaskade auf (Zhao et al. 2002, Cohen et al. 2003). Das *CAV1*-homologe *CAV2*-Gen wurde ebenfalls als Kandidatengen angesehen, da beide als Interaktionspartner mit gemeinsamer Funktion beschrieben wurden (Razani und Lisanti 2001, Razani et al. 2002). In den Kandidatengen *CAV1* und *CAV2* konnte jedoch keine pathogene Mutation bei den 35 Patienten gefunden werden. Die Strategie, Kandidatengene nach Tiermodellen mit einem zur humanen Erkrankung analogen Phänotyp auszuwählen, ist nicht allgemein zulässig, denn schon lange weiß man, dass Menschen und Mäuse bei orthologem Gendefekt nicht dieselben phänotypischen Merkmale aufweisen müssen (Erickson 1996). Einige Merkmale sind häufig unterschiedlich ausgeprägt bzw. bei Mäusen nicht vorhanden, wie z. B. für einen mit der Huntington-Krankheit assoziierten Gendefekt beschrieben wurde: Während bei Menschen krankheitstypische Dyskinesien beobachtet werden, ist dies bei Mäusen mit Huntington nicht der Fall (Simmons 2008). Ein anderer Grund für das Nichtauffinden von pathogenen Mutationen in den *CAV*-Genen könnte daran liegen, dass Herzdefekte äußerst heterogen sind: Derzeit werden allein mit der hypertrophen Kardiomyopathie (HCM) Mutationen in neun Genen und mit der dilatativen Kardiomyopathie (DCM) Mutationen in 13 Genen assoziiert (Jacoby und McKenna 2012). Die Herzentwicklung ist sehr komplex und von vielen Genen abhängig (Blue et al. 2012, Yuan et al. 2013) und eine Auswahl von einzelnen Genen als Kandidatengene für eine herzspezifische Erkrankung ist *per se* mehr oder minder willkürlich.

### **1.2.4.3 Gene für Signaltransduktionsproteine**

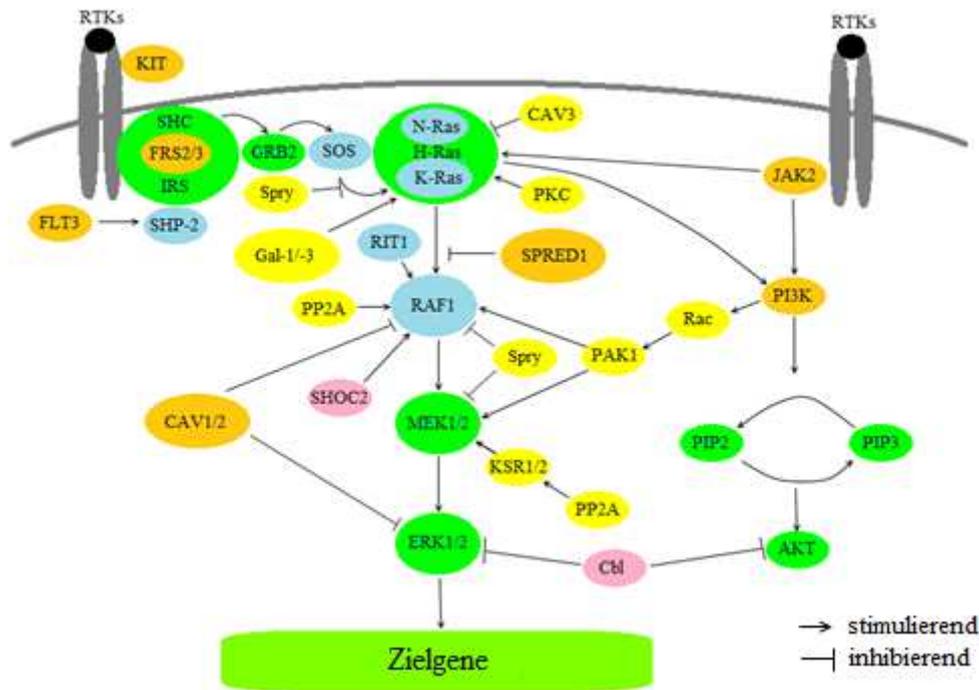
Die Dysregulation der RAS-MAPK-Signalwege führt zu grundlegenden Störungen in der menschlichen Entwicklung und wird mit den NF1-Spektrum-Erkrankungen assoziiert (Mautner et al. 2010). Die Kandidatengene *FRS2* und *FRS3* kodieren für Adaptorproteine, die nach Stimulation von Tyrosin-Kinase-Rezeptoren mit FGF (*fibroblast growthfactor*) oder

## V. Diskussion

NGF (*nerve growthfactor*) intrazellulär eine Signalweiterleitung fördern und somit zur Aktivierung der RAS-MAKP-Signalkaskade beitragen (Ong et al. 2000). Die Phosphorylierung von zwei Tyrosinresten des SPRED1-Proteins dagegen führt zur Inhibierung des RAS-MAPK-Signalwegs: SPRED1 bindet an RAF und kann so die RAS/RAF-Interaktion negativ beeinflussen (Quintanar-Audelo et al. 2011). Im Umkehrschluss würde ein SPRED1-Funktionsverlust auch mit einem Verlust der Inhibierung des RAS-MAPK-Signalwegs einhergehen, was zu einer verstärkten Signalweiterleitung führen könnte. Tatsächlich wurden bereits *loss-of-function* Keimbahnmutationen in *SPRED1* mit dem Legius-Syndrom, einer Erkrankung aus dem Formenkreis der NF1-Syndrome, assoziiert (Brems et al. 2007, Denayer et al. 2011). Trotz dieser vielversprechenden Fakten konnten in unserem Patientenkollektiv keine Mutationen in *FRS2*, *FRS3* und *SPRED1* gefunden werden. Diese negativen Befunde könnten wiederum einer gewissen Willkürlichkeit bei der Auswahl dieser genannten Kandidatengene geschuldet sein: Da die Anzahl regulatorischer Proteine in den RAS-MAPK Signalwegen äußerst groß ist (Abb. 8), kann die Wahrscheinlichkeit eine Mutation in einem der entsprechenden Gene in einem begrenzten Patientenkollektiv aufzudecken als eher gering eingeschätzt werden. Dennoch kann diese Strategie als zielführend betrachtet werden, denn u. a. wurde sie bei der Identifikation von *SHOC2* als Krankheitsgen für ein dem Noonan-Syndrom ähnliches Syndrom angewendet (Cordeddu et al. 2009). *SHOC2* kodiert für ein Leucin-reiches Gerüstprotein, das die Signaltransmission in der RAS-MAPK-Kaskade positiv moduliert (Sieburth et al. 1998, Selfors et al. 1998) (Abb. 8).

### **1.2.4.4 Zusammenschau**

Derzeit nimmt man an, dass die noch nicht identifizierten Noonan-Syndrom-assoziierten Krankheitsgene für Proteine aus RAS-abhängigen Signalwegen kodieren (Zenker und Wiczorek 2007). Auch alle neun in der vorliegenden Arbeit analysierten Kandidatengene kodieren für Proteine, die funktionell in die RAS-abhängigen Signalwege involviert sind (s. Abb. 8). Dennoch konnte in keinem dieser Gene eine pathogene Mutation in unserem Patientenkollektiv aufgedeckt werden. Aus der Abbildung 8 wird jedoch deutlich, dass es viele weitere Proteine gibt, welche in die RAS-abhängige Signalweiterleitung eingreifen. Die entsprechenden Gene können demnach *bona fide* als Kandidatengene für das Noonan-Syndrom angesehen werden.



**Abb. 8: Schematische Darstellung der RAS-abhängigen Signalwege.** Dargestellt sind die funktionellen Zusammenhänge von kodierten Proteinen (I) der neun, in der vorliegenden Arbeit sequenzierten Kandidatengene (orange), (II) der bekannten Noonan-Syndrom-assoziierten Krankheitsgene (blau), (III) von zwei Krankheitsgenen, die mit einem Noonan-Syndrom-ähnlichen Phänotyp assoziiert werden (rosa), (IV) weiteren putativen Kandidatengenen für das Noonan-Syndrom (gelb) und (V) sonstigen Genen (grün). RTK, Rezeptor-Tyrosinkinasen.

