



**Molekulargenetische Analyse**  
**positioneller und funktioneller Kandidatengene**  
**bei Patienten mit**  
**Zimmermann-Laband-Syndrom**

**D I S S E R T A T I O N**

**zur Erlangung des akademischen Grades**  
**„Doktor der Naturwissenschaften“**  
**des Departments Biologie der Fakultät für**  
**Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften**  
**an der Universität Hamburg**


**vorgelegt von**  
**Benjamin Abo-Dalo**  
**aus Hamburg**

**Hamburg 2007**

Genehmigt vom Department Biologie  
der Fakultät für Mathematik, Informatik und Naturwissenschaften  
an der Universität Hamburg  
auf Antrag von Professor Dr. A. GAL  
Weiterer Gutachterin der Dissertation:  
Frau Professor Dr. S. DOBLER  
Tag der Disputation: 20. April 2007

Hamburg, den 06. April 2007



  
Professor Dr. Reinhard Lieberei  
Leiter des Departments Biologie

**Für meinen Vater, Birte und Helene**



# Inhaltsverzeichnis

## Verzeichnis der Abkürzungen

<b>I. Zusammenfassung .....</b>	<b>1</b>
<b>II. Einleitung .....</b>	<b>3</b>
1. Balancierte chromosomale Translokationen als Hilfsmittel zur Identifizierung von Krankheitsgenen .....	3
2. Nicht-kodierende DNA-Sequenzelemente und humane Erkrankungen.....	5
3. Das Zimmermann-Laband-Syndrom.....	7
3.1 Klinik.....	7
3.2 Vererbung des Zimmermann-Laband-Syndroms.....	12
4. Wnt-abhängige Signalwege.....	12
4.1 Skelettveränderungen im Zusammenhang mit Wnt-abhängigen Signalwegen...	15
5. Ziel der Arbeit .....	18
<b>III. Material und Methoden .....</b>	<b>19</b>
1. Material.....	19
1.1 Patienten mit dem Zimmermann-Laband-Syndrom bzw. einem mit dieser Erkrankung überlappenden Phänotyp .....	19
1.2 Materialien für molekularbiologische Methoden.....	33
1.3 Chemikalien und Lösungsmittel.....	33
1.4 Puffer und Lösungen .....	34
1.4.1 PCR-Puffer .....	34
1.4.2 Medium für die chemische Transformation von <i>E.coli</i> .....	34
1.4.3 Puffer und Lösungen für die Agarosegel-Elektrophorese.....	34
1.4.4 Lösungen für die SSCP-Analyse.....	35
1.4.5 Puffer und Lösungen für die Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH).....	35
1.4.6 Allgemeine Puffer .....	35
1.5 Materialien für zellbiologische Arbeiten.....	36
1.6 Zelllinien .....	36
1.7 Oligonukleotide .....	36
1.7.1 Oligonukleotide für die Mutationsanalyse der positionellen Kandidatengene <i>CHDH</i> , <i>IL17RB</i> , <i>ACTR8</i> , <i>SELK</i> , <i>CACNA2D3</i> , <i>LRTM1</i> , <i>WNT5A</i> , <i>ERC2</i> , <i>CCDC66</i> und <i>C3orf63</i> .....	37

---

1.7.2	Oligonukleotide für die SNP-Analyse.....	39
1.7.3	Oligonukleotide für die Mutationsanalyse der funktionellen Kandidatengene <i>ROR2</i> , <i>FZD2</i> , <i>FZD5</i> , <i>FZD7</i> , <i>DKK1</i> , <i>DKK2</i> , <i>DKK3</i> und <i>DKK4</i> .....	40
1.7.4	Oligonukleotide für die Mutationsanalyse konservierter nicht-kodierender DNA-Sequenzelemente .....	41
1.7.5	Oligonukleotide für Expressionsanalysen .....	41
1.7.6	Oligonukleotide für die Typisierung von Fosmid-Klonen.....	41
1.7.7	Chromosom 3-spezifische Oligonukleotide für die Amplifikation der Bruchpunktsequenzen.....	42
1.7.8	Chromosom 8-spezifische Oligonukleotide für die Amplifikation der Bruchpunktsequenzen.....	42
1.8	Fosmid-Klone.....	43
2.	Molekularbiologische Methoden.....	43
2.1	DNA-Isolierung aus Vollblut.....	43
2.2	Isolierung von Fosmid-Klon-DNA aus <i>E.coli</i> .....	43
2.3	Isolierung von RNA aus Vollblut.....	44
2.4	Isolierung von RNA aus humanen Zellen .....	44
2.5	Qualitätskontrolle der isolierten RNA.....	44
2.6	Quantifizierung von DNA und RNA durch photometrische Analyse.....	44
2.7	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	45
2.8	Agarosegelelektrophorese .....	45
2.9	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	46
2.10	DNA-Sequenzierung .....	46
2.11	Aufreinigung von Sequenzierungsansätzen .....	47
2.12	Amplifikation von genomischer DNA .....	47
2.13	Restriktion von DNA .....	47
2.14	„Single-Strand Conformation Polymorphism“ (SSCP)-Analyse .....	48
2.15	cDNA-Synthese und Reverse Transkriptase (RT)-PCR .....	49
2.16	Semiquantitative RT-PCR.....	50
2.17	Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)-Analysen .....	51
2.17.1	Effizienztest der qRT-PCR-Analysen .....	52
2.17.2	Relative Expressionsniveau-Quantifizierung – die $\Delta\Delta C_t$ -Methode.....	52
2.18	Klonierung von PCR-Produkten .....	53

2.19	Transformation chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen .....	53
3.	Molekularzytogenetische Methoden .....	54
3.1	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH) .....	54
4.	Zellbiologische Methoden .....	55
4.1	Allgemeine Kulturbedingungen .....	55
4.2	Passagieren von primären humanen Fibroblasten .....	55
4.3	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	55
4.4	Synchronisierung von Zellen .....	55
5.	Genbank-Einträge, Computerprogramme und Datenbanken .....	56
5.1	Genbank-Einträge der analysierten Gene.....	56
5.2	Datenbanken.....	57
5.3	Computerprogramme .....	57
5.4	„Online“-Computerprogramme.....	57
<b>VI.</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>59</b>
1.	Vorarbeiten: Identifizierung von bruchpunktüberspannenden BAC- und Fosmid-Klonen bei einer balancierten 3;8-Translokation in den Regionen 3p14.3 und 8q24.3 .....	59
2.	Molekulare Charakterisierung der Translokationsbruchpunktregionen 3p14.3 und 8q24.3 einer 3;8-Translokation durch PCR und DNA-Sequenzanalyse .....	63
3.	Mutationsanalyse von zehn positionellen Kandidatengenen in 3p21.1-p14.3 bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom.....	66
3.1	Vorbemerkungen .....	66
3.2	Mutationsanalyse des <i>CACNA2D3</i> -Gens .....	67
3.3	Mutationsanalyse des <i>WNT5A</i> -Gens .....	69
3.3.1	Mutationsanalyse der untranslatierten Regionen, der putativen Promotorregion und der Kodierregion des <i>WNT5A</i> -Gens .....	70
3.3.2	Mutationsanalyse des <i>WNT5A</i> -Gens auf cDNA-Ebene .....	71
3.3.3	<i>WNT5A</i> -SNP-Analyse bei sieben Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom und deren Eltern .....	72
3.4	Mutationsanalyse der Gene <i>CHDH</i> , <i>IL17RB</i> , <i>ACTR8</i> , <i>SELK</i> , <i>LRTM1</i> , <i>ERC2</i> , <i>CCDC66</i> und <i>C3orf63</i> .....	74
4.	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung zur Identifizierung möglicher sub-mikroskopischer Deletionen in 3p14.3 bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom .....	78

5.	Expressionsanalyse ausgewählter Gene in der Region 3p14.3 bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom .....	81
5.1	Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Gene <i>WNT5A</i> , <i>C3orf63</i> , <i>CCDC66</i> und <i>ARHGEF3</i> .....	81
6.	Quantitative real time-PCR-Analysen (qRT-PCR) .....	86
6.1	Effizienzen der quantitativen real-time PCR.....	86
6.2	<i>WNT5A</i> -Expressionsanalyse mit Hilfe der qRT-PCR.....	88
6.3	<i>WNT10B</i> - und <i>ROR2</i> -Expressionsanalyse mit Hilfe der qRT-PCR.....	90
6.4	Verifizierung der qRT-PCR .....	91
7.	Identifizierung und Mutationsanalyse von konservierten nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen in der Region 3p14.3 .....	92
7.1	Vorarbeiten: Identifizierung von konservierten nicht-kodierenden Sequenzbereichen mit Hilfe von Interspezies-DNA-Sequenzvergleichen.....	93
7.2	Mutationsanalyse von konservierten nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen bei sechzehn Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom.....	95
8.	Mutationsanalyse von acht funktionellen Kandidatengenen ( <i>ROR2</i> , <i>FZD2</i> , <i>FZD5</i> , <i>FZD7</i> , <i>DKK1</i> , <i>DKK2</i> , <i>DKK3</i> und <i>DKK4</i> ).....	96
8.1	Vorbemerkungen .....	96
8.2	Mutationsanalyse der Gene <i>ROR2</i> , <i>FZD2</i> , <i>FZD5</i> , <i>FZD7</i> und <i>DKK1-4</i> .....	96
<b>V.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>99</b>
1.	Nicht-homologe nicht-allelische Rekombination als molekularer Mechanismus der 3;8-Translokation .....	99
2.	Hinweise auf eine Assoziation der Region 3p21.1-p14.3 mit dem Zimmermann-Laband-Syndrom .....	102
2.1	Das <i>WNT5A</i> -Gen .....	102
2.2	Das <i>CACNA2D3</i> -Gen .....	103
2.3	Gingivafibromatose als Arzneimittelnebenwirkung .....	104
3.	Mit Hilfe von DNA-Sequenzanalysen konnten keine pathogenen Mutationen bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom identifiziert werden .....	106
3.1	Keine pathogenen Punktmutationen in Genen aus der Region 3p21.1-p14.3... ..	106
3.2	Keine pathogenen Punktmutationen in Genen, deren Genprodukte in den WNT-abhängigen Signalweg involviert sind.....	106



---

3.3	Keine pathogenen Mutationen in konservierten, nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen in 3p21.1-p14.3 .....	107
3.4	Kritische Betrachtung der PCR-basierten Mutationsanalyse im Hinblick auf die Identifizierung von Punktmutationen.....	108
4.	Es liegen keine größeren Deletionen im Bereich des <i>WNT5A</i> -Gens bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom vor .....	109
5.	Variable Expression der Gene <i>WNT5A</i> , <i>ROR2</i> und <i>WNT10B</i> in humanen lymphoblastoiden Zellen .....	110
6.	Der Phänotyp des Zimmermann-Laband-Syndroms .....	112
6.1	Erkrankungen, die vorwiegend Überschneidungen mit dem skelettalen Phänotyp des Zimmermann-Laband-Syndroms aufweisen.....	112
6.2	Erkrankungen, die vorwiegend Überschneidungen mit dem gingivalen Phänotyp des Zimmermann-Laband-Syndroms aufweisen.....	113
6.3	Betrachtung des ZLS-Patientenkollektivs .....	115
7.	Sind die Ursachen des Zimmermann-Laband-Syndroms durch Locus Heterogenität oder komplexe genetische Defekte bedingt? .....	116
10.	Ausblick.....	118
<b>VI.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>120</b>

## Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ACTB	Aktin $\beta$
ACTR8	„actin-related protein 8 homolog (yeast)“
APC	Adenomatöse polyposis coli
APS	Ammoniumperoxodisulfat
ARHGEF	„alpha rho guanine nucleotide exchange factor“
<i>b</i>	Y-Achsenabschnitt
BAC	„bacterial artificial chromosome“
BDB	Brachydaktylie Typ B
bidest.	zweifach destilliert („bidestillata“)
BLAST	Programme zur Analyse biologischer Sequenzdaten („basic local alignment search tool“)
BLAT	Programme zur Analyse biologischer Sequenzdaten („basic local alignment tool“)
Bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin („bovine serum albumin“)
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
c.	Nukleotidposition in der Kodierregion eines Gens („coding sequence“)
C3orf63	„chromosome 3 open reading frame 63“
CACNA2D3	„calcium channel, voltage-dependent, alpha 2/delta 3 subunit“
CCDC66	„coiled-coil domain containing 66“
cDNA	komplementäre DNA („copy“-Desoxyribonukleinsäure)
cen	Zentromer bzw. zentromerwärts
CHDH	Cholindehydrogenase
Chr.	Chromosom
CNG	Konservierte nicht-kodierende Sequenz („conserved nongenic sequence“)
Ct	Zyklus-Schwellenwert („cycle threshold“)
del	Deletion
der( )	derivativ
DIP	Deletions- Insertionspolymorphismus
Dkk	„Dickkopf“
Dsh	„dishevelled“
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure („deoxyribonucleic acid“)
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dup	Duplikation
E	Reaktionseffizienz der qRT-PCR
EBV	Epstein-Barr-Virus
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ERC2	„ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2“
et al.	und andere (et altera)
EtOH	Ethanol
FBS	Fötales bovines Serum
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FH	„fumarat hydratase“
Fosmid	Ein „low-copy-number“ Vector basierend auf dem <i>E. coli</i> F-Faktor als „origin of replication“
FZD	„frizzled“
G	Guanin
g.	Nukleotidposition in der genomischen Sequenz („genomic sequence“)
g, mg, $\mu$ g, pg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Pikogramm
GAPDH	„glyceraldehyd-3-phosphat dehydrogenase“
GSK3	„glykogen synthase kinase 3“
HPRT	„hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase“
IL17RB	„interleukin 17 receptor B“
IVS	intervenierende Sequenz („intervening sequence“)
Kb	Kilobase(n)
l, ml, $\mu$ l	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria-Bertani Medium