## 2. Ungeklärte Varianten in den untersuchten Kandidatengenen

In den Kandidatengenen *KIT* und *CAVI* wurden ungeklärte Sequenzvarianten gefunden: *KIT* c.1938C>T; *CAVI* c.30+16G>A und *CAVI* c75-7C/-. Da keine elterlichen DNA-Proben zur Verfügung standen, konnten keine *de novo*-Nachweise durchgeführt werden. Intronsche Sequenzveränderungen (wie etwa die *CAVI* c.30+16G>A und *CAVI* c75-7C/- Varianten) aber auch stille Mutationen (wie die *KIT* c.1938C>T Variante) können unter Umständen das Spleißen der prä-mRNA verändern und so zu Krankheiten führen. Beispielsweise wurde berichtet, dass 50% der Patienten mit Neurofibromatose Typ1, welche zu den NCFC-Syndromen gehört, Mutationen in Spleißstellen aufweisen (Baralle und Baralle 2005, Ars et al. 1999). Schätzungsweise sind bis zu 33% aller genetisch bedingten Krankheiten auf Veränderungen von Spleißstellen zurückzuführen (Havens et al. 2013). Beim Spleißvorgang werden Intronabschnitte aus der prä-mRNA herausgeschnitten und die Exons miteinander zur mRNA verbunden. Die dazu nötigen Erkennungssequenzen sind hoch konserviert und werden als Spleißstellen, im Detail als Spleißdonorstelle (5'-Spleißstelle) und Spleißakzeptorstelle

(3'-Spleißstelle), bezeichnet. Mutationen können das Spleißen auf unterschiedliche Arten verändern (Lewandowska 2013, Desmet und Beroud 2012). Beispielsweise kann der Verlust einer Spleißakzeptorstelle dazu führen, dass die nächste 3'-liegende, intakte Spleißstelle verwendet wird, dadurch ein Exon als Intron gelesen und daher beim Spleißen entfernt wird, sodass eine aberrante mRNA entsteht (Lewandowska 2013). Es kann auch sein, dass anstatt der „zerstörten“ Spleißstelle eine sogenannte „kryptische“ Spleißstelle verwendet wird, die in der Wildtyp-Sequenz zwar vorhanden, jedoch nicht verwendet werden würde (Lewandowska 2013, Desmet und Beroud 2012). Auch dies hätte zur Folge, dass eine aberrante mRNA gebildet wird. Durch eine Mutation könnte aber auch eine neue starke Spleißstelle entstehen, welche bei Verwendung ebenfalls die Bildung einer aberranten mRNA verursachen kann (Vasu et al. 2012). Prinzipiell können Spleißmutationen auch danach unterschieden werden, ob es zu einem Verlust des offenen Leserahmens kommt oder nicht. Eine häufige Konsequenz im Fall des Verlustes des offenen Leserahmens ist der Abbau der entstehenden aberranten mRNA aufgrund eines vorzeitigen Stoppcodons über den Mechanismus des *nonsense-mediated mRNA decays* (NMD) (Popp und Maquat 2013, Fang et al. 2013); ein Protein würde von diesem Transkript nicht mehr entstehen (Fang et al. 2013). Im zweiten Fall kann es hingegen zur Expression eines aberranten Proteins kommen. Schließlich könnten Sequenzveränderungen, wie die oben in *KIT* und *CAVI* beschriebenen, regulatorische Elemente inmitten von Exons (*exonic splicing enhancers* bzw. *silencer*) oder Introns (*intron splicing enhancer* bzw. *silencer*) betreffen. Die Dysregulation solcher Elemente wurde bereits häufiger als Ursache genetisch bedingter Erkrankungen beschrieben (Blencowe 2000), wie z. B. für die *Becker Muskel Dystrophie* (BMD) (Shiga et al. 1997) oder die *Frontotemporal dementia with parkinsonism linked to chromosome 17* (FTDP-17) (D'Souza et al. 1999). In den Fällen der ungeklärten o. g. Sequenzvarianten konnten mit Hilfe von speziellen Spleißvorhersageprogrammen *in silico* zwar keine negativen Auswirkungen festgestellt werden, dennoch können endgültige Aussagen nur durch *in vitro* (z. B. *Minigene-Assay*) bzw. *in vivo* (Patienten-RNA-Analysen) Untersuchungen gemacht werden.

### **3. Optionen zur Identifizierung weiterer Krankheitsgene – Ausblick**

#### **3.1 Verwendung alternativer Locus-spezifischer Screening-Methoden**

In den in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengen *JAK2*, *FRS2*, *FRS3*, *SPRED1*, *KIT*, *CAVI*, *CAV2*, *FLT3* und *PIK3CA* konnten mittels PCR und Sequenzierung keine pathogenen

## V. Diskussion

Mutationen im Patientenkollektiv gefunden werden. Dies heißt aber nicht zwangsläufig, dass in diesen Genen keine pathogenen Mutationen vorhanden sind, denn - wie bereits erörtert - können gewisse Genveränderungen (z. B. bestimmte intragenische Deletionen und Duplikationen) mittels Sequenzierung nicht aufgedeckt werden. Zur Identifizierung intragenischer Deletionen und Duplikationen eignet sich u. a. die sogenannte *multiplex ligation-dependent probe amplification* (MLPA) (Rusu et al. 2007). Eine MLPA-Analyse für die oben genannten Kandidatengene könnte demnach zur Identifikation von pathogenen Varianten führen. Es muss allerdings eingeräumt werden, dass bei 44 mutationsnegativen Patienten mit einer Erkrankung aus dem NCFC-Syndrom-Formenkreis mittels MLPA keine Mutation in den bereits bekannten Krankheitsgenen *PTPN11*, *SOS1*, *RAF1*, *KRAS*, *BRAF*, *MEK1* und *MEK2* identifiziert wurde (Nyström et al. 2010). Derartige Mutationen wären demnach eher selten zu erwarten.

### **3.2 Rekrutierung eines größeren Patientenkollektivs**

Derzeit ist bei ca. 25% der Patienten mit Noonan-Syndrom die Ätiologie unbekannt (Tartaglia et al. 2011). Grundsätzlich ist es gerade bei einem geringen Prozentsatz mutationsnegativer Patienten wichtig, ein großes Patientenkollektiv zu wählen, um die Wahrscheinlichkeit der Entdeckung einer pathogenen Mutation zu erhöhen. Zwar erscheint das hier beschriebene Patientenkollektiv von 35 Individuen bei einer Inzidenz von 1:2500 für das Noonan-Syndrom relativ groß, dennoch könnte die Rekrutierung weiterer Patienten mit Noonan-Syndrom und die Sequenzierung der in dieser Arbeit untersuchten Kandidatengene bei diesen weiteren Patienten schließlich doch noch zur Identifizierung eines neuen Krankheitsgens für das Noonan-Syndrom führen. Darüber hinaus sollte aufgrund der klinischen Überlappungen zwischen den einzelnen RASopathien (Denayer und Legius 2007) das Patientenkollektiv um nicht eindeutig einzelnen RASopathien zuzuordnende Patienten erweitert werden. Dies könnte schließlich zum Aufdecken neuer RASopathie-assoziiierter Krankheitsgene führen.

### **3.3 Genomweite Analysen: Array CGH und NGS**

Angenommen, die analysierten Kandidatengene sind keine Krankheitsgene für das Noonan-Syndrom. Um dennoch bei mutationsnegativen Patienten das ursächliche Krankheitsgen zu finden, bieten sich heutzutage in erster Linie genomweite Analysen an. Mittels der *array*

## V. Diskussion

*comparative genomic hybridization* (array CGH) können submikroskopische Deletionen und Duplikationen, sogenannte *copy number variations* (CNVs) genomweit aufgedeckt werden, so dass Limitierungen von Locus-spezifischen Techniken (z. B. MLPA) keine Rolle mehr spielen (Sireteanu et al. 2012). Die *next generation sequencing technology* (NGS) eröffnet die Möglichkeit, zeitsparend und kosteneffektiv das ganze Genom (gesamtdenomische Sequenzierung) oder die kodierenden Bereiche (Exom-Sequenzierung) zu sequenzieren und in allen sequenzierten Regionen über den EDV-gestützten Vergleich mit vorhandenen Datenbanken nach der einen pathogenen Sequenzvariante zu suchen (Mardis 2008). Zahlreiche Krankheitsgene konnten mit Hilfe der NGS-Technologie schon identifiziert werden (Veltman und Brunner 2012, Meyerson et al. 2010). Auch für die hier untersuchte Fragestellung erscheint dieser Ansatz mittels NGS-Technologie als der mit der größten Erfolgsaussicht.

## **VI. Zusammenfassung**

Das Noonan-Syndrom ist ein vergleichsweise häufiges kongenitales Fehlbildungssyndrom (Prävalenz: 1:1000 – 1:2500), das autosomal-dominant vererbt wird und zumeist sporadisch aufgrund von Neumutationen auftritt. Gekennzeichnet wird diese Erkrankung durch Kleinwuchs, typische faziale Dysmorphiezeichen, kurzen Nacken, charakteristische Herzanomalien und eine Prädisposition für bestimmte hämatologische Tumorerkrankungen (z. B. JMML). Das Noonan-Syndrom zeigt klinische Überschneidungen mit dem kardio-fazio-kutanen-Syndrom, dem Costello-Syndrom, dem Legius-Syndrom, der Neurofibromatose Typ 1, dem LEOPARD-Syndrom und mit dem Noonan-ähnlichen Syndrom (*Noonan syndrome with loose anagen hair*) und wird deshalb mit diesen Erkrankungen unter den Begriffen RASopathien und Neuro-kardio-fazio-kutane Syndrome zusammengefasst. Bei ungefähr 75% der Patienten mit Noonan-Syndrom oder ähnlichem klinischen Bild kann der ursächliche Gendefekt in einem der acht Gene *PTPN11*, *SOS1*, *KRAS*, *NRAS*, *RAF1*, *SHOC2*, *CBL* und *RIT1* aufgedeckt werden. Diese kodieren alle für wichtige Signaltransduktionsproteine, welche RAS-abhängige Signalwege regulieren und so eine Vielzahl an zellulären Prozessen, wie z. B. Zellproliferation, Zellwachstum, Zelldifferenzierung oder Zellüberleben steuern. Da bei etwa 25% der Patienten mit Noonan-Syndrom keine Mutation in einem der o. g. Gene gefunden wird, werden weitere Krankheitsgene für dieses Syndrom vermutet. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DNA-Proben von 35 mutationsnegativen Patienten mit Noonan-Syndrom einer Mutationsanalyse mittels DNA-Sequenzierung nach Sanger unterzogen. Im Detail wurden neun Kandidatengene für das Noonan-Syndrom analysiert: (I) Da beim Noonan-Syndrom hämatologische Tumorerkrankungen auftreten, wurden vier Leukämie-assoziierte Gene (*KIT*, *FLT3*, *JAK2* und *PIK3CA*) sequenziert, (II) drei funktionelle Kandidatengene (*FRS2*, *FRS3* und *SPRED1*) wurden aufgrund ihrer Beteiligung an der Regulation der RAS-abhängigen Signalwege analysiert und (III) zwei Kandidatengene (*CAVI* und *CAV2*) wurden aufgrund von zum Noonan-Syndrom phänotypischen Überlappungen bei Tiermodellen ausgewählt. In sechs dieser Kandidatengene wurden insgesamt 10 exonische und 6 intronische Sequenzvarianten gefunden, von denen 13 durch Datenbankrecherchen als Einzel-Nukleotid-Polymorphismen identifiziert und somit als humanpathogen ausgeschlossen werden konnten. Für die drei ungeklärten Sequenzvarianten, von denen zwei intronische in *CAVI* und eine exonische in *KIT* aufgedeckt wurden, konnten *in silico* mit Hilfe von EDV-gestützten Vorhersageprogrammen zu möglichen mutationsbedingten Veränderungen beim Spleißen der

## VI. Zusammenfassung

prä-mRNA keine negativen Auswirkungen postuliert werden. Endgültige Aussagen zu einer Pathogenität dieser Varianten können jedoch nur durch *in vitro* bzw. *in vivo* Untersuchungen gemacht werden.

Zusammengefasst führte die Mutationsanalyse der o. g. neun Kandidatengene nicht zur Beschreibung eines weiteren Krankheitsgens für das Noonan-Syndrom; mögliche Ursachen für dieses Ergebnis werden in der Arbeit diskutiert. Als Krankheitsgene für das Noonan-Syndrom ausgeschlossen werden können die hier analysierten Gene jedoch nicht, da gewisse Sequenzveränderungen, wie z. B. Exon-übergreifende Duplikationen, durch die gewählte Analysemethoden nicht feststellbar sind. Schließlich wird ein Ausblick gegeben, welche modernen humangenetischen Analysen (z. B. Exomsequenzierung) vielversprechend sind, um im vorhandenen Patientenkollektiv neue Krankheitsgene für das Noonan-Syndrom und ähnliche Erkrankungen zu identifizieren.

## **VII. Abkürzungsverzeichnis**

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
Abb.	Abbildung
ALL	Akute lymphatische Leukämie
AML	Akute myeloische Leukämie
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
ASD	Vorhofseptumdefekt
Array-CGH	Microarray-basierte comparative genomische Hybridisierung
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
bp	Basenpaar(e)
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c.	Nukleotidposition in der Kodierregion eines Gens ( <i>coding sequence</i> )
CAV	Caveolin, Caveolae Protein
CBL	<i>Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence</i>
cDNA	<i>copy</i> -Desoxyribonukleinsäure
CFC-Syndrom	<i>cardio-facio-cutaneous</i> (kardio-fazio-kutanes)-Syndrom
CMML	Chronische Myelomonozytäre Leukämie
CNV	<i>copy number variation</i>
COOH-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
CS	Costello-Syndrom
CRAF/RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP, ddNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>

## VII. Abkürzungsverzeichnis

EKG	Elektrokardiogramm
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	„et altera“ (und Andere)
EtOH	Ethanol
F	<i>forward</i>
FLT	<i>Fms-Related Tyrosine Kinase</i>
FRS	<i>Fibroblast Growth Factor Receptor Substrate</i>
FS	Fail Safe
Fwd	<i>forward</i>
g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G	Guanin
GAP	<i>GTPase activating protein</i> (GTPase aktivierendes Protein)
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GRB2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
h	<i>hour</i> , Stunde
H(O)CM	Hypertrophe (obstructive) Kardiomyopathie
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> (Chromatographieverfahren)
HRAS	<i>v-ha-ras harvey-rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
JAK	Janus Kinase
JMML	Juvenile Myelomonozytäre Leukämie
Kb	Kilobase
KIT	<i>V-Kit Hardy-Zuckerman 4 Feline Sarcoma Viral Oncogene Homolog</i>
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LRR	leucine-rich repeat
cm, mm, µm, nm	Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
mA	Milli-Ampere
M, mM	Mol, Mikromol

## VII. Abkürzungsverzeichnis

MAPK/MKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
MEK1/2	Mitogen-aktivierte ERK-Kinase 1/2
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
min	Minute
mol, mmol, $\mu$ mol	Mol, Millimol, Mikromol
NCFC-Syndrom	<i>neuro-cardio-facio-cutaneous</i> (neuro-kardio-fazio-kutanes)-Syndrom
NF1	Neurofibromin 1
NMD	<i>nonsense-mediated mRNA decays</i>
NRAS	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
NS	Noonan-Syndrom
n. d.	nicht dokumentiert
o. g.	oben genannt
P3	3. Perzentile der gleichaltrigen Bevölkerung
P10	10. Perzentile der gleichaltrigen Bevölkerung
p38	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PAA	Polyacrylamid
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	Privatdozent
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Katalytische Einheit von PI3K
Prof	Professor
PTPN11	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RALGDS	<i>Ral Guanine nucleotide Dissociation Stimulator</i>
RAL-GEF	<i>Ral Guanine nucleotide Exchange Factor</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
R	<i>reverse</i>
Rev	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure

## VII. Abkürzungsverzeichnis

RIT1	<i>Ras-Like Without CAAX 1</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i> (Umdrehungen pro Minute)
s	Sekunde
SCF	<i>stem cell factor</i>
SHOC2	<i>soc-2 suppressor of clear homolog (C. elegans)</i>
SHP2	Src-Homologieregion 2 beinhalten Phosphatase 2
SNP	<i>single nucleotide polymorphisme</i>
SOS1	<i>son of sevenless, homolog 1, Drosophila</i>
sog.	sogenannte/en
SPRED	<i>Sprouty-Related, EVH1 Domain Containing</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
U	<i>Units</i>
u. a.	unter anderem
UV	Ultraviolett
V	Volt
VSD	Ventrikelseptumdefekt
v/v	<i>volume per volume</i>
z. B.	zum Beispiel

## VIII. Literaturverzeichnis

**Allanson JE. (1987).**

Noonan syndrome. *J Med Genet* 24(1):9-13.

**Allanson JE, Bohring A, Dörr HG, Dufke A, Gillessen-Kaesbach G, Horn D, König R, Kratz CP, Kutsche K, Pauli S, Raskin S, Rauch A, Turner A, Wiczorek D, Zenker M. (2010).**

The face of Noonan syndrome: Does phenotype predict genotype. *Am J Med Genet A*. 152A(8):1960-6..

**Aoki Y, Niihori T, Banjo T, Okamoto N, Mizuno S, Kurosawa K, Ogata T, Takada F, Yano M, Ando T, Hoshika T, Barnett C, Ohashi H, Kawame H, Hasegawa T, Okutani T, Nagashima T, Hasegawa S, Funayama R, Nagashima T, Nakayama K, Inoue S, Watanabe Y, Ogura T, Matsubara Y. (2013).**

Gain-of-Function Mutations in *RIT1* Cause Noonan Syndrome, a RAS/MAPK Pathway Syndrome. *Am J Hum Genet*. 93(1):173-80.

**Ars E, Kruyer H, Gaona A, Serra E, Lazaro C, Estivill X. (1999).**

Prenatal diagnosis of sporadic neurofibromatosis type 1 (NF1) by RNA and DNA analysis of a splicing mutation. *Prenat Diagn* 19(8):739-42

**Baralle D and Baralle M. (2005).**

Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet*. 42(10): 737-748.