LRP	„low density lipoprotein receptor-related protein“
LRTM1	„leucine-rich repeats and transmembrane domains 1“
μ	mikro
m	Milli
<i>m</i>	Steigung
M, mM, μM	molar (mol/l), millimolar, mikromolar
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
Min.	Minute(n)
mol, mmol, μmol	Mol, Millimol, Mikromol
mRNA	Boten-Ribonukleinsäure („messenger RNA“)
NAHR	„non-allelic homologous recombination“
NHEJ	„non-homologous end-joining“
OD	optische Dichte
OMIM	Datenbank Mendel'scher Erkrankungen („Online Mendelian Inheritance in Men“)
ORF	offenes Leseraster („open reading frame“)
PAA	Polyacrylamid
PAC	„P1-derived artificial chromosome“
PBS	Phosphat-gepufferte Saline Kochsalzlösung („phosphate buffered
PCR	Polymerase-Kettenreaktion („polymerase chain reaction“)
PEG	Polyethylenglycol
qRT-PCR	Quantitative Real-Time-PCR
R <sup>2</sup>	Korrelationskoeffizient
RNA	Ribonukleinsäure („ribonucleic acid“)
ROR	„receptor tyrosine kinase-like orphan receptor“
RPII	RNA-Polymerase II
RSPO4	„R-spondin family, member 4“
RT	Raumtemperatur bzw. Reverse Transkriptase
RT-PCR	„reverse transcriptase-polymerase chain reaction“
r.	Nukleotidposition in der RNA-Sequenz („RNA sequence“)
rs	Referenznummer eines SNPs („reference SNP“)
Sek.	Sekunde(n)
SHH	„sonic hedgehog homolog“ (Drosophila)
SELK	„selenoprotein K“
SNP	Einzelbasenpaar Polymorphismus („single nucleotide polymorphism“)
SSCP	„single strand conformation polymorphism“
Std.	Stunde(n)
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBP	TATA-Box bindendes Protein
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung („Tris-buffered saline“)
TCF	T-Zell-spezifischer Transkriptionsfaktor
TE	Tris-EDTA
tel	Telomer bzw. telomerwärts
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris-(hydroxymethyl-)aminomethan
TUBA1A	Tubulin α 1 a
U	Enzymeinheiten, Units enzymatische Aktivität („units“)
ÜN	über Nacht
Upm	Umdrehungen pro Minute
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
V	Volt
v/v	Volumen pro Volumen („volume per volume“)
WGA	Gesamtgenom-Amplifikation („whole genome amplifikation“)
w/v	Gewicht pro Volumen („weight per volume“)
Wnt bzw. WNT	„wingless ( <u>W</u> g) mouse mammary tumor virus (MMTV) integration site family, member 1 ( <u>int</u> -1)“
WT	Wildtyp
YAC	„yeast artificial chromosome“
ZLS	Zimmermann-Laband-Syndrom

## I. Zusammenfassung

Das Zimmermann-Laband-Syndrom (ZLS) ist eine seltene, autosomal-dominant vererbte Erkrankung, die primär durch Gingivafibromatose, verdickte orale Schleimhäute und Schwellung der perioralen Weichgewebe charakterisiert ist, sowie durch Skelettauffälligkeiten wie Hypoplasie/Dysplasie der terminalen Phalangen und Anonychie oder Onychodystrophie. Zwei cytogenetisch balanciert erscheinende Translokationen, eine 3;8- und eine 3;17-Translokation, bei Patienten mit ZLS gaben Hinweise auf eine Kandidatenregion, da die Bruchpunkte auf den beiden derivativen Chromosomen 3 in der Region p14.3 ~280 Kb auseinander liegen. Die durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) eingegrenzten Bruchpunkte der 3;8-Translokation konnten durch die PCR-Amplifikation so genannter Verbindungsfragmente auf molekularer Ebene charakterisiert werden. In der Bruchpunktregion des derivativen Chromosoms 8 befindet sich das Trinukleotid CTC, das sich sowohl in der Wildtyp-Chromosom 3- als auch in der Wildtyp-Chromosom 8-Sequenz wiederfinden lässt. Zudem liegt auf dem derivativen Chromosom 3 eine 8 (bzw. 11) Bp große Deletion von Chromosom 8-Material sowie eine 9 (bzw. 12) Bp umfassende Deletion von Chromosom 3-Material vor. Die nähere Analyse der Bruchpunktregionen ergab, dass sich flankierend zu beiden Bruchpunkten jeweils ein repetitives *Alu*-Element befindet. Es wird angenommen, dass diese die nicht-allelische, nicht-homologe Rekombination, die sehr wahrscheinlich zu der 3;8-Translokation geführt hat, begünstigten. Durch den Bruch in 3p14.3 der 3;8-Translokation wurde kein Gen direkt unterbrochen, so dass die dazu distal und proximal kartierenden Gene als positionelle Kandidaten für das ZLS angesehen wurden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden DNA- und auch einige RNA-Proben von 21 Patienten mit ZLS bzw. einem dazu ähnlichen Phänotyp und unauffälligem Karyotyp einer umfassenden molekulargenetischen Analyse unterzogen, mit dem Ziel, mit dem ZLS assoziierte, genetische Defekte zu identifizieren. Das in der 3p14.3 Region befindliche *WNT5A*-Gen (*wingless-type MMTV integration site family, member 5A*) ist ein besonders vielversprechender Kandidat, da das Genprodukt an für die Skelettentwicklung wichtigen Signalwegen beteiligt ist. Zudem weisen *Wnt5a*-defiziente Mäuse verschiedene skelettale und faziale Veränderungen auf, die bemerkenswerte Ähnlichkeiten zu den klinischen Merkmalen von Patienten mit ZLS zeigen. Durch eine Mutationsanalyse der Kodierregionen von 10 Genen aus der Region 3p21.1-p14.3, einschließlich *WNT5A*, konnten insgesamt 83 Sequenzvarianten identifiziert werden. 23 dieser Mutationen waren nicht in den Datenbanken als „single nucleotide polymorphisms“ (SNPs) bekannt, konnten jedoch durch den Nachweis bei einem gesunden Elternteil der Patienten und/oder Kontrollpersonen als nicht-pathogene Sequenzvarianten identifiziert werden. Durch verschiedene Techniken wie FISH und die Analyse von SNPs wurden keine Hinweise auf das Vorlie-

gen von submikroskopischen Deletionen im Bereich des *WNT5A*-Gens sowie in dazu benachbarten Regionen bei Patienten mit ZLS erhalten. Um zu untersuchen, ob dem ZLS möglicherweise Mutationen in den Kodierregionen von Genen, deren Genprodukte am *WNT5A*-abhängigen Signalweg beteiligt sind, zugrunde liegen, wurden *ROR2* (*receptor tyrosine kinase-like orphan receptor 2*), *FZD2*, *FZD5*, *FZD7* [*frizzled homolog 2, 5, 7* (*Drosophila*)] und *DKK1-4* [*dickkopf homolog 1-4* (*Xenopus laevis*)], die für *WNT5A*-Rezeptoren bzw. die *WNT*-abhängige Signalkaskade modulierende Proteine kodieren, einer Mutationsanalyse unterzogen. Von den insgesamt 23 detektierten Sequenzvarianten war keine nachweislich mit dem ZLS assoziiert.

Um zu untersuchen, ob eine aberrante Expression von einem oder mehreren Gen/en in 3p14.3 möglicherweise mit der Erkrankung assoziiert ist, wurden Analysen mit Hilfe der semiquantitativen und quantitativen „real-time“-RT-PCR an RNA aus lymphoblastoiden Zellen einiger Patienten mit ZLS durchgeführt. Es zeigten sich relativ homogene Expressionswerte für die Gene *C3orf63* (*chromosome 3 open reading frame 63*) und *CCDC66* (*coiled-coil domain containing 66*) bei Patienten und Kontrollpersonen. Im Gegensatz dazu fanden sich unterschiedlich starke Expressionsprofile für die Gene *WNT5A* und *ARHGEF3* [*Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 3*] sowie der nicht in 3p kartierenden Gene *ROR2* und *WNT10B* in den untersuchten Zelllinien der Patienten und Kontrollpersonen. Eine Validierung dieser Ergebnisse erfolgte durch die Bestimmung der Expression verschiedener Haushaltsgene, die sehr homogene Expressionswerte ergaben. Eine Assoziation der Expressionslevel eines bestimmten Gens mit dem ZLS konnte nicht gezeigt werden.

Für eine korrekte zeitliche und örtliche Expression werden für bestimmte Gene so genannte „long-range regulatory elements“, die bis zu 1 Mb von einem Gen entfernt lokalisiert sein können, benötigt. Diese *cis*-regulatorischen Elemente können durch nicht-kodierende, konservierte DNA-Sequenzelemente (CNGs) in der genomischen DNA repräsentiert werden. Durch DNA-DNA-Sequenzvergleiche von verschiedenen Spezies wurden CNGs in der Region 3p21.1-p14.3 identifiziert und neun für eine Mutationsanalyse bei Patienten mit ZLS ausgewählt. Eine Assoziation der in diesen CNGs detektierten Sequenzvarianten mit dem ZLS konnte nicht festgestellt werden.

Abschließend lässt sich festhalten, dass die in dieser Arbeit durchgeführte extensive molekulargenetische Analyse der Region 3p21.1-p14.3 bisher nicht zum Auffinden des genetischen Defektes beim ZLS geführt hat. Dennoch gelang es, eine Reihe von in der Literatur noch nicht beschriebenen genetischen Veränderungen in einzelnen Genen bzw. DNA-Sequenzelementen in dieser genomischen Region zu identifizieren, welche allerdings nicht mit dem ZLS assoziiert sind.

## II. Einleitung

### 1. Balancierte chromosomale Translokationen als Hilfsmittel zur Identifizierung von Krankheitsgenen

Die Identifizierung von krankheitsverursachenden Mutationen und die nachfolgende Aufklärung der zugrunde liegenden molekularen Pathomechanismen sind neben diagnostischen Aufgaben und der Patientenberatung primäre Ziele der Humangenetik unserer Zeit. Bisher konnten die genetischen Ursachen von 2066 Mendel'schen Erkrankungen identifiziert werden; diesen Erkenntnissen stehen 1552 nicht aufgeklärte Mendel'sche Erkrankungen gegenüber. Des Weiteren wurden 2162 Erkrankungen mit putativer Mendel'scher Vererbung beschrieben ([www.ncbi.nlm.nih.gov/omim](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim)). Dies belegt, dass die Mehrzahl der genetischen Defekte derart vererbter Erkrankungen beim Menschen noch nicht bekannt ist. In diesem Zusammenhang hat sich bereits Mitte der 1980er Jahre gezeigt, dass chromosomale Aberrationen ein geeignetes Hilfsmittel für die Identifizierung von Krankheitsgenen sein können.

Die Inzidenz balancierter chromosomaler Aberrationen, die keinen Verlust oder Zugewinn von genetischem Material aufweisen, liegt bei etwa 1:2000 (Warburton, 1991). In ca. 6 % der Fälle sind diese mit kongenitalen Auffälligkeiten assoziiert (Jacobs, 1977). Balancierte chromosomale Aberrationen wie Translokationen oder Inversionen können für die Lokalisierung von Krankheitsgenen hilfreich sein, wenn sie in Verbindung mit einer Erkrankung auftreten. Zunächst muss jedoch in Betracht gezogen werden, dass diese Aberrationen auf drei unterschiedliche Weisen mit einem klinischen Phänotyp assoziiert sein können. So kann erstens ein Rearrangement zufällig mit einem Phänotyp assoziiert sein, ohne in kausalem Zusammenhang mit den klinischen Auffälligkeiten zu stehen. Zweitens besteht die Möglichkeit, dass eine Aberration balanciert erscheint, diese jedoch submikroskopisch unbalanciert ist und daher der unbalancierte Zustand für die Erkrankung verantwortlich sein kann. Als dritte Möglichkeit kann ein balanciertes Rearrangement Hinweise auf die Lokalisation des krankheitsverursachenden Gens im Genom geben, wenn die klinischen Auffälligkeiten z.B. durch Haploinsuffizienz oder Fehlregulation der Expression eines Gens in einer der beiden chromosomalen Bruchpunktregionen bedingt sind. Für die letztgenannte Situation kann die Familienanamnese zusätzliche Hinweise liefern. Ist das bei einem erkrankten Individuum vorliegende Rearrangement nicht bei den Eltern vorhanden und liegt bei dem Patienten somit *de novo* vor, kann zunächst von einer kausalen Assoziation der chromosomalen Aberration mit der Erkrankung ausgegangen werden. Die Evidenzen

erhärten sich zudem, wenn ein balanciertes Rearrangement innerhalb einer Familie mit dem Krankheitsphänotyp segregiert.

Bei einer monogenen Erkrankung kann davon ausgegangen werden, dass durch das Chromosomenrearrangement ein Gen oder ein regulatorisches Sequenzelement direkt unterbrochen ist und daraus eine Haploinsuffizienz oder ein „gain of function“ resultiert (Strachan & Read, 1999). Im Rahmen einer Chromosomenanalyse können die Bruchpunkte eines Rearrangements auf etwa vier Megabasen (Mb) eingegrenzt werden, so dass es weiterer Methoden für die Feinkartierung der Bruchpunkte bedarf. Dies kann durch die Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung (FISH) unter Verwendung von DNA-Sonden (YAC-, BAC-, PAC- und Fosmid-Sonden) bewerkstelligt werden. Dank der physikalischen Kartierung des humanen Genoms können DNA-Sonden entsprechend selektiert werden. Fluoreszenzhybridisierungssignale von zunächst großen DNA-Sonden, die sowohl auf dem wildtyp als auch auf den derivativen (der) Chromosomen vorliegen, geben Hinweise auf eine bruchpunkt-überspannende DNA-Sonde. Durch Verwendung kleinerer und miteinander überlappender DNA-Sonden können Bruchpunkte auf einen Bereich von 10–50 Kb eingegrenzt werden. Mit Hilfe von Datenbankrecherchen ist es dann möglich, Gene in den so identifizierten Regionen zu finden und Kandidatengene für die Erkrankung auszuwählen. Durch eine Mutationsanalyse dieser Gene bei Patienten mit dem gleichen klinischen Phänotyp wie der Patient mit dem Rearrangement und unauffälligem Karyotyp kann durch den Nachweis weiterer Mutationen ein Krankheitsgen identifiziert werden.

In vielen Fällen konnten so krankheitsverursachende Gene von autosomal-dominant oder X-chromosomal vererbten Erkrankungen gefunden werden. So wurden Gene für die Muskeldystrophie Typ Duchenne, die chronische Granulomatose oder die X-chromosomal vererbte unspezifische geistige Behinderung durch chromosomale Rearrangements identifiziert (Burmeister & Lehrach, 1986; Kutsche *et al.*, 2000; Royer-Pokora *et al.*, 1986; van Ommen *et al.*, 1986; Zemni *et al.*, 2000).