**Bastida P, García-Miñaur S, Ezquieta B, Dapena JL, Sanchez de Toledo J. (2011).**

Myeloproliferative disorder in Noonan syndrome. *J Pediatr Hematol Oncol*. 33(1):e43-5.

**Baxter EJ, Scott LM, Campbell PJ, East C, Fourouclas N, Swanton S, Vassiliou GS, Bench AJ, Boyd EM, Curtin N, Scott MA, Erber WN, Green AR; Cancer Genome Project Lancet. (2005).**

Acquired mutation of the tyrosine kinase *JAK2* in human myeloproliferative disorders. *Nature* 437(7053):232-237.

**Bertola DR, Kim CA, Sugayama SM, Albano LM, Wagenführ J, Moysés RL, Gonzalez CH. (2000).**

Cardiac findings in 31 patients with Noonan's syndrome. *Arq Bras Cardiol*. 75(5):409-12.

**Birg F, Rosnet O, Carbuccia N, Birnbaum D. (1994).**

The expression of FMS, KIT and FLT3 in hematopoietic malignancies. *Leuk Lymphoma*. 13(3-4):223-7.

**Blencowe BJ. (2000).**

Exonic splicing enhancers: mechanism of action, diversity and role in human genetic diseases. *Trends Biochem Sci*. 25(3):106-10.

**Blue GM, Kirk EP, Sholler GF, Harvey RP, Winlaw DS. (2012).**

Congenital heart disease: current knowledge about causes and inheritance. *Med J Aust*. 197(3):155-9.

**Boscher C, Nabi IR. (2012).**

Caveolin-1: role in cell signaling. *Adv Exp Med Biol*. 729:29-50.

**Brandts CH, Sargin B, Rode M, Biermann C, Lindtner B, Schwäble J, Buerger H, Müller-Tidow C, Choudhary C, McMahon M, Berdel WE, Serve H. (2005).**

Constitutive activation of Akt by Flt3 internal tandem duplications is necessary for increased survival, proliferation, and myeloid transformation. *Cancer Res*. 65(21):9643-50.

**Brems H, Legius E. (2013).**

Legius syndrome, an Update. *Molecular pathology of mutations in SPRED1*. *Keio J Med*. 62(4):107-12.

**Brems H, Chmara M, Sahbatou M, et al. (2007).**

Germline loss-of-function mutations in *SPRED1* cause a neurofibromatosis 1-like phenotype. *Nat Genet* 39:1120-1126.

## VIII. Literaturverzeichnis

- Burgermeister E, Friedrich T, Hitkova I, Regel I, Einwächter H, Zimmermann W, Röcken C, Perren A, Wright MB, Schmid RM, Seger R, Ebert MP. (2011).**  
The Ras inhibitors caveolin-1 and docking protein 1 activate peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  through spatial relocalization at helix 7 of its ligand-binding domain. *Mol Cell Biol.* 31(16):3497-510.
- Chen B, Bronson RT, Klamann LD, Hampton TG, Wang JF, Green PJ, Magnuson T, Douglas PS, Morgan JP, Neel BG. (2000).**  
Mice mutant for *Egfr* and *Shp2* have defective cardiac semilunar valvulogenesis. *Nat Genet.* 24(3):296-9.
- Chillón MC, Gómez-Casares MT, López-Jorge CE, Rodríguez-Medina C, Molines A, Sarasquete ME, Alcoceba M, Miguel JD, Bueno C, Montes R, Ramos F, Rodríguez JN, Giraldo P, Ramírez M, García-Delgado R, Fuster JL, González-Díaz M, Menendez P. (2012).**  
Prognostic significance of *FLT3* mutational status and expression levels in MLL-AF4+ and MLL-germline acute lymphoblastic leukemia. *26(11):2360-6.*
- Cirstea IC, Kutsche K, Dvorsky R, Gremer L, Carta C, Horn D, Roberts AE, Lepri F, Merbitz-Zahradnik T, König R, Kratz CP, Pantaleoni F, Dentici ML, Joshi VA, Kucherlapati RS, Mazzanti L, Mundlos S, Patton MA, Silengo MC, Rossi C, Zampino G, Digilio C, Stuppia L, Seemanova E, Pennacchio LA, Gelb BD, Dallapiccola B, Wittinghofer A, Ahmadian MR, Tartaglia M, Zenker M. (2009).**  
A restricted spectrum of *NRAS* mutations causes Noonan syndrome. *Nat Genet.* 42(1):27-9.
- Cohen AW, Park DS, Woodman SE, Williams TM, Chandra M, Shirani J, Pereira de Souza A, Kitsis RN, Russell RG, Weiss LM, Tang B, Jelicks LA, Factor SM, Shtutin V, Tanowitz HB, Lisanti MP. (2003).**  
Caveolin-1 null mice develop cardiac hypertrophy with hyperactivation of p42/44 MAP kinase in cardiac fibroblasts. *Am J Physiol Cell Physiol.* 284(2):C457-74.
- Cordeddu V, Di Schiavi E, Pennacchio LA, Ma'ayan A, Sarkozy A, Fodale V, Cecchetti S, Cardinale A, Martin J, Schackwitz W, Lipzen A, Zampino G, Mazzanti L, Digilio MC, Martinelli S, Flex E, Lepri F, Bartholdi D, Kutsche K, Ferrero GB, Anichini C, Selicorni A, Rossi C, Tenconi R, Zenker M, Merlo D, Dallapiccola B, Iyengar R, Bazzicalupo P, Gelb BD, Tartaglia M. (2009).**  
Mutation of *SHOC2* promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair. *Nat Genet.* 41(9):1022-6.
- Costello JM. (1996).**  
Costello syndrome: update on the original cases and commentary. *Am J Med Genet.* 62(2):199-201.
- Davies SJ, Hughes HE. (1994).**  
Costello syndrome: natural history and differential diagnosis of cutis laxa. *J Med Genet.* 31(6):486-9.
- Dean FB, Nelson JR, Giesler TL, Lasken RS. (2001).**  
Rapid Amplification of Plasmid and Phage DNA Using Phi29 DNA Polymerase and Multiply-Primed Rolling Circle Amplification. *Genome Res.* 11(6): 1095–1099.
- Debiec-Rychter M, Lasota J, Sarlomo-Rikala M, Kordek R, Miettinen M. (2001).**  
Chromosomal aberrations in malignant gastrointestinal stromal tumors: correlation with c-KIT gene mutation. *Cancer Genet Cytogenet.* 128(1):24-30.
- de Haan M, vd Kamp JJ, Briët E, Dubbeldam J. (1988).**  
Noonan syndrome: partial factor XI deficiency. *Am J Med Genet.* 29(2):277-82.
- de Vries AC, Stam RW, Schneider P, Niemeyer CM, van Wering ER, Haas OA, Kratz CP, den Boer ML, Pieters R, van den Heuvel-Eibrink MM. (2007).**  
Role of mutation independent constitutive activation of FLT3 in juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 92(11):1557-60.
- de Vries AC, Zwaan CM, van den Heuvel-Eibrink MM. (2010).**  
Molecular basis of juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 95(2): 179–182.
- Denayer E, Legius E. (2007).**  
What's new in the neuro-cardio-facial-cutaneous syndromes? *Eur J Pediatr.* 166(11):1091-8.

## VIII. Literaturverzeichnis

**Denayer E, Chmara M, Brems H, Kievit AM, van Bever Y, Van den Ouweland AM, Van Minkelen R, De Goede-Bolder A, Oostenbrink R, Lakeman P, Beert E, Ishizaki T, Mori T, Keymolen K, Van den Ende J, Mangold E, Peltonen S, Brice G, Rankin J, Van Spaendonck-Zwarts KY, Yoshimura A, Legius E. (2011).**

Legius syndrome in fourteen families. *Hum Mutat.* 32(1):E1985-98.

**Desmet FO, Bérout C. (2012).**

Bioinformatics and mutations leading to exon skipping. *Methods Mol Biol.* 867:17-35.

**Digilio MC, Sarkozy A, Pacileo G, Limongelli G, Marino B, Dallapiccola B. (2006).**

PTPN11 gene mutations: linking the Gln510Glu mutation to the "LEOPARD syndrome phenotype". *Eur J Pediatr.* 165(11):803-5.

**Di Rocco M, Gatti R, Gandullia P, Barabino A, Picco P, Borrone C. (1993).**

Report on two patients with Costello syndrome and sialuria. *Am J Med Genet* 47, 1135-1140.

**D'Souza I, Poorkaj P, Hong M, Nochlin D, Lee VM, Bird TD, Schellenberg GD. (1999).**

Missense and silent tau gene mutations cause frontotemporal dementia with parkinsonism-chromosome 17 type, by affecting multiple alternative RNA splicing regulatory elements. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96(10):5598-603.

**Emanuel PD. (2004).**

Juvenile myelomonocytic leukemia. *Curr Hematol Rep.* 3(3):203-9.