## 2. Nicht-kodierende DNA-Sequenzelemente und humane Erkrankungen

Chromosomale Rearrangements haben bei einer Vielzahl von humanen Erkrankungen zur Identifizierung des ursächlichen Gens geführt (Burmeister & Lehrach, 1986; Kutsche *et al.*, 2000; Royer-Pokora *et al.*, 1986; van Ommen *et al.*, 1986). Es wurden jedoch vereinzelt chromosomale Bruchereignisse dokumentiert, die nicht in der Transkriptionseinheit selbst, sondern 5' oder 3' davon, also in gewisser Entfernung zum krankheitsverursachenden Gen kartierten. Erste Beobachtungen dieser Art wurden in den 1980er Jahren gemacht. Bei Patienten mit Deletionen, die sich im 5'-Bereich des  $\beta$ -Globin-Gens in einer Entfernung von 2,5-250 Kb ereignet hatten, kam es zu einer Fehlregulation der Expression dieses Gens, mit der Folge einer  $\beta$ -Thalassämie (MIM 603902) (Kioussis *et al.*, 1983; Van der Ploeg *et al.*, 1980; Vanin *et al.*, 1983). Des Weiteren wurden Patienten mit Aniridie (MIM 106210) beschrieben, die keine Mutation im auf Chromosom 11 kartierenden *PAX6* (*paired box/homeodomain*  $\underline{6}$ )-Gen zeigten, sondern einen bis zu 125 Kb stromabwärts dieses Gens liegenden Translokationsbruchpunkt aufwiesen (Crolla & van Heyningen, 2002; Fantès *et al.*, 1995; Kleinjan *et al.*, 2001; Lauderdale *et al.*, 2000). Für die Aniridie waren zuvor nur Missense-, Nonsense-, Rasterschub- und Spleißstellen-Mutationen sowie Deletionen und Insertionen des *PAX6*-Gens beschrieben worden (Brown *et al.*, 1998; Prosser & van Heyningen, 1998). Es konnte experimentell gezeigt werden, dass eine im 3'-Bereich des Gens gelegene, 125 Kb entfernte Region für eine korrekte zeitliche und örtliche Expression des *PAX6*-Gens verantwortlich ist und dass eine Trennung der Transkriptionseinheit von diesem Element Aniridie verursacht (Griffin *et al.*, 2002; Kleinjan *et al.*, 2001). Analog dazu konnte bei mehreren Patienten im Zusammenhang mit X-chromosomal vererbter Gehörlosigkeit ~900 Kb stromaufwärts des *POU3F4* (*POU domain, class 3, transcription factor 4*)-Gens eine Deletion gefunden werden (de Kok *et al.*, 1995; de Kok *et al.*, 1996). Zusammengefasst kann also festgehalten werden, dass von der Transkriptionseinheit eines Krankheitsgens weit entfernt liegende Bruchpunkte ebenfalls pathogen sein können, indem sie zu einer örtlich und/oder zeitlich veränderten bzw. verminderten Expression des betreffenden Gens führen und damit einen so genannten Positionseffekt ausüben (Kleinjan & van Heyningen, 1998).

Grundsätzlich kann die Genexpression auf drei Ebenen reguliert werden. Erstens durch den Promotor, an dem die Bindung und Initiation des Transkriptionskomplexes stattfindet. Zweitens über „enhancer“ und „silencer“, kurze ~20 Bp lange DNA-Elemente, die in unterschiedlicher Entfernung zur Transkriptionseinheit lokalisiert sein können und durch Bindung spezifischer Proteine die Ausbildung des Transkriptionskomplexes begünstigen oder



inhibieren (Takeuchi *et al.*, 1999). Eine besondere Form dieser „enhancer“ sind bis zu 1 Mb entfernt in *cis* zum entsprechenden Gen lokalisierte DNA-Elemente, die auch „long range regulatory elements“ genannt werden, und für eine korrekte örtliche und zeitliche Genexpression wichtig sind (Lettice *et al.*, 2003; Lettice & Hill, 2005). Drittens kann die Expression von Genen über die lokale Chromatinstruktur, die je nach Zugänglichkeit für bestimmte Proteine einen aktivierenden oder inhibierenden Einfluss auf die Transkription haben kann, reguliert werden (Kleinjan & van Heyningen, 1998; West & Fraser, 2005).

Die in den letzten Jahren erfolgte vollständige Genomsequenzierung diverser Organismen eröffnete die Möglichkeit der computergestützten Analyse dieser Daten und konnte auch zum besseren Verständnis der molekularen Ursachen von Positionseffekten beitragen. So wurde erkannt, dass im Laufe der Evolution auch nicht-kodierende DNA-Abschnitte in Vertebraten konserviert wurden (Duret *et al.*, 1993). Möglicherweise bestehen ca. 1–2 % des humanen Genoms aus solchen nicht-kodierenden konservierten Sequenzen (Dermitzakis *et al.*, 2005). Durch DNA-Homologievergleiche konnte beispielsweise gezeigt werden, dass eine 2 Kb große Region im 5'-Bereich des humanen *POU3F4*-Gens eine 80 %-ige Übereinstimmung zur entsprechenden murinen DNA-Sequenz aufweist (Cremers und Cremers, 2004). Mit Hilfe eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass eine Fehlregulation der *Pou3F4* Genexpression, bedingt durch eine Inversion dieses entsprechenden Abschnitts, zu einem Hörverlust führt (Phippard *et al.*, 2000). Diese konservierte Region repräsentiert ein *cis* aktives „long range regulatory“ Element des *Pou3F4*-Gens und reguliert dessen korrekte örtliche und zeitliche Expression (Heydemann *et al.*, 2001). Diese Beobachtungen waren ein Indiz dafür, dass nicht-kodierende regulatorische DNA-Sequenzelemente auch mit humanen Erkrankungen im Zusammenhang stehen können (Phippard *et al.*, 2000). Neben der Deletion, und Disruption von regulatorischen DNA-Sequenzelementen wurden sogar pathogene Punktmutationen in einem dieser Elemente beschrieben. So zeigte sich, dass die autosomal-dominant erbliche präaxiale Polydaktylie (MIM 174500), eine Skelettfehlbildung der Hände, durch Punktmutationen in einer ~1 Mb vom *SHH* [*sonic hedgehog homolog (Drosophila)*]-Gen entfernten, ~500 Bp umfassenden konservierten Region verursacht werden kann (Lettice *et al.*, 2003; Sagai *et al.*, 2004). Dadurch wurde gezeigt, dass heterozygote Mutationen in konservierten, nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen, die in großer Entfernung zu einer Transkriptionseinheit lokalisiert sind, krankheitsverursachend sein können.

### **3. Das Zimmermann-Laband-Syndrom**

#### **3.1 Klinik**

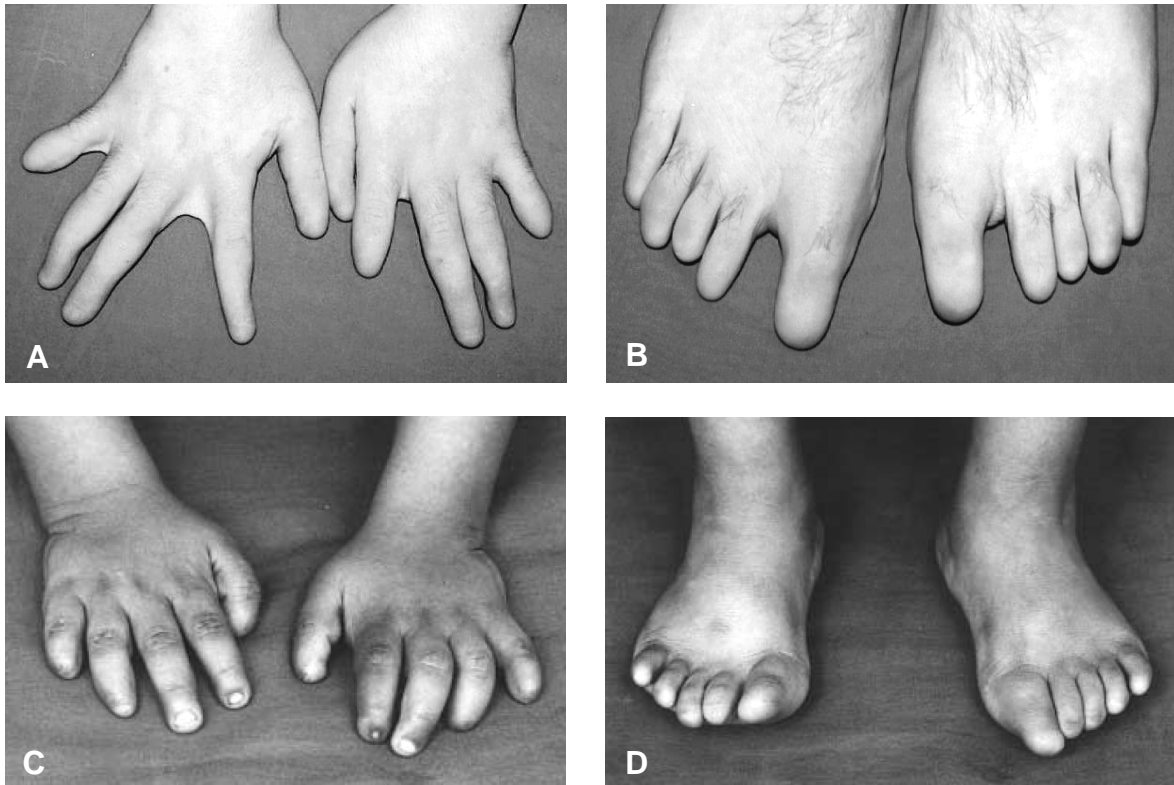
Im Jahr 1928 wurden u.a. drei Patienten, die im zahnärztlichen Institut der Universität Königsberg vorstellig geworden waren, von dem dort tätigen Arzt, Herrn Dr. Zimmermann, beschrieben. Die Patienten zeigten faziale und skelettale Dysmorphien, eine Erkrankte wies eine geistige Behinderung auf (Zimmermann, 1928). 36 Jahre später wurde von einem in Trinidad tätigen Zahnarzt eine große Familie beschrieben, deren Mitglieder gleichartige klinische Auffälligkeiten aufwiesen (Laband *et al.*, 1964). Bereits ein Jahr darauf wurde der Bericht von einer weiteren Familie mit identischen phänotypischen Ausprägungen veröffentlicht (Alavandar, 1965). Aufgrund der ähnlichen klinischen Zeichen und Symptome bei den insgesamt 15 Betroffenen wurde diese Erkrankung fortan als Zimmermann-Laband-Syndrom (ZLS) bezeichnet (MIM 135500). Bis zum heutigen Tag wurden weltweit 27 klinische Abhandlungen über 43 Patienten mit dem ZLS veröffentlicht. Die Anzahl, die Geschlechterverteilung, die familiäre Häufung und eine Assoziation von chromosomalen Rearrangements bei den Erkrankten ist in der Tabelle 1 dargestellt.

Nr.	Autor	Land	Geschlecht der Patienten		Publikations-jahr
			F	M	
1	Zimmermann	Deutschland	1	2	1928
2	Jacoby <i>et al.</i>	Großbritannien	1	-	1940
3	Laband <i>et al.</i>	Trinidad	4*	2*	1964
4	Alavandar	Indien	1*	4*	1965
5	Atanasov <i>et al.</i>	Bulgarien	1 <sup>+</sup>	1	1979
6	Oikawa <i>et al.</i>	USA	1	-	1979
7	Chodriker <i>et al.</i>	Kanada	-	1	1986
8	De Pina Neto <i>et al.</i>	Brasilien	1	-	1988
9	Beemer	Niederlande	1	-	1988
10	Il'ina <i>et al.</i>	Ukraine	1	-	1988
11	Bazoupoulou-Kyrkanidou <i>et al.</i>	Griechenland	1	-	1990
12	Bakaeen und Sully	Jordanien	1	1	1991
13	Pfeiffer <i>et al.</i>	Deutschland	-	2	1992
14	Koch <i>et al.</i>	Deutschland	1	-	1992
15	Chadwick <i>et al.</i>	Großbritannien	1	1	1994
16	Lacombe <i>et al.</i>	Frankreich	-	1	1994
17	Van Buggenhout <i>et al.</i>	Niederlande	-	1	1995
18	Robertson <i>et al.</i>	Australien	-	1	1998
19	Dumic <i>et al.</i>	Kroatien	1	-	1999
20	Stefanova <i>et al.</i>	Deutschland	2 <sup>*#+</sup>	-	2003
21	Holzhausen <i>et al.</i>	Brasilien	1	-	2003
22	Shah <i>et al.</i>	Indien	-	1	2004
23	Davalos <i>et al.</i>	Mexiko	1	1	2005
24	Atabek <i>et al.</i>	Türkei	-	1	2005
25	Kim <i>et al.</i>	USA	-	1 <sup>#</sup>	2006
26	Hogendijk <i>et al.</i>	Südafrika	-	1 <sup>#</sup>	2006
27	Kissi <i>et al.</i>	Frankreich	1	-	2006

**Tab. 1: Veröffentlichungen zum Zimmermann-Laband-Syndrom**

Die Anzahl, das Geschlecht, die familiäre Häufung und die Assoziation mit chromosomalen Rearrangements bei den beschriebenen Individuen sowie die Autoren, das Herkunftsland der Patienten bzw. der Publikation und das Veröffentlichungsjahr sind angegeben. In 27 klinischen Fallbeschreibungen wurden (seit 1928) 43 Patienten mit dem ZLS dokumentiert. Dreimal konnte von einem familiär gehäuften Auftreten (\*) und dreimal von einer Assoziation mit einem chromosomalen Rearrangement (#) berichtet werden. Eine Patientin (+) wurde zweimal beschrieben. F: weiblich, M: männlich.

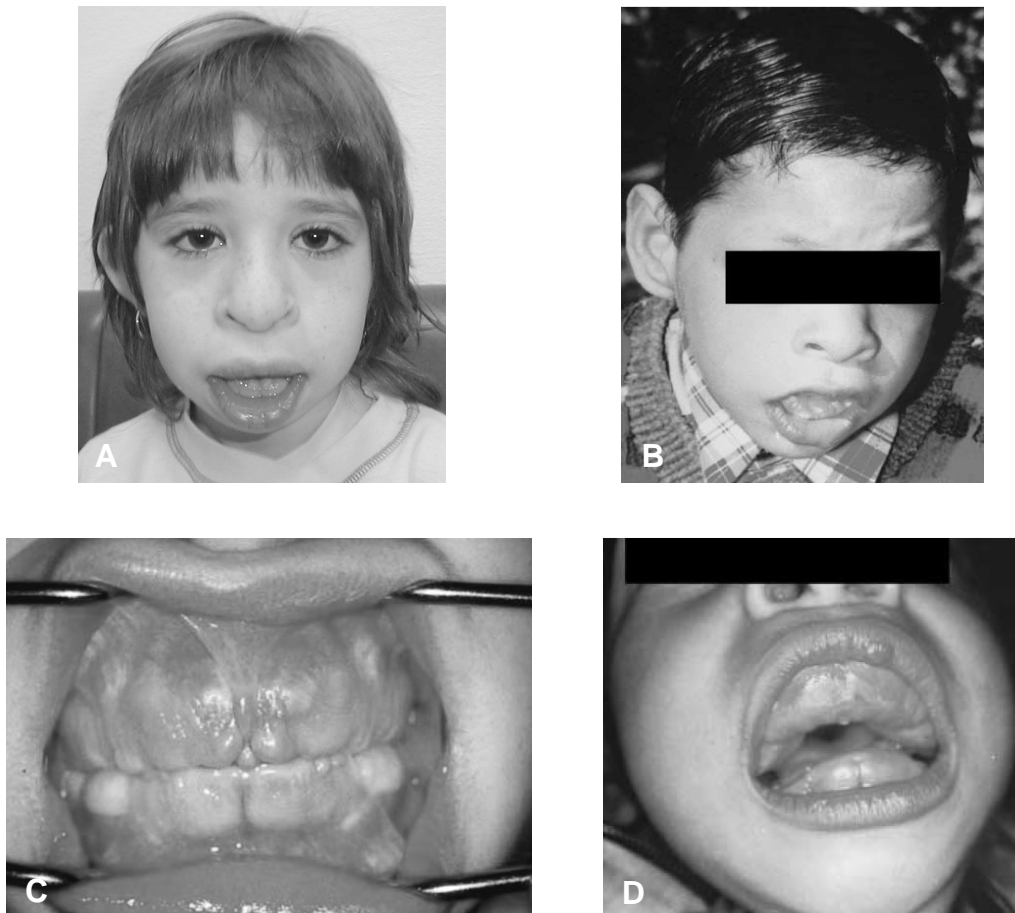
Es stellten sich bei allen am ZLS erkrankten Personen übereinstimmende phänotypische Merkmale dar. Charakteristisch für diese Erkrankung ist die Kombination fazialer Dysmorphien mit bestimmten skelettalen Auffälligkeiten. Bei den skelettalen Anomalien handelt es sich um eine Aplasie bzw. Hypoplasie und/oder Dysplasie der terminalen Phalangen und/oder der Finger- und Fußnägel (Abb. 1).



**Abb. 1: Fotos von Händen und Füßen ausgewählter Patienten mit dem Zimmermann-Laband-Syndrom**

Gezeigt ist die Aplasie und Hypoplasie bzw. Dysplasie der terminalen Phalangen sowie der Finger- und Fußnägel. Fotos eines französischen Patienten (A und B) aus dem in dieser Arbeit untersuchten Kollektiv und Fotos aus Shah *et al.* 2004 (C und D).

Patienten mit dem ZLS zeigen charakteristische faciale Dysmorphien, wie ein grobes Gesicht, vergrößerte periorale Weichgewebe, eine prominente Nase sowie vergrößerte Labien und Ohren (Abb. 2A und B). Die cartilaginären Gewebe von Nase und Ohren zeichnen sich bei Patienten mit dem ZLS häufig durch eine weiche Beschaffenheit aus. Weitere Merkmale sind die sowohl mandibuläre als auch maxilläre Gingivafibromatose (Abb. 2C und D).



**Abb. 2: Fotos von Gesicht und Gingiva ausgewählter Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom**

Gezeigt sind vergrößerte Labien, prominente Nase und Ohren (A und B) sowie die Gingivafibromatose (C und D). Fotos einer bulgarischen Patientin aus Stefanova *et al.* 2003 (A und C) und Fotos eines indischen Patienten aus Shah *et al.* 2004 (B und D).

Die häufigsten phänotypischen Merkmale von 43 Patienten mit dem ZLS sind zusammenfassend in Tabelle 2 dargestellt.

Klinisches Merkmal	Anzahl der beschriebenen Patienten
Gingivafibromatose	43*
Aplasie, Hypoplasie oder Dysplasie der terminalen Phalangen und/oder der Finger- bzw. Fußnägel	43*
Vergrößerte Weichgewebe	
- knollige weiche Nase	30
- vergrößerte Ohren	22
- vergrößerte Labien	15

**Tab. 2: Häufigkeit der Leitsymptome des Zimmermann-Laband-Syndroms bei den 43 bisher beschriebenen Patienten**

Die bei allen beschriebenen Patienten mit dem ZLS vorliegende Gingivafibromatose sowie die Skelettanomalien können als Leitsymptome des Syndroms angesehen werden und sind durch einen Stern (\*) gekennzeichnet.

Bei Patienten mit dem ZLS finden sich einige fakultativ auftretende klinische Charakteristika. So zeigte sich bei 11 Patienten eine mentale Retardierung, die bei drei Betroffenen schwer und bei acht mild war. Ferner stellten sich häufig Hypertrichose, hyperextensible Gelenke und eine Vielzahl von vereinzelt auftretenden abdominalen, kranialen und skelettalen Symptomen dar, die assoziiert mit dem ZLS auftraten und in Tabelle 3 aufgeführt sind.

<b>Organ</b>	<b>Symptome, die mit dem ZLS assoziiert sind</b>
Zentrales Nervensystem	mentale Retardierung Epilepsie Tremor
Kopf	Makrozephalie partielle Anodontie unvollständige Zahneruption hohes Palatum Makroglossie
Auge	Myopie Retinitis pigmentosa Katarakt Synophrys abundante Augenbrauen
Skelett	Skoliose Kyphose Kontrakturen der Extremitäten Spina bifida occulta hyperextensible Gelenke Trommelschlägelfinger Hallux valgus Genu valgum Cubitus valgus Pes cavus
Abdomen	Umbilikalhernie Hepatosplenomegalie
Haut	Hypertrichose dick, trocken
Muskulatur	hypoton

**Tab. 3: Fakultativ auftretende Merkmale bei Patienten mit dem Zimmermann-Laband-Syndrom**

Es ist hervorzuheben, dass eine Vielzahl von fakultativen Symptomen das Skelett betreffen.

### 3.2 Vererbung des Zimmermann-Laband-Syndroms

Das ZLS wurde familiär gehäuft auftretend beschrieben. In der erstbeschriebenen, aus Ostindien stammenden Familie zeigten sechs Individuen in zwei aufeinanderfolgenden Generationen das ZLS (Laband *et al.*, 1964). Bei fünf von sieben Kindern sowie bei deren Mutter wurden ZLS-spezifische Merkmale dokumentiert.

In einer zweiten, aus Südindien stammenden Familie, die von Alavandar (1965) beschrieben wurde, zeigten fünf Individuen in drei Generationen das ZLS. Die betroffene Mutter hatte drei Söhne, die ebenfalls ZLS-spezifische Merkmale zeigten. Der jüngste dieser Söhne hatte wiederum einen an ZLS erkrankten Sohn. Die beiden letztgenannten Personen zeigten zum Zeitpunkt der Untersuchung eine moderate Ausprägung der klinischen Merkmale.

Die dritte Familie, in der eine ZLS-Segregation dokumentiert wurde, stammt aus Bulgarien und weist zwei am ZLS erkrankte Frauen in zwei Generationen auf. Zusätzlich zu den ZLS-spezifischen Merkmalen konnte bei beiden Betroffenen eine 3;8-Translokation im Rahmen einer Chromosomenanalyse aufgedeckt werden (Stefanova *et al.*, 2003).

Durch diese Fälle, in denen das ZLS familiär gehäuft in aufeinanderfolgenden Generationen auftrat, beide Geschlechter betroffen waren, eine Übertragung vom Vater auf den Sohn dokumentiert wurde und stets ein Elternteil der ebenfalls betroffenen Kinder ZLS-spezifische Merkmale zeigte, kann eine autosomal-dominante Vererbung des Syndroms postuliert werden.

## 4. Wnt-abhängige Signalwege

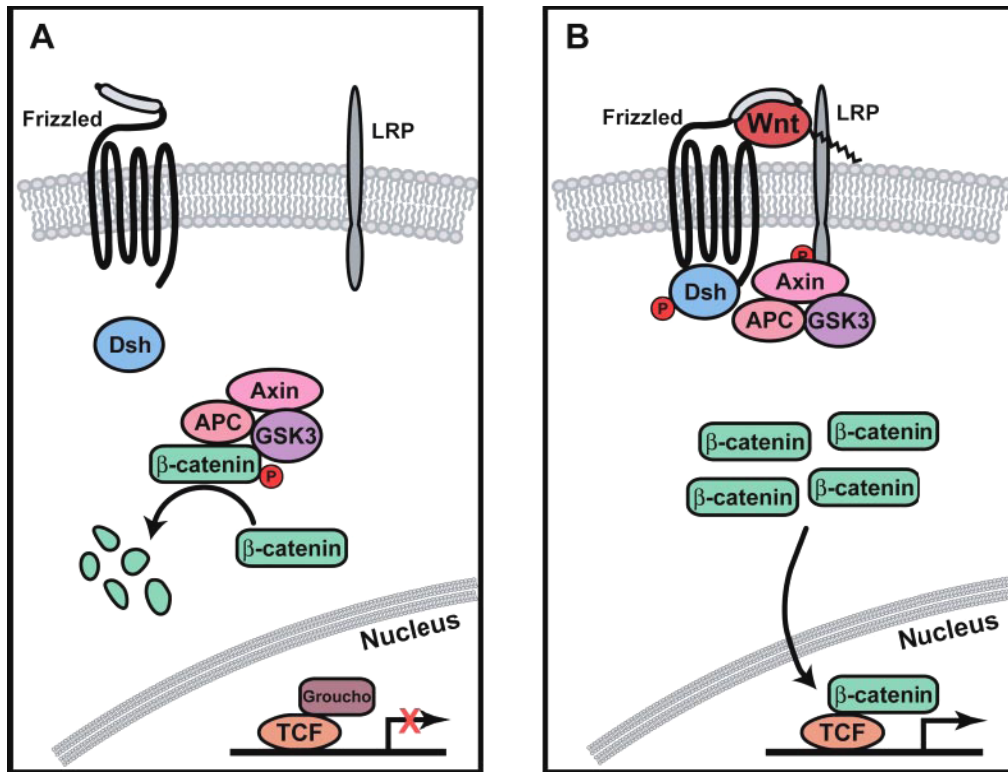
Angeborene Skelettfehlbildungen der Extremitäten sind durch ein breites Spektrum phänotypischer Manifestation gekennzeichnet und sind durch diverse genetische Defekte verursacht (Schwabe & Mundlos, 2004). In den letzten Jahren konnte eine Assoziation derartiger klinischer Merkmale mit Defekten von Genen des WNT-abhängigen Signalwegs beschrieben werden (Cohen, 2006). Wnt-Proteine gehören zu einer Klasse von evolutionär hoch konservierten sekretierten Signalmolekülen, die eine zentrale Rolle in der embryonalen Entwicklung spielen, da sie grundlegende Prozesse während der Gastrulation und Neurulation regulieren (Keller, 2002; Wallingford *et al.*, 2002). Im adulten Gewebe sind Wnt-abhängige Signalwege an der Erhaltung der Gewebemöostase sowie an der Karzinogenese beteiligt (Nusse, 2005). Der Name „Wnt“ stammt vom *Drosophila*-Gen *wingless* (*Wg*) und dessen murinen Ortholog *mouse mammary tumor virus* (MMTV) *integration site family, member 1* (*int-1*) (Rijsewijk *et al.*, 1987). Es konnten 19 humane WNT-Gene identifiziert und deren

Genprodukte in zwei Klassen eingeteilt werden: Die kanonischen (z.B. Wnt2 und Wnt3a) und nicht-kanonischen Wnts (z.B. Wnt4 und Wnt5a) (Miller, 2002; Nusse, 2001). Diese Klassifizierung basiert auf den Eigenschaften der kanonischen Moleküle, in *Xenopus*-Embryonen die Ausbildung einer zweiten Dorsal-Ventral-Achse sowie die morphologische Transformation von Mammaepithelzellen der Maus zu induzieren (Du *et al.*, 1995; Olson & Papkoff, 1994; Shimizu *et al.*, 1997; Wong *et al.*, 1994). Die nicht-kanonischen Wnts hingegen induzieren diese Prozesse nicht.

Der kanonische Wnt-abhängige Signalweg stellt sich vereinfacht wie folgt dar: Bei Abwesenheit von Wnt-Proteinen erfolgt intrazellulär eine Bindung der Proteine Axin, GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) und APC (adenomatöse Polyposis coli) an  $\beta$ -Catenin. Dieser Komplex induziert die  $\beta$ -Catenin-Degradation (Farr *et al.*, 2000; Salic *et al.*, 2000). Dabei ist die durch GSK3 vermittelte  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung der entscheidende Schritt für die dann durch das Ubiquitin-Proteasom-System erfolgende Degradation des  $\beta$ -Catenins (Aberle *et al.*, 1997; Yanagawa *et al.*, 2002). Die intrazelluläre  $\beta$ -Catenin-Konzentration wird somit gering gehalten; eine Akkumulation im Zytoplasma und Zellkern kann also nicht stattfinden. Der T-Zell-spezifische Transkriptionsfaktor (TCF) wird durch Bindung an Groucho inaktiviert und die Wnt-spezifische Transkription reprimiert (Brannon *et al.*, 1997; Cavallo *et al.*, 1998) (Abb. 3).