**Fang Y, Bateman JF, Mercer JF, Lamandé SR. (2013).**

Nonsense-mediated mRNA decay of collagen -emerging complexity in RNA surveillance mechanisms. *J Cell Sci.* 126(Pt 12):2551-60.

**Fenic I, Steger K, Gruber C, Arens C, Woenckhaus J. (2007).**

Analysis of PIK3CA and Akt/protein kinase B in head and neck squamous cell carcinoma. *Oncol Rep.* 18(1):253-9.

**Feuk L, Carson AR, Scherer SW. (2006).**

Structural variation in the human genome. *Nat Rev Genet.* 7(2):85-97.

**Flotho C, Valcamonica S, Mach-Pascual S, Schmahl G, Corral L, Ritterbach J, Hasle H, Aricò M, Biondi A, Niemeyer CM. (1999).**

RAS mutations and clonality analysis in children with juvenile myelomonocytic leukemia (JMML). *Leukemia.* 13(1):32-7.

**Flotho C, Kratz CP, Niemeyer CM. (2007a).**

Targeting RAS signaling pathways in juvenile myelomonocytic leukemia. *Curr Drug Targets.* 8(6):715-25. Review.

**Flotho C, Kratz CP, Niemeyer CM. (2007b).**

How a rare neoplasia can give important insights into biological concepts: a perspective on juvenile myelomonocytic leukemia. *Haematologica.* 92(11):1441-6. Review.

**Friedman JM. (2002).**

Neurofibromatosis 1: clinical manifestations and diagnostic criteria. *J Child Neurol.* 17(8):548-54.

**Fröhling S, Scholl C, Gilliland DG, Levine RL. (2005).**

Genetics of myeloid malignancies: pathogenetic and clinical implications. *J Clin Oncol.* 23(26):6285-95.

**Goldfinger LE. (2008).**

Choose your own path: specificity in Ras GTPase signaling. *Mol Biosyst.* 4(4):293-9.

**Grandage VL, Gale RE, Linch DC, Khwaja A. (2005).**

PI3-kinase/Akt is constitutively active in primary acute myeloid leukaemia cells and regulates survival and chemoresistance via NF-kappaB, Mapkinase and p53 pathways. *Leukemia.* 19(4):586-94.

## VIII. Literaturverzeichnis

**Gripp KW, Scott CI Jr, Nicholson L, McDonald-McGinn DM, Ozeran JD, Jones MC, Lin AE, Zackai EH. (2002).**

Five additional Costello syndrome patients with rhabdomyosarcoma: proposal for a tumor screening protocol. *Am J Med Genet* 108, 80-87.

**Hadari YR, Kouhara H, Lax I, Schlessinger J. (1998).**

Binding of Shp2 tyrosine phosphatase to FRS2 is essential for fibroblast growth factor-induced PC12 cell differentiation. *Mol Cell Biol.* 18(7):3966-73.

**Harris IS, Zhang S, Treskov I, Kovacs A, Weinheimer C, Muslin AJ. (2004).**

Raf-1 kinase is required for cardiac hypertrophy and cardiomyocyte survival in response to pressure overload. *Circulation.* 10;110(6):718-23.

**Hasle H. (2009).**

Malignant diseases in Noonan syndrome and related disorders. *Horm Res.* 72 Suppl 2:8-14.

**Havens MA, Duelli DM, Hastings ML. (2013).**

Targeting RNA splicing for disease therapy. *Wiley Interdiscip Rev RNA.* 4(3):247-66.

**Hastings PJ, Lupski JR, Rosenberg SM, Ira G. (2009).**

Mechanisms of change in gene copy number. *Nat Rev Genet.* (8):551-64.

**Heinrich M, Müller 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(6):361-3.

**Hennekam RC. (2003).**

Costello syndrome: an overview. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 117:42-48.

**Hnasko R, Lisanti MP. (2003).**

The biology of caveolae: lessons from caveolin knockout mice and implications for human disease. *Mol Interv.* 3(8):445-64.

**Hosono S, Faruqi AF, Dean FB, Du Y, Sun Z, Wu X, Du J, Kingsmore SF, Egholm M, Lasken RS. (2003).**

Unbiased Whole-Genome Amplification Directly From Clinical Samples. *Genome Res.* 13(5): 954-964.

**Ikezu T, Ueda H, Trapp BD, Nishiyama K, Sha JF, Volonte D, Galbiati F, Byrd AL, Bassell G, Serizawa H, Lane WS, Lisanti MP, Okamoto T. (1998).**

Affinity-purification and characterization of caveolins from the brain: differential expression of caveolin-1, -2, and -3 in brain endothelial and astroglial cell types. *Brain Res.* 804(2):177-92.

**Izumikawa Y, Naritomi K, Tohma T, Shiroma N, Hirayama K. (1993).**

The Costello syndrome: a boy with thick mitral valves and arrhythmias. *Jpn J Hum Genet.* 38(3):329-34.

**Jacoby D, McKenna WJ. (2012).**

Genetics of inherited cardiomyopathy. *Eur Heart J.* 33(3):296-304.

**James C, Ugo V, Le Couédic JP, Staerk J, Delhommeau F, Lacout C, Garçon L, Raslova H, Berger R, Bennaceur-Griscelli A, Villeval JL, Constantinescu SN, Casadevall N, Vainchenker W. (2005a).**

A unique clonal *JAK2* mutation leading to constitutive signalling causes polycythaemia vera. *Nature.* 434(7037):1144-8.

**James C, Ugo V, Casadevall N, Constantinescu SN, Vainchenker W. (2005b).**

A *JAK2* mutation in myeloproliferative disorders: pathogenesis and therapeutic and scientific prospects. *Trends Mol Med.* 11(12):546-54.

**Jaroszewski D, Notrica D, McMahon L, Steidley DE, Deschamps C. (2010).**

Current management of pectus excavatum: a review and update of therapy and treatment recommendations. *J Am Board Fam Med.* 23(2):230-9.

## VIII. Literaturverzeichnis

**Jorge AA, Malaquias AC, Arnhold IJ, Mendonca BB. (2009).**

Noonan syndrome and related disorders: a review of clinical features and mutations in genes of the RAS/MAPK pathway. *Horm Res.* 71(4):185-93.

**Kelnar CJ. (2000).**

Growth hormone therapy in noonan syndrome. *Horm Res.* 53 Suppl 1:77-81.

**Khwaja A. (2010).**

PI3K as a target for therapy in haematological malignancies. *Curr Top Microbiol Immunol.* 347:169-88.

**Koblinsky O. (1883).**

Ueber eine flughautähnliche Ausbreitung am Halse. *Archiv für Anthropologie, Braunschweig,* 14: 343.

**Kondo I, Tamanaha K, Ashimine K. (1993).**

The Costello syndrome: report of a case and review of the literature. *Jpn J Hum Genet* 38, 433-436.

**Kralovics R, Passamonti F, Buser AS, Teo SS, Tiedt R, Passweg JR, Tichelli A, Cazzola M, Skoda RC. (2005).**

A gain-of-function mutation of *JAK2* in myeloproliferative disorders. *N Engl J Med.* 28;352(17):1779-90.

**Kratz CP, Niemeyer CM, Castleberry RP, Cetin M, Bergsträsser E, Emanuel PD, Hasle H, Kardos G, Klein C, Kojima S, Stary J, Trebo M, Zecca M, Gelb BD, Tartaglia M, Loh ML (2005).**

The mutational spectrum of *PTPN11* in juvenile myelomonocytic leukemia and Noonan Syndrome/myeloproliferative disease. *Blood* 106:2183-2185.

**Kratz CP, Niemeyer CM, Zenker M. (2007).**

An unexpected new role of mutant Ras: perturbation of human embryonic development. *J Mol Med (Berl).* 85(3):227-35.

**Kubota Y, Ohnishi H, Kitanaka A, Ishida T, Tanaka T. (2004).**

Constitutive activation of PI3K is involved in the spontaneous proliferation of primary acute myeloid leukemia cells: direct evidence of PI3K activation. *Leukemia.* 18(8):1438-40.

**Lachenaud J, Strullu M, Baruchel A, Cavé H. (2014).**

[Juvenile myelomonocytic leukemias]. [Article in French]. *Bull Cancer.* 101(3):302-13.

**Lai YL, Mau BL, Cheng WH, Chen HM, Chiu HH, Tzen CY. (2008).**

*PIK3CA* exon 20 mutation is independently associated with a poor prognosis in breast cancer patients. *Ann Surg Oncol.* 15(4):1064-9.

**Le Lay S, Hajduch E, Lindsay MR, Le Lièpvre X, Thiele C, Ferré P, Parton RG, Kurzchalia T, Simons K, Dugail I. (2006).**

Cholesterol-induced caveolin targeting to lipid droplets in adipocytes: a role for caveolar endocytosis. *Traffic.* 7(5):549-61.

**Lee DA, Portnoy S, Hill P, Gillberg C, Patton MA. (2005).**

Psychological profile of children with Noonan syndrome. *Dev Med Child Neurol.* 47(1):35-8.