Werden Wnt-Proteine sekretiert, binden diese an die Klasse der transmembranösen Fzd-Rezeptoren (*Frizzled*), dabei erfolgt auch eine Interaktion mit einem Molekül der Lrp (*low density lipoprotein receptor-related protein*)-Klasse, wodurch sich extrazellulär ein ternärer Wnt-Fzd-Lrp-Komplex bildet (Bhanot *et al.*, 1996; Tamai *et al.*, 2000). Die intrazelluläre Domäne der Fzd-Rezeptoren kann mit Dsh (*Dishevelled*) interagieren (Chen *et al.*, 2003). Dsh ist ein wichtiger Mediator des Wnt-Signals, steht mit vielen Molekülen in Wechselwirkung und kann auf diverse, noch nicht im Detail verstandene Art und Weise den Axin-APC-GSK3-Komplex an die Zellmembran rekrutieren und dadurch inaktivieren (Habas & Dawid, 2005; Malbon & Wang, 2006; Wallingford & Habas, 2005). Dies geschieht jedoch wahrscheinlich erst nach einer Phosphorylierung von Dsh (Gordon & Nusse, 2006). Die Inaktivierung des Axin-APC-GSK3-Komplexes erfolgt auch durch eine Wnt-induzierte, intrazelluläre Lrp-Phosphorylierung mit nachfolgender Axin-Bindung (Mao *et al.*, 2001b). Durch eine nun ausbleibende  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung steigt folglich dessen Konzentration. Das  $\beta$ -Catenin akkumuliert daraufhin im Zytoplasma und transloziert in den Nukleus, wo eine Interaktion mit TCF stattfindet (Tolwinski & Wieschaus, 2004). Daraus resultiert eine transkriptionelle Aktivierung der Wnt-spezifischen Gene (Nusse, 1999) (Abb. 3).





**Abb. 3: Schematische Darstellung der kanonischen Wnt-abhängigen Signaltransduktion**

(A) Ohne ein extrazelluläres Wnt-Signal wird die zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin-Konzentration gering gehalten. Der ternäre Axin-APC-GSK3-Komplex führt zu einer durch GSK3 vermittelten  $\beta$ -Catenin-Phosphorylierung mit nachfolgender Degradation des  $\beta$ -Catenins. Im Nucleus wird die Wnt-spezifische Transkription durch eine TCF-Groucho-Interaktion reprimiert. (B) Wnt-Bindung an Frizzled und LRP führt intrazellulär zu einer Interaktion von phosphoryliertem Dsh und Frizzled. Zudem wird LRP intrazellulär phosphoryliert und bindet daraufhin Axin. Der Axin-APC-GSK3-Komplex wird durch LRP und Frizzled-Dsh an die Zellmembran transloziert, eine  $\beta$ -Catenin-Degradation bleibt aus. Die resultierende zytoplasmatische  $\beta$ -Catenin-Akkumulation führt zu einer Translokation in den Nucleus und einer Bindung an TCF. Die transkriptionelle Aktivierung der Wnt-spezifischen Gene erfolgt durch TCF. Phosphorylierungen sind durch rote, mit einem „P“ gekennzeichnete Kreise dargestellt. APC: adenomatöse Polyposis coli; Dsh: *Dishevelled*; GSK3: Glykogen-Synthase-Kinase 3; LRP: *low density lipoprotein receptor-related protein*; TCF: T-Zell spezifischer Transkriptionsfaktor. (Abbildung aus Gordon und Nusse, 2006)

Wnt-Signale können von einer Reihe sekretierter Proteine bereits im extrazellulären Bereich moduliert werden. So binden z.B. Moleküle der Dkk (*Dickkopf*)-Familie an Lrp (Mao *et al.*, 2001a) und können dadurch einen antagonistischen Wnt-Effekt ausüben (Fedi *et al.*, 1999; Mao *et al.*, 2001a). Dkks können auch mit dem transmembranösen Rezeptor Kremen interagieren und dadurch eine Lrp-Internalisierung induzieren und somit die Anzahl der Lrp-Moleküle an der Zelloberfläche herunterregulieren (Mao *et al.*, 2002). Eine Vielzahl von weiteren nicht erwähnten extra- und intrazellulären Interaktionspartnern und Modulatoren sind bekannt und an der in Abbildung 4 schematisch dargestellten kanonischen Wnt-abhängigen Signalkaskade beteiligt.

Zwei gut charakterisierte nicht-kanonische Wnt-Signalwege, die von  $\beta$ -Catenin unabhängig sind, konnten beschrieben werden: Der „planar cell polarity pathway“ (PCP) und der

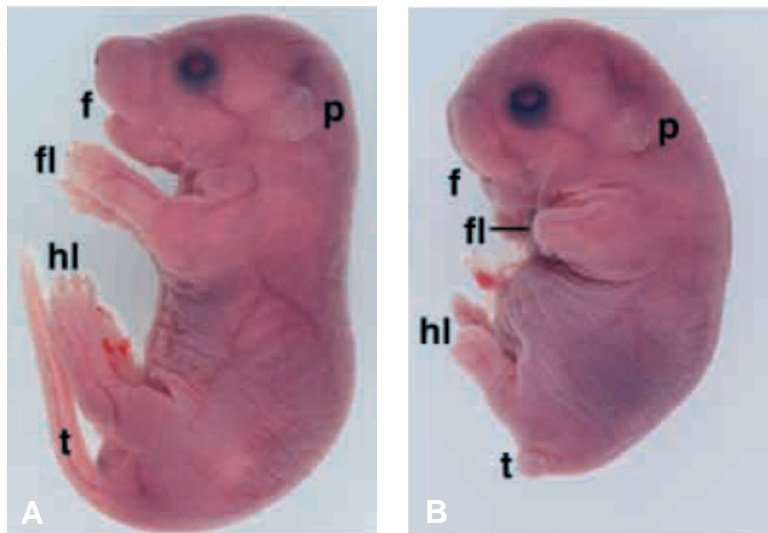
Wnt/Kalzium-Signalweg (Ciani & Salinas, 2005). Der PCP-Wnt-Signalweg ist für die orthogonale Polarität der Zellen in Epithelien und die konvergente Extension während der Gastrulation als auch für die korrekte Orientierung der Cochleazellen des Innenohrs notwendig (Dabdoub *et al.*, 2003; Huelsken & Behrens, 2002). Der Wnt/Kalzium-Signalweg ist indes im Verlauf der Gastrulation für Zellbewegungen und die Herzdifferenzierung von Bedeutung (Kuhl *et al.*, 2000; Sheldahl *et al.*, 2003; Veeman *et al.*, 2003).

Ein weiterer nicht-kanonischer Wnt-abhängiger Signalweg, dessen Transduktion erst ansatzweise verstanden ist, wird durch RTKs (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) vermittelt. Die *Ror1* und *Ror2* (*r*eceptor *t*yrosine *k*inase-*l*ike *o*rphan *r*eceptor *1*- und *2*)-Genprodukte stehen mit Zellmigration und vor allem mit der Skelett- sowie Herzentwicklung im Zusammenhang (Nishita *et al.*, 2006; Nomi *et al.*, 2001). *In vitro* konnte eine Wnt5a-Ror2-Interaktion gezeigt werden (Oishi *et al.*, 2003). Eine Wnt5a-Interaktion mit Derailed, einer atypischen Rezeptor-Tyrosin-Kinase, wurde im Kontext der Axonwegfindung beobachtet (Yoshikawa *et al.*, 2003). Es konnte auch gezeigt werden, dass die Wnt5a-Ror2-Interaktion eine reprimierende Wirkung auf die Wnt-spezifische Transkription im Zellkern hat (Mikels & Nusse, 2006). Ferner wurde durch Experimente an Osteoblasten ein modulierender Einfluss der Wnt-spezifischen Transkription durch den Ror2-Signalweg beschrieben (Billiard *et al.*, 2005).

In den letzten Jahren konnten viele Erkenntnisse über die biologische Bedeutung und molekularen Mechanismen der Wnt-abhängigen Signalwege erlangt werden. Die Komplexität und Diversität, die sich darstellt, ist jedoch erst ansatzweise verstanden.

#### **4.1 Skelettveränderungen im Zusammenhang mit Wnt-abhängigen Signalwegen**

In Verbindung mit Fehlbildungen des Skeletts und der Aufklärung zugrunde liegender molekularer Pathomechanismen konnte in den letzten Jahren eine Vielzahl von Hinweisen zur Beteiligung des Wnt-abhängigen Signalwegs an der Chondrogenese und der Skelettentwicklung gesammelt werden (Hartmann, 2006). Primär gelang dies durch die Analyse von Tiermodellen und durch die Aufklärung des genetischen Defekts bei humanen Skelettfehlbildungen. So zeigte sich bei der Maus und beim Huhn, dass eine Wnt5a- bzw. Wnt5b-Überexpression zu einer verspäteten Chondrozytenreifung führte (Yang *et al.*, 2003). Die *Wnt5a*-defiziente Maus wurde von Yamaguchi *et al.* (1999) untersucht und ist durch verkürzte Extremitäten, einen rudimentär ausgebildeten Schwanz sowie kraniale Fehlbildungen charakterisiert und in Abbildung 4 dargestellt.



**Abb. 4: Phänotyp einer *Wnt5a*-defizienten Maus im Vergleich zum Wildtyp**

(A) Seitliche Ansicht eines Wildtyp- und (B) eines *Wnt5a*-defizienten Mausembryos 18,5 Tage nach der Befruchtung. Es sind deutlich abnormal ausgebildete Extremitäten und kraniale Strukturen, ein kaum ausgebildeter Schwanz und eine allgemein verkürzte anterior-posterior-Achse bei dem *Wnt5a*-defizienten Embryo zu erkennen. f: frontonasale Region; fl: vordere Extremitäten; hl: hintere Extremitäten; p: Ohr; t: Schwanz (Bilder aus Yamaguchi *et al.* 1999).

Die Notwendigkeit des *Ror2*-Genproduktes für die Chondrozytendifferenzierung konnte durch die Analyse von *Ror2*-defizienten Mäusen gezeigt werden (DeChiara *et al.*, 2000). Ferner weisen *Wnt5a*- und *Ror2*-defiziente Mäuse einen ähnlichen Phänotyp auf, der u.a. durch verkürzte Extremitäten, Minderwuchs und kraniale Anomalien gekennzeichnet ist (Oishi *et al.*, 2003).

Beim Menschen konnten bisher die Ursachen von sechs Skeletterkrankungen, die nachweislich mit dem Wnt-abhängigen Signalweg in Verbindung stehen, aufgeklärt werden.

Die Tetra-Amelie (MIM 273395) ist durch Aplasie der Extremitäten charakterisiert und wird autosomal-rezessiv vererbt. In allen Fällen fand sich eine Assoziation mit kraniofazialen, pulmonalen, skelettalen und urogenitalen Auffälligkeiten (Basaran *et al.*, 1994; Gershoni-Baruch *et al.*, 1990; Rosenak *et al.*, 1991; Zimmer *et al.*, 1985; Zlotogora *et al.*, 1993). Bisher konnte bei Betroffenen Personen einer Familie eine homozygote Nonsense-Mutation im *WNT3*-Gen beschrieben werden (Niemann *et al.*, 2004).

Das Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzler-Phokomelie-Syndrom (MIM 276820) ist durch Extremitäten- und/oder Becken-Hypoplasie bzw. -Aplasie und das Fuhrmann-Syndrom (MIM 228930) durch Fibulaaplasie und/oder -hypoplasie, Femur-Krümmung, Poly-, Syn- und/oder Oligodaktylie bei den Betroffenen charakterisiert. Die genetische Ursache dieser Erkrankungen konnte von Woods *et al.* (2006) aufgeklärt werden. In zwei Familien, in denen jeweils eine der beiden genannten Erkrankungen bei betroffenen Individuen auftrat, konnten zwei unterschiedliche homozygote Missense-Mutationen im *WNT7A*-Gen als krankheitsursächlich identifiziert werden.

Nicht nur Mutationen in *WNT*-Genen, sondern auch in Genen, die für WNT-Rezeptorproteine des kanonischen und nicht-kanonischen WNT-abhängigen Signalwegs kodieren, stehen im Zusammenhang mit Skelettfehlbildungen. So konnten Oldridge *et al.* (2000) und Schwabe *et*

*al.* (2000) eine Assoziation von heterozygoten Nonsense-Mutationen und heterozygoten Insertionen und auch Deletionen im *ROR2*-Gen mit der Brachydaktylie Typ B (BDB) (MIM 113000) zeigen. Diese Mutationen führen zu einem C-terminal verkürzten Protein. Dadurch gehen intrazellulär lokalisierte Domänen des Proteins verloren. BDB-Patienten zeigen verkürzte terminale Phalangen sowie Onychodysplasie und in einigen Fällen u.a. prominente Lippen und eine knollige Nase (Houlston & Temple, 1994). Homozygote Missense- bzw. Nonsense-Mutationen des *ROR2*-Gens, die hingegen zu Veränderungen der extrazellulären Frizzled- oder der intrazellulären Tyrosinkinase-Domäne des *ROR2*-Proteins führen, resultieren bei Betroffenen im autosomal-rezessiv vererbten Robinow-Syndrom (MIM 862310) (Afzal *et al.*, 2000). Der Phänotyp ist u.a. durch Nanosomie mit ausgeprägter Mesomelie, Makrozephalie, fazialen Dysmorphien wie u.a. ein breiter Nasenrücken, Mikrognathie, ein flaches Gesichtsprofil, prominente Ohren und Makroglossie sowie Gingivahypertrophie gekennzeichnet (Robinow *et al.*, 1969). Eine autosomal-dominant vererbte Form des Robinow-Syndroms (MIM 180700) wurde von Vallee *et al.* (1982) beschrieben, allerdings ist der genetische Defekt unbekannt. Das Robinow-Syndrom und BDB sind damit allelische Erkrankungen (Afzal *et al.*, 2000).

Das autosomal-rezessiv vererbte Osteoporose-Pseudogliom-Syndrom (OPPG) (MIM 259770) ist durch ophthalmologische Merkmale wie u.a. Pseudogliome, Mikrophthalmie, vitreoretinale Anomalien, Phthisis bulbi und diverse Skelettdeformationen sowie eine geringe Knochendichte und dadurch bedingte spontane Frakturen und auch hyperextensible Gelenke gekennzeichnet. In Familien mit konsanguinen Eltern konnten bei den betroffenen Kindern homozygote Frameshift-, Missense- und Nonsense-Mutationen des *LRP5*-Gens identifiziert werden (Gong *et al.*, 2001b).