**Lee S, Kwon H, Jeong K, Pak Y. (2011).**

Regulation of cancer cell proliferation by caveolin-2 down-regulation and re-expression. *Int J Oncol.* 38(5):1395-402.

**Lee JH, Kim Y, Choi JW, Kim YS. (2013).**

Correlation of imatinib resistance with the mutational status of *KIT* and *PDGFRA* genes in gastrointestinal stromal tumors: a meta-analysis. *J Gastrointest Liver Dis.* 22(4):413-8.

## VIII. Literaturverzeichnis

**Levine RL, Wadleigh M, Cools J, Ebert BL, Wernig G, Huntly BJ, Boggon TJ, Wlodarska I, Clark JJ, Moore S, Adelsperger J, Koo S, Lee JC, Gabriel S, Mercher T, D'Andrea A, Fröhling S, Döhner K, Marynen P, Vandenberghe P, Mesa RA, Tefferi A, Griffin JD, Eck MJ, Sellers WR, Meyerson M, Golub TR, Lee SJ, Gilliland DG. (2005).**

Activating mutation in the tyrosine kinase JAK2 in polycythemia vera, essential thrombocythemia, and myeloid metaplasia with myelofibrosis. *Cancer Cell*. 7(4):387-97.

**Li L, Lyu XD, Mi RH, Ding J, Chen L, Wang Q, Yin QS, Hu JY, Fan RH, Wei XD. (2013).**

[Detection of *NPM1*, *FLT3* and *C-KIT* mutations in acute myeloid leukemia and their prognostic analysis]. [Article in Chinese]. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi* (3):601-6.

**Liang J1, Wu YL, Chen BJ, Zhang W, Tanaka Y, Sugiyama H. (2013).**

The C-kit receptor-mediated signal transduction and tumor-related diseases. *Int J Biol Sci*.9(5):435-43.

**Lin AE, Grossfeld PD, Hamilton RM, Smoot L, Gripp KW, Proud V, Weksberg R, Wheeler P, Picker J, Irons M, Zackai E, Marino B, Scott CI Jr, Nicholson L. (2002).**

Further delineation of cardiac abnormalities in Costello syndrome. *Am J Med Genet* 111, 115-129.

**Loh ML, Sakai DS, Flotho C, Kang M, Fliegauf M, Archambeault S, Mullighan CG, Chen L, Bergstraesser E, Bueso-Ramos CE, Emanuel PD, Hasle H, Issa JP, van den Heuvel-Eibrink MM, Locatelli F, Stary J, Trebo M, Wlodarski M, Zecca M, Shannon KM, Niemeyer CM. (2009).**

Mutations in *CBL* occur frequently in juvenile myelomonocytic leukemia. *Blood*. 114(9):1859-63.

**Mardis ER. (2008).**

The impact of next-generation sequencing technology on genetics. *Trends Genet*. 24(3):133-41.

**Martinelli S, De Luca A, Stellacci E, Rossi C, Checquolo S, Lepri F, Caputo V, Silvano M, Buscherini F, Consoli F, Ferrara G, Digilio MC, Cavaliere ML, van Hagen JM, Zampino G, van der Burgt I, Ferrero GB, Mazzanti L, Screpanti I, Yntema HG, Nillesen WM, Savarirayan R, Zenker M, Dallapiccola B, Gelb BD, Tartaglia M. (2010).**

Heterozygous germline mutations in the *CBL* tumor-suppressor gene cause a Noonan syndrome-like phenotype. *Am J Hum Genet*. 87(2):250-7.

**Mattison RJ, Ostler KR, Locke FL, Godley LA. (2007).**

Implications of *FLT3* mutations in the therapy of acute myeloid leukemia. *Rev Recent Clin Trials*. 2(2):135-41.

**Mautner, V.-F., Nguyen, R., Bernhard, A., Kodolitsch, Y., Zenker, M., Kutsche, K. (2010).**

Neuro-kardio-fazio-kutane Syndrome. *Medizinische Genetik* 22: 10-19.

**Messiaen L, Yao S, Brems H, Callens T, Sathienkijkanchai A, Denayer E, Spencer E, Arn P, Babovic-Vuksanovic D, Bay C, Bobele G, Cohen BH, Escobar L, Eunpu D, Grebe T, Greenstein R, Hachen R, Irons M, Kronn D, Lemire E, Leppig K, Lim C, McDonald M, Narayanan V, Pearn A, Pedersen R, Powell B, Shapiro LR, Skidmore D, Tegay D, Thiese H, Zackai EH, Vijzelaar R, Taniguchi K, Ayada T, Okamoto F, Yoshimura A, Parret A, Korf B, Legius E. (2009).**

Clinical and mutational spectrum of neurofibromatosis type 1-like syndrome. *JAMA*. 18;302(19):2111-8.

**Meyerson M, Gabriel S, Getz G. (2010).**

Advances in understanding cancer genomes through second-generation sequencing. *Nat Rev Genet*. 11:685–96.

**Min YH, Eom JI, Cheong JW, Maeng HO, Kim JY, Jeung HK, Lee ST, Lee MH, Hahn JS, Ko YW. (2003).**

Constitutive phosphorylation of Akt/PKB protein in acute myeloid leukemia: its significance as a prognostic variable. *Leukemia*. 17(5):995-7.

**Moreno C, Delgado MD, Martí E, Fuentes S, Morante R, Cano I, Gómez A. (2011).**

[Conservative treatment of the pectus carinatum]. [Article in Spanish]. *Cir Pediatr*. 24(2):71-4.

**Mullis KB, Faloona FA. (1987).**

Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*. 155:335-50.

## VIII. Literaturverzeichnis

**Niemeyer CM, Kratz C. (2003).**

Juvenile myelomonocytic leukemia. *Curr Treat Options Oncol.* 4(3):203-10.

**Niemeyer CM, Kang MW, Shin DH, Furlan I, Erlacher M, Bunin NJ, Bunda S, Finklestein JZ, Sakamoto KM, Gorr TA, Mehta P, Schmid I, Kropshofer G, Corbacioglu S, Lang PJ, Klein C, Schlegel PG, Heinzmann A, Schneider M, Starý J, van den Heuvel-Eibrink MM, Hasle H, Locatelli F, Sakai D, Archambeault S, Chen L, Russell RC, Sybingco SS, Ohh M, Braun BS, Flotho C, Loh ML. (2010).** Germline *CBL* mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia. *Nat Genet.* 42(9):794-800.

**Noonan JA. (1968).**

Hypertelorism with Turner phenotype: a new syndrome with associated congenital heart disease. *Am J Dis Child* 116:373-380.

**Noonan JA, Ehmke DA. (1963).**

Associated noncardiac malformations in children with congenital heart disease. *J Pediatr* 63: 468-470.

**Nyström AM, Ekvall S, Thuresson AC, Denayer E, Legius E, Kamali-Moghaddam M, Westermark B, Annerén G, Bondeson ML. (2010).**

Investigation of gene dosage imbalances in patients with Noonan syndrome using multiplex ligation-dependent probe amplification analysis. *Eur J Med Genet.* 53(3):117-21.

**Ong SH, Guy GR, Hadari YR, Laks S, Gotoh N, Schlessinger J, Lax I. (2000).**

FRS2 proteins recruit intracellular signaling pathways by binding to diverse targets on fibroblast growth factor and nerve growth factor receptors. *Mol Cell Biol.* 20(3):979-89.

**Pandit B, Sarkozy A, Pennacchio LA, Carta C, Oishi K, Martinelli S, Pogna EA, Schackwitz W, Ustaszewska A, Landstrom A, Bos JM, Ommen SR, Esposito G, Lepri F, Faul C, Mundel P, López Sigüero JP, Tenconi R, Selicorni A, Rossi C, Mazzanti L, Torrente I, Marino B, Digilio MC, Zampino G, Ackerman MJ, Dallapiccola B, Tartaglia M, Gelb BD. (2007).**

Gain-of-function *RAF1* mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy. *Nat Genet* 39(8):1007-12.

**Panneerselvam M, Patel HH, Roth DM. (2012).**

Caveolins and heart diseases. *Adv Exp Med Biol.* 729:145-56.

**Patton MA, Baraitser M. (1993).**

Cutis laxa and the Costello syndrome. *J Med Genet.* 30(7):622.

**Pérez B, Mechinaud F, Galambrun C, Ben Romdhane N, Isidor B, Philip N, Derain-Court J, Cassinat B, Lachenaud J, Kalténbach S, Salmon A, Désirée C, Pereira S, Menot ML, Royer N, Fenneteau O, Baruchel A, Chomienne C, Verloes A, Cavé H. (2010).**

Germline mutations of the *CBL* gene define a new genetic syndrome with predisposition to juvenile myelomonocytic leukaemia. *J Med Genet.* 47(10):686-91.

**Pich A, Riera L, Sismondi F, Godio L, Davico Bonino L, Marmont F, Francia di Celle P. (2009).**

*JAK2* V617F activating mutation is associated with the myeloproliferative type of chronic myelomonocytic leukaemia. *J Clin Pathol.* 62(9):798-801.

**Popp MW, Maquat LE. (2013).**

Organizing principles of mammalian nonsense-mediated mRNA decay. *Annu Rev Genet.* 47:139-65.

**Pratesi R, Santos M, Ferrari I. (1998).**

Costello syndrome in two Brazilian children. *J Med Genet* 35, 54-57.

**Quintanar-Audelo M, Yusoff P, Sinniah S, Chandramouli S, Guy GR. (2011).**

Sprouty-related Ena/vasodilator-stimulated phosphoprotein homology 1-domain-containing protein (SPRED1), a tyrosine-protein phosphatase non-receptor type 11 (SHP2) substrate in the Ras/extracellular signal-regulated kinase (ERK) pathway. *J Biol Chem.* 286(26):23102-12.

## VIII. Literaturverzeichnis

- Raaijmakers R, Noordam C, Noonan JA, Croonen EA, van der Burgt CJ, Draaisma JM. (2008).**  
Are ECG abnormalities in Noonan syndrome characteristic for the syndrome? *Eur J Pediatr.* 167(12):1363-7.
- Rane SG, Reddy EP. (2000).**  
Janus kinases: components of multiple signaling pathways. *Oncogene.* 19(49):5662-79.
- Ranke MB, Heidemann P, Knupfer C, Enders H, Schmaltz AA, Bierich JR. (1988).**  
Noonan syndrome: growth and clinical manifestations in 144 cases. *Eur J Pediatr.* 148(3):220-7.
- Rauen KA. (2013).**  
The RASopathies. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 14:355-69.
- Razani B, Lisanti MP. (2001).**  
Caveolin-deficient mice: insights into caveolar function human disease. *J Clin Invest.* 108(11):1553-61.
- Razani B, Wang XB, Engelman JA, Battista M, Lagaud G, Zhang XL, Kneitz B, Hou H Jr, Christ GJ, Edelmann W, Lisanti MP. (2002).**  
Caveolin-2-deficient mice show evidence of severe pulmonary dysfunction without disruption of caveolae. *Mol Cell Biol.* 22(7):2329-44.
- Razzaque MA, Nishizawa T, Komoike Y, Yagi H, Furutani M, Amo R, Kamisago M, Momma K, Katayama H, Nakagawa M, Fujiwara Y, Matsushima M, Mizuno K, Tokuyama M, Hirota H, Muneuchi J, Higashinakagawa T, Matsuoka R. (2007).**  
Germline gain-of-function mutations in *RAF1* cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 39(8):1013-7.
- Reilly JT. (2003).**  
FLT3 and its role in the pathogenesis of acute myeloid leukaemia. *Leuk Lymphoma.* 44(1):1-7.
- Renneville A, Roumier C, Biggio V, Nibourel O, Boissel N, Fenaux P, Preudhomme C. (2008).**  
Cooperating gene mutations in acute myeloid leukemia: a review of the literature. *Leukemia.* 22(5):915-31
- Roberts A, Allanson J, Jadico SK, Kavamura MI, Noonan J, Opitz JM, Young T, Neri G (2006).**  
The cardiofaciocutaneous syndrome. *J Med Genet* 43:833-842.
- Roberts AE, Araki T, Swanson KD, Montgomery KT, Schiripo TA, Joshi VA, Li L, Yassin Y, Tamburino AM, Neel BG, Kucherlapati RS. (2007).**  
Germline gain-of-function mutations in *SOS1* cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 39(1): 70-4.
- Roberts AE, Allanson JE, Tartaglia M, Gelb BD. (2013).**  
Noonan syndrome. *Lancet.* 381(9863):333-42.
- Romano AA, Allanson JE, Dahlgren J, Gelb BD, Hall B, Pierpont ME, Roberts AE, Robinson W, Takemoto CM, Noonan JA. (2010).**  
Noonan syndrome: clinical features, diagnosis, and management guidelines. *Pediatrics.* 126(4):746-59.
- Rusu C, Sireteanu A, Puiu M, Skrypnik C, Tomescu E, Csep K, Creț V, Barbarii L. (2007).**  
[MLPA technique--principles and use in practice]. [Article in Romanian]. *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 111(4):1001-4.
- Saal LH, Holm K, Maurer M, Memeo L, Su T, Wang X, Yu JS, Malmström PO, Mansukhani M, Enoksson J, Hibshoosh H, Borg A, Parsons R. (2005).**  
PIK3CA mutations correlate with hormone receptors, node metastasis, and ERBB2, and are mutually exclusive with PTEN loss in human breast carcinoma. *Cancer Res.* 65(7):2554-9.
- Samuels Y, Velculescu VE. (2004).**  
Oncogenic mutations of *PIK3CA* in human cancers. *Cell Cycle.* 3(10):1221-4.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. (1977).**  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-7.

## VIII. Literaturverzeichnis

**Sanz M, Burnett A, Lo-Coco F, Löwenberg B. (2009).**

FLT3 inhibition as a targeted therapy for acute myeloid leukemia. *Curr Opin Oncol.* 21(6):594-600.

**Sarkozy A, Digilio MC, Dallapiccola B. (2008).**

Orphanet J Rare Dis. 3:13. Leopard syndrome.

**Selfors LM, Schutzman JL, Borland CZ, Stern MJ. (1998).**

soc-2 encodes a leucine-rich repeat protein implicated in fibroblast growth factor receptor signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95(12):6903-8.

**Sharland M, Burch M, McKenna WM, Paton MA. (1992).**

A clinical study of Noonan syndrome. *Arch Dis Child.* 67(2):178-83.

**Shi GX, Andres DA. (2005).**

Rit contributes to nerve growth factor-induced neuronal differentiation via activation of B-Raf-extracellular signal-regulated kinase and p38 mitogen-activated protein kinase cascades. *Mol Cell Biol.* 25(2):830-46.

**Shiga N, Takeshima Y, Sakamoto H, Inoue K, Yokota Y, Yokoyama M, Matsuo M. (1997).**

Disruption of the splicing enhancer sequence within exon 27 of the dystrophin gene by a nonsense mutation induces partial skipping of the exon and is responsible for Becker muscular dystrophy. *J Clin Invest.* 100(9):2204-10.

**Side LE, Emanuel PD, Taylor B, Franklin J, Thompson P, Castleberry RP, Shannon KM. (1998).**

Mutations of the NF1 gene in children with juvenile myelomonocytic leukemia without clinical evidence of neurofibromatosis, type 1. *Blood.* 92(1):267-72.

**Sieburth DS, Sun Q, Han M. (1998).**

SUR-8, a conserved Ras-binding protein with leucine-rich repeats, positively regulates Ras-mediated signaling in *C. elegans*. *Cell.* 94(1):119-30.

**Sireteanu A, Covic M, Gorduza EV. (2012).**

[Array CGH: technical considerations and applications]. [Article in Romanian] *Rev Med Chir Soc Med Nat Iasi.* 116(2):545-51.

**Siwik ES, Zahka KG, Wiesner GL, Limwongse C. (1998).**

Cardiac disease in Costello syndrome. *Pediatrics* 101, 706-709.

**Schubert S, Zenker M, Rowe SL, Böll S, Klein C, Bollag G, van der Burgt I, Musante L, Kalscheuer V, Wehner LE, Nguyen H, West B, Zhang KY, Siermans E, Rauch A, Niemeyer CM, Shannon K, Kratz CP. (2006).**

Germline *KRAS* mutations cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 38(3): 331-6.

**Sowa G. (2011).**

Novel insights into the role of caveolin-2 in cell- and tissue-specific signaling and function. *Biochem Res Int.* 2011:809259.

**Strachan T, Read AP. (2005).**

Molekulare Humangenetik Elsevier, Spektrum, Akad. Verlag.

**Stevenson DA, Yang FC. (2011).**

The musculoskeletal phenotype of the RASopathies. *Am J Med Genet C Semin Med Genet.* 157C(2):90-103.

**Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, van der Burgt I, Crosby AH, Ion A, Jeffery S, Kalidas K, Patton MA, Kucherlapati RS, Gelb BD. (2001).**

Mutations in *PTPN11*, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 29(4): 465-8.

**Tartaglia M, Niemeyer CM, Fragale A, Song X, Buechner J, Jung A, Hählen K, Hasle H, Licht JD, Gelb BD. (2003).**

Somatic mutations in *PTPN11* in juvenile myelomonocytic leukemia, myelodysplastic syndromes and acute myeloid leukemia. *Nat Genet* 2003;34:148-150.