Nach aktuellen Erkenntnissen sind neben den Wnt-Proteinen auch R-Spondine Liganden des Wnt-Rezeptors Fzd8 und aktivieren die *Wnt*-spezifische Transkription (Nam *et al.*, 2006a). Abweichend vom kanonischen Wnt-abhängigen Signalweg bilden Spondine jedoch keinen ternären extrazellulären Komplex durch Interaktion mit Lrp-Rezeptoren (Nam *et al.*, 2006b). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass die autosomal-rezessiv vererbte Anonychie (MIM 206800) mit Mutationen im *RSPO4* (*R-spondin family, member 4*)-Gen assoziiert ist (Bergmann *et al.*, 2006; Blaydon *et al.*, 2006).

## 5. Ziel der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten umfassende Mutations- und Expressionsanalysen bei Patienten mit dem Zimmermann-Laband-Syndrom (ZLS) durchgeführt werden. Dabei gaben zwei verschiedene, mit dem ZLS assoziierte Translokationen, eine 3;8- und eine 3;17-Translokation, Hinweise auf eine vielversprechende Kandidatengenregion: Die Bruchpunkte der beiden derivativen Chromosomen 3 liegen ~280 Kb in 3p14.3 auseinander. Es wurde daher eine Assoziation der Translokationsbruchpunkte in 3p14.3 mit dem ZLS vermutet. Die durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierungen (FISH) eingegrenzten Bruchpunkte der 3;8-Translokation sollten auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Es sollte untersucht werden, ob eins der in der Bruchpunktregion lokalisierten Kandidatengene bei elf sporadischen Patienten mit ZLS pathogene Mutationen aufweist. Für den Fall, dass keine pathogenen Mutationen identifiziert werden, sollten sich Expressionsanalysen für einige Gene in 3p14.3 bei sporadischen Patienten mit ZLS anschließen. Mit dieser Analyse sollten mögliche Mutationen in regulatorischen Elementen, die zu einer Fehlregulation der Genexpression geführt haben, aufgedeckt werden. FISH- und SNP-Untersuchungen können des Weiteren bei der Suche nach heterozygoten Mikrodeletionen helfen. Auch Mutationen in putativen „long range regulatory elements“ sind als krankheitsursächlich bekannt und entsprechende Untersuchungen sollten ggf. auch in dieser Arbeit durchgeführt werden.

### III. Material und Methoden

#### 1. Material

##### 1.1 Patienten mit dem Zimmermann-Laband-Syndrom bzw. einem mit dieser Erkrankung überlappenden Phänotyp

Das Patientenkollektiv umfasste zu Beginn neun und am Ende der Arbeit 22 Patienten mit phänotypischen Ausprägungen bzw. einem zum ZLS ähnlichen Phänotyp. Die Asservierung der Patienten-DNAs erfolgte durch Kontakte zu klinischen Genetikern aus der ganzen Welt. Alle Patienten bzw. deren Eltern waren über Art und Ziel der Untersuchung aufgeklärt und nahmen freiwillig an der Studie teil. Die verwendete genomische DNA wurde aus EDTA-Blut und/oder lymphoblastoiden Zelllinien der Patienten gewonnen.

Nachfolgend sind 22 Patienten beschrieben, die im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden. Die phänotypischen Merkmale sind in den Tabellen 4, 5 und 6 zusammenfassend dargestellt.

##### **Zwei Patientinnen mit ZLS und einer 3;8-Translokation:**

Zwei aus Bulgarien stammende Patientinnen, Mutter und Tochter, weisen charakteristische Merkmale des Zimmermann-Laband-Syndroms auf. So stellt sich bei beiden fazial ein grobes Gesicht mit vergrößerten perioralen Weichgeweben, prominenten Labien, ausgeprägter Gingivafibromatose, einer knolligen, weichen Nase und schlaffen Ohren dar. Die terminalen Phalangen sowie die Nägel an Händen und Füßen sind aplastisch. Es liegt bei beiden eine Entwicklungsverzögerung vor. Zytogenetisch weisen beide Patientinnen eine balanciert erscheinende reziproke Translokation  $t(3;8)(p14.3;q24.3)$  mit dem Karyotyp 46,XX auf. Die Familienanamnese ist neben den beiden Erkrankten unauffällig. Im Lauf der ersten beiden Schwangerschaften der betroffenen Mutter kam es jeweils zu einem Spontanabort. Die dritte Schwangerschaft brachte einen gesunden Jungen mit normalem Karyotyp hervor. Das Kind aus der vierten Schwangerschaft, eine Tochter, zeigt die oben geschilderten, für das Zimmermann-Laband-Syndrom typischen Merkmale. Der Vater ist gesund (Stefanova *et al.*, 2003).

##### **Patientin A:**

Diese aus Brasilien stammende Patientin wurde durch eine Sectio caesarea als zweites von 4 Kindern mit einem Gewicht von 4100 g und einer Größe von 51 cm nach einer komplikationslosen Schwangerschaft geboren. Zum Zeitpunkt der Geburt war die Mutter 28 und der Vater 33 Jahre alt. Die Eltern sind gesund, nicht konsanguin und die Geschwister der Patientin klinisch unauffällig. Die Patientin wies nach der Geburt einen Ikterus neonatorum auf und erhielt eine Phototherapie. Im Alter von 5 Monaten zeigte die Patientin ein normales Wachstum, jedoch eine knollige, weiche Nase, dicke, schlaffe Ohren, starke Gingivahypertrophie, Makroglossie und Hypertrichose, insbesondere an den Extremitäten und am Rücken. Die Metakarpal-, Interphalangeal- und Pedesgelenke wiesen schwache Ligamente auf und konnten überdehnt werden. Es wurden hypoplastische distale Phalangen und Nägel

der Daumen und der 2. Zehen festgestellt. Es lag eine generelle Hypertonie sowie Hepatomegalie (4 cm) und Splenomegalie (2 cm) vor. Die neuromotorische und Sprachentwicklung war verzögert. Laufen konnte das Mädchen mit 2 Jahren, die ersten Worte sprach sie mit 2 1/2 Jahren. Die Eruption der Dentes decidui war verspätet. Mit vier Jahren wurde eine Dysbalance der unteren Extremitäten, mit einem 2,5 cm bzw. 1 cm geringeren Umfang der linken Oberschenkel bzw. des linken Knöchels bemerkt. Im Alter von 8 Jahren und 9 Monaten, mit einer Größe von 122 cm [3.-10. Perzentile (Pz)], wurde eine Lordose und Pes planus sowie eine um 3 Jahre verzögerte mentale Entwicklung festgestellt (de Pina Neto *et al.*, 1988).

### **Patientin B:**

Diese vorgestellte deutsche Patientin (Karyotyp 46,XX) wurde nach einer normal verlaufenden Schwangerschaft mit einem Geburtsgewicht von 4050 g als erstes Kind gesunder und nicht konsanguiner Eltern geboren. Die elterlichen Großeltern sowie der 5-jährige Bruder der Patientin zeigten keine Auffälligkeiten. Zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung war die Patientin 8 Jahre und 9 Monate alt, 144,5 cm groß, wog 30 kg und wies einen Kopfumfang von 53,8 cm auf. Keiner dieser Werte wich von der Norm ab. Während der Eruption der Dentes decidui trat zunächst eine milde Gingivahypertrophie auf, die sich bis zum 9. Lebensjahr signifikant verstärkte. Die weiche und große Nase zeigte eine knorpelige Beschaffenheit. Die starke Gingivahypertrophie führte zu einer erschwerten Artikulation und verhinderte das Schließen des Mundes. Dies konnte durch eine Gingivektomie korrigiert werden. Radiologische Aufnahmen des Kiefers belegten eine unauffällige Zahnentwicklung. Alle Finger, die Zeigefinger ausgenommen, zeigten dystrophe und kleine Fingernägel. Radiologisch wurde eine Verkürzung der terminalen Phalangen der 5. Finger und primär geteilte terminale Phalangen des 1., 2. und 3. Fingers mit sekundären Verwachsungen festgestellt. Zudem wurde eine tapetoretinale Dystrophie diagnostiziert. Die Gelenke, Leber und Milz sowie das Behaarungsmuster waren unauffällig. Neurologische und labordiagnostische Auffälligkeiten lagen nicht vor (Koch *et al.*, 1992).

Im Verlauf der weiteren Entwicklung klagte die Patientin über zunehmende intestinale Schmerzen und Beschwerden. Im Alter von 18 Jahren wurden bilaterale Fibroadenome der Brüste operativ entfernt. In den Folgejahren wurde eine bis zum heutigen Tag andauernde Fibromyalgie diagnostiziert.

### **Patient C:**

Dieser aus Deutschland stammende Patient (Karyotyp 46,XY) ist das zweite Kind nicht konsanguiner, gesunder Eltern, mit einer unauffälligen Familienanamnese. Der ältere Bruder ist gesund. Die Schwangerschaft und Geburt waren komplikationslos. Mit einem Jahr soll das Kind laufen gelernt und einfache Melodien nachgesungen haben. Kurz nach einer Polioschluckimpfung seien generalisierte Krampfanfälle aufgetreten, die mit Phenobarbiturat behandelt wurden. Die geistige und statomotorische Entwicklung sei danach zurückgeblieben, so dass mit 3 Jahren die Aufnahme in eine Einrichtung für Behinderte erfolgte. Nach und nach trat eine Vergrößerung der Gesichtszüge und der

perioralen Weichgewebe in Erscheinung. Bei der letzten Untersuchung mit 16 Jahren wurde vor allem der Minderwuchs (160 cm, entspr. 3. Pz), eine generalisierte Hypertrichose, besonders an Schultern, Armen und Beinen, hervorgehoben. Eine Gingivahyperplasie wurde im Zusammenhang mit der antikonvulsiven Therapie seit dem 13. Lebensjahr gesehen. Es bestand eine Hypospadie I<sup>o</sup>, die Hoden waren deszendiert. Die Finger laufen spitz zu, beide Daumennägel sind hypoplastisch. Die Leber, aber nicht die Milz, zeigte sich gegenüber früheren Untersuchungen leicht vergrößert. Laboruntersuchungen ergaben normale Befunde und Oligo-, Mukolipido- und Mukopolysaccharidosen konnten ausgeschlossen werden. Röntgenbilder zeigten eine Verkürzung der Daumenendphalangen und eine vergrößerte Trabekelstruktur (Pfeiffer *et al.*, 1992).

#### **Patient D:**

Dieser aus der Schweiz stammende Patient ist das dritte Kind gesunder, nicht konsanguiner Eltern und wurde in der 34. Schwangerschaftswoche (SSW) mit einem Gewicht von 2280 g (50.–90. Pz) geboren. Zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung war der Patient 15 Jahre alt. Schon seit früher Kindheit lag ein Anfallsleiden, welches mit Ethosuccimid behandelt wurde, und eine Entwicklungsretardierung vor. Kranial zeigte sich eine schmale, hohe Stirn mit hohem Haaransatz, ein prominentes Mittelgesicht, Mikrognathie mit hohem Gaumen, Gingivahyperplasie, Zahnfehlstellungen und relativ hoch angesetzte Ohren. Die Hand und Mittelfingerlänge lag beidseitig an der 75. Perzentile, die Füße waren ohne Befund. Es stellte sich eine etwa seit dem 10. Lebensjahr bestehende Adipositas (81 kg, >97 PZ) dar.

#### **Patient E:**

Dieser aus Australien stammende Patient ist das erste Kind nicht konsanguiner, gesunder Eltern und wurde mit einem Gewicht von 4700 g (>97 Pz) und mit einem Kopfumfang von 39 cm (>90 Pz) geboren. Die Mutter war bei der Geburt 28 und der Vater 31 Jahre alt. Zwei ältere Geschwister sind klinisch unauffällig. Neonatal wurde ein grobes Gesicht, eine hervorstehende Zunge, Hypertrichose, trockene, dicke Haut, Hypotonie, eine Umbilikalhernie und Hepatosplenomegalie festgestellt. Zudem wurde ein persistierender Ductus Botalli operativ korrigiert. Radiologische, ophthalmologische, Knochenmark- und Blutuntersuchungen zeigten keine Auffälligkeiten. Im Alter von 8 Jahren wurde eine Myopie, eine schwach entwickelte Muskulatur und Hypotonie sowie gering entwickelte Zähne und Gingivafibromatose dokumentiert. Bei den histologischen Untersuchungen von Leber-, Haut- und Skelettmuskelgewebe auf Speichermaterial konnten keine Auffälligkeiten festgestellt werden. In der zweiten Lebensdekade wurde ein Perikarderguss diagnostiziert, der operativ durch eine Perikardfensterung versorgt werden musste. Postoperativ kam es zu einer permanenten Paralyse des Nervus phrenicus. Histologische Untersuchungen des Perikards sowie ein mikroskopischer Tuberkulose-Nachweis waren negativ. Echokardiologisch zeigte sich zur gleichen Zeit eine Dilatation des rechten Atriums und der Verdacht einer ventrikulären diastolischen Funktionsstörung. Dies zog eine progressive Dilatation des Aortenbogens nach sich. Im Verlauf der 3. und 4. Lebensdekade trat



eine für Linksherzinsuffizienzen typische Orthopnoe ein, die eine Digoxigenin-, Diuretika- und vasodilatative Therapie notwendig machte. Im Alter von 37 Jahren [Größe 167 cm (3.–10. Pz)], Gewicht 71 kg (50. Pz), Kopfumfang 60 cm (>90. Pz) stellte sich fazial ein grobes Gesicht mit dicken Augenbrauen, Synophrys, langen Ohrläppchen, einer großen, fleischigen Nase, Gingivafibromatose und vollen Lippen dar. Es lag ein hoher Gaumen, eine Myopie und normales Hörvermögen vor. Daumen und große Zehen waren klein. Radiologische Untersuchungen zeigten hypoplastische terminale Phalangen der Füße und Hände mit einer stärkeren Ausprägung der postaxialen Zehen sowie enge interphalangeale Gelenkspalten. Die phalangealen Gelenke waren überdehnbar. Computertomographische (CT) Aufnahmen des Thorax belegten eine Dilatation der Aorta, der Ventrikel und der Atrien. Mucopolysaccharid- und Oligosaccharid-Urinalysen waren unauffällig (Robertson *et al.*, 1998).