## VIII. Literaturverzeichnis

- Tartaglia M, Martinelli S, Iavarone I, Cazzaniga G, Spinelli M, Giarin E, Petrangeli V, Carta C, Masetti R, Aricò M, Locatelli F, Basso G, Sorcini M, Pession A, Biondi A. (2005).**  
Somatic *PTPN11* mutations in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol.* 129(3):333-9.
- Tartaglia M, Pennacchio LA, Zhao C, Yadav KK, Fodale V, Sarkozy A, Pandit B, Oishi K, Martinelli S, Schackwitz W, Ustaszewska A, Martin J, Bristow J, Carta C, Lepri F, Neri C, Vasta I, Gibson K, Curry CJ, Siguero JP, Digilio MC, Zampino G, Dallapiccola B, Bar-Sagi D, Gelb BD. (2007).**  
Gain-of-function *SOS1* mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome. *Nat Genet.* 39(1):75-9.
- Tartaglia M, Gelb BD, Zenker M. (2011).**  
Noonan syndrome and clinically related disorders. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab.* 25(1):161-79.
- Teebi AS, Shaabani IS. (1993).**  
Further delineation of Costello syndrome. *Am J Med Genet* 47, 166-168.
- Tidyman WE, Rauen KA. (2009).**  
The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. *19(3):230-6.*
- Tong KL, Ding ZP, Chua T. (2001).**  
Leopard syndrome. *Singapore Med J.* 42(7):328-31.
- Treff NR, Pouchnik D, Dement GA, Britt RL, Reeves R. (2004).**  
High-mobility group A1a protein regulates Ras/ERK signaling in MCF-7 human breast cancer cells. *Oncogene.* 2004 Jan 22;23(3):777-85.
- van der Burgt I. (2007).**  
Noonan syndrome. *Orphanet J Rare Dis* 2:4. Review.
- Vasu VR, Saranya B, Jayashankar M, Munirajan AK, Santhiya ST. (2012).**  
A novel splice site and two known mutations of androgen receptor gene in sex-reversed XY phenotype. *Genet Test Mol Biomarkers.* 16(7):749-55.
- Velasco A, Bussaglia E, Pallares J, Dolcet X, Llobet D, Encinas M, Llecha N, Palacios J, Prat J, Matias-Guiu X. (2006).**  
*PIK3CA* gene mutations in endometrial carcinoma: correlation with PTEN and K-RAS alterations. *Hum Pathol.* 37(11):1465-72.
- Velho S, Oliveira C, Ferreira A, Ferreira AC, Suriano G, Schwartz S Jr, Duval A, Carneiro F, Machado JC, Hamelin R, Seruca R. (2005).**  
The prevalence of *PIK3CA* mutations in gastric and colon cancer. *Eur J Cancer.* 41(11):1649-54.
- Veltman JA, Brunner HG. (2012).**  
De novo mutations in human genetic disease. *Nat Rev Genet.* 2012;13:565–75.
- von Deimling A, Krone W, Menon AG. (1995).**  
Neurofibromatosis type 1: pathology, clinical features and molecular genetics. *Brain Pathol.* 5(2):153-62.
- Wang XB, Lee H, Capozza F, Marmon S, Sotgia F, Brooks JW, Campos-Gonzalez R, Lisanti MP. (2004).**  
Tyrosine phosphorylation of caveolin-2 at residue 27: differences in the spatial and temporal behavior of phospho-Cav-2 (pY19 and pY27). *Biochemistry.* 43(43):13694-706.
- Ward KJ, Ellard S, Yajnik Costello-Syndrom, 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.
- Wellbrock C, Karasarides M, Marais R. (2004).**  
The RAF proteins take centre stage. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 5(11):875-85.

## VIII. Literaturverzeichnis

**Williams TM, Lisanti MP. (2004).**

The caveolin proteins. *Genome Biol.* 5(3):214.

**Williams TM, Medina F, Badano I, Hazan RB, Hutchinson J, Muller WJ, Chopra NG, Scherer PE, Pestell RG, Lisanti MP. (2004).**

Caveolin-1 gene disruption promotes mammary tumorigenesis and dramatically enhances lung metastasis in vivo. Role of Cav-1 in cell invasiveness and matrix metalloproteinase (MMP-2/9) secretion. *J Biol Chem.* 279(49):51630-46.

**Witt DR, McGillivray BC, Allanson JE, Hughes HE, Hathaway WE, Zipursky A, Hall JG. (1988).**

Bleeding diathesis in Noonan syndrome: a common association. *Am J Med Genet.* 31(2):305-17.

**Won D, Chi HS, Shim H, Jang S, Park CJ, Lee JH. (2013).**

The prognostic impact of *c-KIT* mutation in systemic mastocytosis associated with acute myeloid leukaemia patients. *Leuk Res.* 37(8):883-8.

**Xu Q, Simpson SE, Scialla TJ, Bagg A, Carroll M. (2003).**

Survival of acute myeloid leukemia cells requires PI3 kinase activation. *Blood.* 102(3):972-80.

**Yuan S, Zaidi S, Brueckner M. (2013).**

Congenital heart disease: emerging themes linking genetics and development. *Curr Opin Genet Dev.* 23(3):352-9.

**Zajicková K, Krepelová A, Zofková 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(10):1754-7.

**Zenker M. (2009).**

Genetic and Pathogenetic Aspects of Noonan Syndrome and Related Disorders. *Horm Res* 72, 57–63 (2009).

**Zenker M, Wiczorek D. (2007).**

Die Genetik des Noonan Syndrom-Neue Entwicklungen.

[Online im Internet. ] URL:

<http://www.humangenetik.uk-erlangen.de/e1846/e74/e114/e572/e633/inhalt635/>

DieGenetikdesNoonan-Syndroms.pdf

[Stand: 03.07.2014, 15:30]

**Zhao YY, Liu Y, Stan RV, Fan L, Gu Y, Dalton N, Chu PH, Peterson K, Ross J Jr, Chien KR. (2002).**

Defects in caveolin-1 cause dilated cardiomyopathy and pulmonary hypertension in knockout mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99(17):11375-80.

**Zhao S, Konopleva M, Cabreira-Hansen M, Xie Z, Hu W, Milella M, Estrov Z, Mills GB, Andreeff M (2004).**

Inhibition of phosphatidylinositol 3-kinase dephosphorylates BAD and promotes apoptosis in myeloid leukemias. *Leukemia.* 18(2):267-75.

**Zhao R, Xing S, Li Z, Fu X, Li Q, Krantz SB, Zhao ZJ. (2005).**

Identification of an acquired *JAK2* mutation in polycythemia vera. *J Biol Chem.* 280(24):22788-92.

## **IX. Danksagung**

Dem jetzigen Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Kubisch und dem ehemaligen Institutsleiter Herrn Prof. Dr. Andreas Gal danke ich für die freundliche Bereitstellung des Arbeitsplatzes, für die sehr guten Forschungsbedingungen, der Flexibilität in der Arbeitszeiteinteilung und damit für die erfolgreiche Absolvierung der Promotion.

Meinem Doktorvater, Priv. Doz. Dr. Georg Rosenberger, gilt ein ganz besonderer Dank für die ausgezeichnete Betreuung meiner Dissertation, die stetigen und immer hilfreichen Anregungen und sein Engagement bis zur Fertigstellung der Dissertation.

Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche danke ich für ihr Engagement, den wertvollen Anregungen und meiner Einführung in die Arbeitsgruppe Kutsche.

Ein herzliches Dankeschön an Inka Jantke für die Einarbeitung, die praktische Unterstützung und das viele gemeinsame Lachen, so dass die experimentelle Arbeit in einer angenehmen und produktiven Atmosphäre stattfinden konnte.

Herr Prof. Dr. Martin Zenker bin ich für die Bereitstellung eines Teils der Patient-DNA-Proben dankbar, die das Patientenkollektiv vorliegender Arbeit erweiterten.

Ein ganz lieber Dank an die Mitarbeiter des Instituts, besonders aus der Arbeitsgruppe Kutsche, für die freundliche Aufnahme, die ständige Hilfsbereitschaft und das Geburtstagsgeschenk vor fünf Jahren.

Von Herzen danke ich meinen Eltern für die Finanzierung des Studiums und die ständige Hilfsbereitschaft, ohne die das Studium und die Dissertation extrem erschwert worden wären.

Für seine Vorbildfunktion und sein Dasein möchte ich meinem Bruder Hamed herzlich danken.

Ich danke all meinen Freunden, die ich aus Platzgründen hier nicht einzeln aufzählen möchte, für ihre Treue und die vielen wertvollen Erfahrungen der letzten 30 Jahre.

Und das herzlichste Dankeschön geht an meine Frau Aneta und meine Tochter Samira, die mein Leben von Tag zu Tag bereichern und mir hoffentlich den Rest meines Lebens zur Seite stehen werden.

**Lebenslauf entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen**

## **XI. 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.

Ich erkläre mich einverstanden, dass meine Dissertation vom Dekanat der Medizinischen Fakultät mit einer gängigen Software zur Erkennung von Plagiaten überprüft werden kann.

Unterschrift: .....