### **Patient F:**

Dieser aus der Tschechischen Republik stammende Patient ist das 3. Kind gesunder, nicht konsanguiner Eltern, die bei der Geburt beide 30 Jahre alt waren. Der Vater ist in einem Kernkraftwerk beschäftigt. Da eine Zwillingsschwangerschaft vorlag, wurde diese besonders sorgfältig überwacht. Die Entbindung war komplikationslos, das Geburtsgewicht betrug 4090 g und die Größe 50 cm. Der weibliche Zwilling (3090 g, 49 cm) ist gesund. Bei dem Neugeborenen fiel neben der Makrosomie die stark vermehrte Lanugobehaarung und die faltenartig verdickte Gaumenschleimhaut auf. Im Alter von 7 Monaten wurden die verkleinerten Finger- und Zehennägel bemerkt. Im Alter von 15 Monaten wies das Kind eine der Zwillingsschwester gegenüber leicht verzögerte psychomotorische Entwicklung auf. Die Körpermaße (11,7 kg, 80 cm) lagen an der 75., der Kopfumfang (52,5 cm) an der 50. Perzentile. Die Nasenspitze war verdickt und die weichen Ohrmuscheln vergrößert. An den Gliedmaßen, besonders am Rücken, aber auch im Gesicht, bestand eine Hypertrichose. Leber und Milz waren palpatorisch geringgradig vergrößert. Die Nägel der meisten Zehen und einiger Finger waren hypoplastisch. Es lag eine Gingivafibromatose vor, die Zähne waren im Röntgenbild erkennbar, jedoch noch nicht durchgebrochen. Das Gaumendach wies große Rugae auf. Histologisch wurde eine Fibromatose mit einer breiten Schicht von Kollagenfasern unter dem verdickten Epithel festgestellt. Röntgenuntersuchungen der Gliedmaßen ließen Anomalien der Endphalangen, der Finger und eine Aplasie aller Endphalangen der Füße erkennen. Laboruntersuchungen waren ohne Befund. Die Elektroenzephalographie (EEG) wurde als geringgradig abnorm beurteilt, enthielt jedoch keine Krampfpotentiale (Pfeiffer *et al.*, 1992).

### **Patient G:**

Dieser aus Belgien stammende Patient wurde als viertes Kind von gesunden, nicht konsanguinen Eltern mit einem Gewicht von 4500 g geboren (Karyotyp 46, XY, Fragiles-X-Syndrom negativ). Die Mutter war bei der Geburt 36 und der Vater 38 Jahre alt. Es sind keine Fälle von ZLS oder mentaler Retardierung zuvor in der Familie aufgetreten. Postnatal wurde eine Aplasie der Pollex- und Hallux-

Nägel festgestellt. Im Alter von 2 Jahren wurde eine mentale Retardierung erkannt. Ab dem 7. Lebensjahr wurde, indiziert durch Krampfanfälle, Phenobarbital und Diphantoin verordnet. Aufgrund von tonisch-klonischen Krämpfen im höheren Alter erfolgte dann jedoch eine Carbamazepin Medikation. Im Alter von 53 Jahren wurden bei einem operativen Eingriff Fibromatome des Oberkiefers entfernt. Der Patient war zum Zeitpunkt der klinischen Untersuchung 54 Jahre alt, Rollstuhlfahrer und wog 51 kg (3.–10. Pz), bei einer Körpergröße von 165 cm (3. Pz). Der Kopfumfang betrug 57 cm (50.–97. Pz). Kraniofazial wies der Patient ein grobes Gesicht mit schwachem Ausdruck, eine große, fleischige Nase und eine Hypoplasie der Zygomata und Maxilla auf. Zudem wurde eine Ptosis, Strabismus divergens, Retrognathie, ein flaches Philtrum, ein enger Gaumen, das Fehlen von Zähnen und Gingivahyperplasie dokumentiert. Es lag ein dünner Kopfhaarwuchs mit buschigen Augenbrauen, des Weiteren ein normales Behaarungsmuster und ein uneingeschränktes Hörvermögen vor. Der Patient zeigte Kontrakturen des Beckens und des rechten Knies. Die phalangealen Gelenke waren überdehnbar. Die psychomotorischen Fähigkeiten wurden mittels der „Vineland Adaptive Behavior Scale“ als stark retardiert eingestuft. Radiologische Untersuchungen zeigten hypoplastische distale Phalangen des 2. und 5. Fingers sowie aller Zehen.

#### **Patient H:**

Dieser aus Frankreich stammende Patient (Karyotyp 46,XY) ist das älteste Kind nicht konsanguiner, gesunder Eltern mit unauffälliger Familienanamnese und wurde nach einer komplikationslosen Schwangerschaft in der 38. SSW mit einem Gewicht von 3540 g und einer Größe von 49 cm geboren. Postnatal wurde eine Makroglossie, eine breite flache Nase mit einer medianen senkrechten Rille, eine Synophrys, ein abundanter Haarwuchs, eine Hypertrichose (insbesondere an den Extremitäten und in der Sakrolumbalgegend) sowie eine Anonychie aller Finger und Zehen festgestellt. Zudem stellte sich eine Agenesie des 3. Gliedes des 2. und 5. Fingers der linken, des 5. Fingers der rechten Hand und der vier letzten Zehen beider Füße dar. Die Füße wiesen einen Hallux valgus und eine breite Sandalenspalte auf. Im Verlauf der psychomotorischen Entwicklung wurde eine axiale und periphere Hypotonie festgestellt. Der Patient konnte mit 1 1/2 Jahren sitzen und mit 3 Jahren und 4 Monaten gehen. Zu diesem Zeitpunkt wurde eine Gingivahyperplasie diagnostiziert. Ab dem 8. Lebensjahr wurde eine beginnende Adipositas registriert. Mit 11 Jahren wurden 10 kg Übergewicht (90.–95. Pz) dokumentiert. Des Weiteren wurde in diesem Alter ein langer Phallus und ein Knochenalter von 9 Jahren festgestellt. Die abdomino-pelvine Sonographie und Kardioechographie waren ohne Befund. Schilddrüsenhormone, luteinisierendes Hormon (LH), Follikelstimulierendes Hormon (FSH), adrenale Androgene- und Testosteron-Laborwerte waren unauffällig. Der IGF-1 (*insulin-like growth factor 1*)-Wert war normal.

**Patientin I:**

Diese aus Frankreich stammende Patientin (Karyotyp 46,XX) wurde als zweites Kind gesunder Eltern geboren. Die Mutter war zum Zeitpunkt der Geburt 30 und der Vater 32 Jahre alt. Neonatal zeigten sich faziale Dysmorphien, die durch ein grobes Gesicht mit vollen Wangen gekennzeichnet waren. Darüber hinaus wurden kurze, breite Hände, ein intraventrikulärer Septumdefekt, der operativ behoben wurde, und eine Hepatosplenomegalie festgestellt. Die ersten Schritte wurden im Alter von 15 Monaten ausgeführt, es zeigten sich keine psychomotorischen Einschränkungen. Der Vater wies Herzgeräusche und, den fazialen Phänotyp betreffend, starke Ähnlichkeit mit der Patientin auf. Laboruntersuchungen bei der Patientin ergaben keine Auffälligkeiten.

**Patientin J:**

Diese aus Australien stammende Patientin ist die erste Tochter (Karyotyp 46,XX) nicht konsanguiner, gesunder Eltern und wurde mit einem Gewicht von 2880 g geboren. Neonatal zeigten sich Krampfanfälle. Es stellten sich postnatal aplastische Zehennägel, stark dysplastische Fingernägel, hypoplastische terminale Phalangen, Gingivahyperplasie, milder Hirsutismus, Mikrozephalie, intestinale Malrotation, bilateraler urethraler Reflux 3. Grades und eine bilaterale Katarakt dar. Im Alter von 4 1/2 Jahren wurden eine starke Entwicklungsverzögerung und Krampfanfälle diagnostiziert. Das Hörvermögen war nicht eingeschränkt. Urinuntersuchungen auf Stoffwechselerkrankungen und Magnet-Resonanz-Imaging (MRI)-Aufnahmen waren unauffällig.

**Patientin K:**

Diese aus Australien stammende Patientin (Karyotyp 46,XX) wurde als erste Tochter gesunder, nicht konsanguiner Eltern, nach einer komplikationslosen Schwangerschaft, mit einem Gewicht von 3290 g geboren. Die beiden jüngeren Geschwister, ein Junge und ein Mädchen, sind gesund. Postnatal zeigte sich eine Hypotonie und Fütterungsschwierigkeiten sowie im weiteren Verlauf eine starke Entwicklungsverzögerung und vereinzelte Krampfanfälle. Fazial stellte sich neben einer Mikrozephalie eine Makroglossie und Gingivafibromatose dar. Die terminalen Phalangen sind hypoplastisch und die Nägel der Finger und Zehen aplastisch. Das Kind ist klein (<3. Pz). Hirsutismus wurde nicht festgestellt. Das Hörvermögen und die Sehfähigkeit waren uneingeschränkt, die Gehfähigkeit konnte jedoch nicht erlangt werden. Zudem stellte sich eine thorakale Skoliose dar. Die Nierenfunktion war uneingeschränkt.

**Patient L:**

Dieser ebenfalls aus Australien stammende Patient (Karyotyp 46,XY) wurde als zweites Kind gesunder, nicht konsanguiner Eltern in der 39. SSW am 18.08.1987 mit einem Gewicht von 3700 g geboren. Im Verlauf der Entwicklung zeigte sich eine starke mentale Retardierung, die durch das Fehlen der Sprache und einer nicht möglichen Hygiene-Erziehung charakterisiert war. Es stellten sich früh Krampfanfälle, die mit Antikonvulsiva, jedoch nicht Phenytoin, behandelt wurden, und ein

starker gastroösophagealer Reflux dar. Bei einer klinischen Untersuchung im Alter von ca. 7 Jahren wies der Patient ein Gewicht von 39 kg, eine Größe von 157 cm (beides > 3. Pz) und einen Kopfumfang von 55 cm (50. Pz) auf. Es zeigte sich eine Hypotonie, hyperextensible Gelenke, jedoch keine Hepatosplenomegalie. Fazial wurde ein grobes Gesicht mit vollen Wangen, prominentem Nasenbein und Nasenspitze sowie antevvertierten, verdickten Ohren dokumentiert. Der Patient wies einen hohen Gaumen und Gingivafibromatose sowie in der linken Hand, wie seine Mutter, nur eine Handfurche auf. Die rechte Hand zeigte eine Aplasie der Nägel des 1., 2., 3. und 4. Fingers und einen hypoplastischen, dystrophen Nagel am 5. Finger. An der linken Hand zeigten sich eine Aplasie der Nägel des 1. und 5. Fingers sowie hypoplastische, dystrophe Nägel des 3. und 4. Fingers. Die 1., 2. und 3. Zehen wiesen eine Aplasie der Nägel, die 4. und 5. Zehen hypoplastische, sehr kleine dystrophe Nägel auf.

### **Patientin M:**

Die aus Deutschland stammende Patientin (Karyotyp 46,XX) wurde als zweites Kind von nicht konsanguinen, gesunden Eltern in der 36. SSW durch eine Sectio caesarea geboren. Die Mutter war bei der Geburt 30 und der Vater 34 Jahre alt. Die Familienanamnese beider Eltern war unauffällig. Bereits pränatal waren Hydramnion, fetaler Aszites und Makrosomie in der 29. SSW aufgefallen. Das Kind wurde wegen respiratorischer Insuffizienz unmittelbar postnatal intubiert und intensivmedizinisch betreut. Es zeigten sich faziale Dysmorphien wie eine eingesunkene Nasenwurzel, volle Wangen, dysplastische Ohrmuscheln mit Läppchenkerbe, ein tiefer Haaransatz bis in die Stirn und eine starke Hypertrichose an Rücken und Extremitäten. Zudem lagen ein hoher Gaumen mit polsterartig verdickten Rugae und am Oberkiefer median 2 mm große Gingiva-Anhängsel vor. Hände und Füße waren im Vergleich zum restlichen Körper klein und schmal. Die Endphalangen beider Hände waren dysplastisch. Die Nägel waren hypoplastisch. Es wurden leichte generalisierte Hautödeme und ein pralles Abdomen mit Ballottement durch Aszites mit einer ausgeprägten Hepatomegalie festgestellt. In der 2. Lebenswoche wurde ein persistierender Ductus Botalli erkannt und chirurgisch ligiert. Röntgenuntersuchungen ergaben keine Thorax- und abdominalen Skelettauffälligkeiten. Im Zuge einer Ösophagogastrroduodenoskopie wurde ein enorm dilatierter Magen mit einem fast verschlossenen Pylorus erkannt und eine Ballondilatation durchgeführt. Die Sonographie des zentralen Nervensystems ergab erweiterte äußere Liquorräume, schlanke Ventrikel, nicht kalzifizierende Vaskulopathien der Basalganglien und eine Kleinhirnhypoplasie. Histo- und zytologische Untersuchungen der Leber, des Knochenmarks und der Haut sowie ultrastrukturelle Untersuchungen der Haut ergaben keine pathologischen Veränderungen. Ophthalmologisch zeigte sich kein Befund. Ab der 4. Lebenswoche war aufgrund von supraventrikulären Tachykardien eine dauerhafte Digoxigenin- und Propranolol-Therapie erforderlich. Die durch eine Pylorusstenose bedingte Magenentleerungsstörung konnte durch eine wiederholte Ballondilatation nicht behoben werden. Es kam zu einer Magenperforation mit nachfolgender operativer Übernähung mit Pyloroplastik, die jedoch die gastroduodenale Passage nicht signifikant verbessern konnte. Nach einer

zunehmenden Verschlechterung des Zustandes, bedingt durch Totalatektase, Aszites, Pleuraergüsse, Trombosen, Chylothorax rechts, einer progredienten Hirnatrophie und pulmonalen Infektionen verstarb die Patientin, nach zuletzt auf Wunsch der Eltern nur noch supportiven Maßnahmen, mit ~4 Monaten. Labordiagnostisch konnten im gesamten Behandlungszeitraum eine relative Lymphopenie, stoffwechselfeldiagnostisch jedoch keine Auffälligkeiten der Mukopolysaccharide, Oligosaccharide oder freien Neuraminsäure dokumentiert werden. Aktivitäten der lysosomalen Enzyme ( $\beta$ -Galaktosidase, Cerebrosid- $\beta$ -Glucosidase,  $\beta$ -Glucuronidase,  $\alpha$ -Fucosidase,  $\alpha$ -Mannosidase und Hexosaminidase A und B) sowie das Aminosäureprofil im Serum waren unauffällig.

### **Patientin N:**

Diese Patientin ist die Jüngste von vier Geschwistern und wurde mit einem Gewicht von 4640 g und einer Größe von 53 cm nach einer ohne Komplikationen verlaufenden Geburt in der 41. SSW geboren. Die Eltern sind Cousin und Cousine I<sup>o</sup>. Ein Hypothyroidismus wurde postnatal diagnostiziert und ab dem 5. Lebenstag behandelt. Ultraschalluntersuchungen der Nieren zeigten eine Dilatation beider Nierenbecken und Ureter als Folge distaler urethraler Stenosen, welche operativ korrigiert wurden. Die Nierenfunktion war nicht eingeschränkt. Zum annähernd gleichen Entwicklungszeitpunkt wie bei ihrer ebenfalls betroffenen zweitältesten Schwester traten im 2. Lebensjahr generalisierte tonisch-klonische Krampfanfälle auf, die erfolgreich mit Phenobarbital behandelt wurden. Beide Geschwister zeigten eine psychomotorische und mentale Entwicklungsverzögerung. Im Alter von 23 Monaten konnten beide eigenständig gehen. Die Sprachentwicklung war stark beeinträchtigt. Die Ältere der beiden Geschwister konnte mit 11 Jahren einzelne Worte sprechen, die in dieser Arbeit untersuchte Patientin entwickelte keine Sprachfähigkeit. Fazial zeigten beide eine große knollige, weiche Nase, fleischige Ohren mit einer abnormalen Konfiguration, Makroglossie, eine leichte Synophrys, Gingivahypertrophie, generalisierten Hirsutismus und eine Dolichocephalie (Kopfumfang 49,5 cm, 10. Pz). Des Weiteren wurden hyperextensible Gelenke festgestellt. Radiologische Untersuchungen belegten bei beiden Geschwistern eine bilaterale Brachymetakarpi (Brachdaktylie Typ E) der 3.–5. Phalangen sowie eine leichte Hypoplasie der Nägel. Es wurde ein weiter Abstand zwischen der 1. und 2. Zehe bemerkt. Der Thorax und die langen Skelettknochen waren radiologisch unauffällig. Ansonsten wurden keine intestinalen oder neurologischen Auffälligkeiten festgestellt. Das Körpergewicht lag zwischen der 50. und 75. Perzentile (Gohlich-Ratmann *et al.*, 2000).

### **Patientin O:**

Diese ukrainische Patientin wies im Alter von 24 Jahren eine Größe von 170 cm und ein Gewicht von 65,5 kg auf. Sie zeigt am ganzen Körper eine starke Hypertrichose und fazial einen deutlichen Epikanthus, Ptosis, eine große Nase mit antevierten Nares, dicke Lippen und eine mandibuläre Prognathie. Es lag eine milde Myopie vor. Gingivahypertrophie, Skelettanomalien, Hepatosplenomegalie, Herzabnormalitäten oder Einschränkungen des Hörvermögens wurden nicht

festgestellt. Am Gesäß stellten sich lipoatrophe Areale dar. Die Patientin berichtete, dass sie keine Ohrringe tragen könnte, da Ohrlöcher sehr schnell, einhergehend mit einer lokalen Schwellung, zuwachsen würden.

#### **Patientin P:**

Diese aus Mexiko stammende Patientin (Karyotyp 46,XX) ist die erste Tochter nicht konsanguiner Eltern. Schwangerschaft und Geburt verliefen komplikationslos. Sie hat zwei jüngere Geschwister, von denen eine, wie die Patientin, Somnambulismus zeigte. Die Eltern sind gesund. Die Patientin wies von Geburt an eine generalisierte Hypertrichose, ausgenommen der Handinnenflächen, Fußsohlen und Nägel, auf. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die Patientin 11 Jahre alt, besuchte die 6. Klasse, zeigte eine normale Intelligenz und Stimmlage. Aus ästhetischen Gründen vollzog sie täglich eine Rasur des ganzen Körpers, wog 55,5 kg bei einer Größe von 140 cm und einem Kopfumfang von 57 cm. Diese Werte entsprachen der 90., 25. und 97. Perzentile mexikanischer Mädchen (Ramos-Galvan, 1975). Bei der körperlichen Untersuchung wurde ein Makrokranium, eine grobes Gesicht, eine breite Stirn, ein Epikanthus, geschwollene obere Augenlider, Strabismus, dicke und starke Wimpern und Augenbrauen sowie eine große Nase festgestellt. Die Lippen waren voll und eine deutliche Gingivahypertrophie war vorhanden. Maxilla und Mandibula zeigten frontal eine quadratische Form. Des Weiteren wies die Patientin eine Mikrognathie, schräge Ohren, einen kurzen und breiten Nacken, bilateral Cubitus valgus, breite Hände und Füße mit einer Hyperextensibilität der Finger auf. Radiologische Auswertungen belegten prominente Maxilla und Mandibula sowie breite Metakarpie. Die Cephalometrie ergab Okklusionen der Klasse I mit gemischter Bezahnung und das Fehlen der 3. Molaren. Ein Elektrocephalogramm belegte epileptiforme Entladungen im Bereich der rechten Temporal-Region. Radiologische Untersuchungen des Thorax ergaben keine Auffälligkeiten (Canun *et al.*, 2003).

#### **Patientin Q:**

Diese aus Brasilien stammende Patientin (Karyotyp 46,XX), wurde nach einer komplikationslos verlaufenden Schwangerschaft mit einem Gewicht von 2740 g und einer Größe von 45 cm geboren. Die Mutter, portugiesischer Abstammung, war zum Zeitpunkt der Geburt 36 und der Vater, italienischer Abstammung, 28 Jahre alt. Die Eltern sind nicht konsanguin und weisen eine unauffällige Familiengeschichte auf. Ein älterer Bruder der Patientin ist gesund. Mit 4 Monaten wurde Hypotonie, eine moderate psychomotorische Entwicklungsverzögerung und eine Wachstumsdefizienz festgestellt. Im Alter von 8 Jahren zeigten sich Dolichocephalie, Telekanthus, milde Synophrys, enge und nach unten weisende palpebrale Fissuren, eine tiefliegende Nasenwurzel, ein langes Philtrum und eine leichte Klinodaktylie der 5. Finger. Die initiale Hypertrichose hatte sich mit fortschreitendem Alter verstärkt und war nun besonders evident an den Extremitäten und dorsal. Die Größe lag 3 cm unterhalb der 3. Perzentile. Untersuchungen auf eine mögliche Toxoplasmose-, Röteln-, Cytomegalie- oder Herpes-simplex (TORCH)-Infektion sowie auf metabolische Erkrankungen, für die abnormale

Thyroid-Hormon-, muskuläre Enzym-, LH-, FSH-, Testosteron-, 17-OH-Progesteron- und Estradiol-Werte Hinweise gegeben hätten, waren negativ. Radiologische Aufnahmen belegten normale Skelettknochen und ein entsprechendes Knochenalter. CT, EEG und Ultraschallaufnahmen des Herzens, Abdomens und Beckens zeigten keine Auffälligkeiten (Steiner & Marques, 2000).

### **Patientin R:**

Diese aus Großbritannien stammende Patientin (Karyotyp 46,XX) ist die erste Tochter von nicht konsanguinen Eltern und wog nach der Geburt 3100 g. Sie hat eine paternale Stiefschwester und maternal eine Stiefschwester sowie einen Stiefbruder, die klinisch unauffällig sind. Die Mutter war zum Zeitpunkt der Geburt 29 und der Vater 36 Jahre alt. Die Schwangerschaft verlief komplikationslos. Der Vater berichtete von sehr starkem, die Mutter nur gelegentlichem Alkoholkonsum. Bereits postnatal traten Fütterungsschwierigkeiten und häufiges Erbrechen des Kindes mit dem Verdacht einer Pylorusstenose auf. Mit 10 Monaten stellten sich diese Auffälligkeiten ohne Behandlung ein. Mit 16 Monaten konnte die Patientin erste Schritte gehen und mit 2 Jahren die ersten Worte sprechen. Aufgrund eines verminderten Hörvermögens wurden, zur Entlastung des Innenohrdrucks, im Alter von 2 Jahren Paukenröhrchen eingesetzt. Mit 5 Jahren konnte sie Sätze mit 3–5 Worten formulieren. Bei der Untersuchung wurde feines, wolliges Haar, mit tiefem anterior und posterior gelegenen Haaransatz, prominente Augenbrauen und Augenlider, eine schmale Stirn, schräg nach unten gerichtete Augenöffnungen (palpebrale Fissuren), antevertierte Nares, ein glattes Philtrum, ein ständig geöffneter Mund mit großer Unter- und schmaler Oberlippe, ein hoher Gaumen, spitze Eckzähne und prominente Ohren mit kleinen Ohrläppchen festgestellt. Sie zeigte zudem weit auseinander liegende Papilla mammaria, ein tief liegendes Sternum, einen prominenten Nabel, Polster an den Fingerspitzen („fetal pads“), hyperkonvexe Fingernägel, hyperextensible interphalangeale Gelenke, lange und große Zehen mit einem hypoplastischen 5. Zehennagel, Pes planus, muskulöse Beine und generalisierten Hirsutismus.

Untersuchungen des kardiovaskulären Systems sowie zentralen Nervensystems zeigten keine Auffälligkeiten. Ihre Größe lag im Bereich der 50. und der Kopfumfang an der 25. Perzentile. Bis zum 7. Lebensjahr wurden keine sprachlichen Verbesserungen festgestellt, und sie besuchte eine Schule für entwicklungsverzögerte Kinder. Nachts trug sie Windeln und zeigte ansonsten ein rebellisches, nicht altersgemäßes, verletzliches Verhalten. Mit 10 Jahren konnte sie einige Worte lesen. Das Weinen war tränenlos, Schwitzen jedoch normal. Aminosäure-, organische Säure-, Mukopolysaccharide-, Biotinidase- und Serum-Laktat-Laborwerte waren unauffällig. Molekulargenetische Untersuchungen konnten ein Fragiles-X-Syndrom ausschließen (Stewart *et al.*, 2000).

### **Patient S:**

Dieser aus Großbritannien stammende Patient (Karyotyp 46,XY) ist der um ein Jahr jüngere Bruder von Patientin R. Er wog bei der Geburt 3120 g. Postnatal war eine 2-wöchige Ernährung durch eine Magensonde notwendig und mit 6 Wochen wurde eine Inguinalhernie operativ behoben. Im Verlauf

der Entwicklung zeigte er fazial eine auffallende Ähnlichkeit mit seiner Schwester, die sich in prominenten Augenbrauen und Augenlidern, einem glatten Philtrum, einer schmalen Oberlippe und prominenten Ohren widerspiegelte. Er zeigte kleine, hyperkonvexe Nägel, eine starke bilaterale Hypoplasie der Zeigefingernägel und eine, insbesondere am Rücken ausgeprägte Hypertrichose. In der Entwicklung war er langsamer als seine Schwester und konnte mit 15–18 Monaten gehen, jedoch erst mit 9 Jahren erste Worte sprechen. Sein Verhalten war problematischer als das seiner Schwester und durch ständige Trotzreaktionen und Hyperaktivität gekennzeichnet. Das Wachstum war mit einem Körpergewicht an der 75. und dem Kopfumfang an der 50. Perzentile normal. Das Weinen war tränenlos, Schwitzen jedoch normal. Aminosäure-, organische Säure- und Mukopolysaccharide-Laborwerte waren unauffällig. Molekulargenetische Untersuchungen konnten ein Fragiles-X-Syndrom ausschließen (Stewart *et al.*, 2000).

### **Patient T:**

Dieser aus Großbritannien stammende Patient zeigte bereits postnatal eine ausgeprägte Gingivahyperplasie sowie löffelartig geformte Finger und Zehen mit tief sitzenden Nägeln. In der Frontalregion waren die Haare spärlich, es lag jedoch sehr kräftiger Augenbrauenwuchs sowie eine milde Hypertrichose, insbesondere an den dorsalen Seiten der Arme, vor. Es wurde eine Dilatation der Blase, ohne Veränderungen oder Auffälligkeiten der oberen Harnwege festgestellt. Es zeigte sich eine schwere mentale Retardierung.

### **Patient U:**

Dieser aus Kroatien stammende Patient wies im Alter von 7 Monaten ein Gewicht von 10,1 kg (95. Pz), eine Größe von 72,5 cm (90.–95. Pz) und einen Kopfumfang von 49,5 cm (>95. Pz) auf. Die statomotorische und psychische Entwicklung war normal. Es zeigte sich eine generalisierte Hypertrichose, besonders an der Stirn, den Extremitäten, dem Rücken und der Sakrolumbalgegend. Es stellten sich zudem eine Makrozephalie und fazial eine Synophrys, eine prominente Stirn, eine tief gelegene Nasenwurzel, ein bilateraler Epikanthus, große, antevierte Nares und dicke Lippen dar. Gingivahypertrophie war nicht erkennbar. Große Feuermale bedeckten die Stirn, die oberen Augenlider, die Nase und die Oberlippe. Der Nacken war kurz und gedrungen. Die Phalangen der Hände und Füße waren dick und verkürzt. Die Nägel zeigten keine Auffälligkeiten.



Patient klinische Merkmale	<b>t(3;8)</b> <sup>1 #</sup> (f)	<b>A</b> <sup>2 #</sup> (f)	<b>B</b> <sup>3 #</sup> (f)	<b>C</b> <sup>4 #</sup> (m)	<b>D</b> (m)	<b>E</b> <sup>5 #</sup> (m)	<b>F</b> <sup>6 #</sup> (m)	<b>G</b> <sup>#</sup> (m)
<b>Skelett- fehlbildungen der Hände und Füße</b>	aplastische terminale Phalangen	hypoplastische terminale Phalangen der 1. Finger und 2. Zehen	dysplastische terminale Phalangen der 5. Finger	dysplastische terminale Phalangen der 1. Finger, zugespitzte Finger	leichte Brachymetakarpi	hypoplastische terminale Phalangen der Hände und Füße	aplastische terminale Phalangen der Füße und Anomalien der Hände	hypoplastische terminale Phalangen der 2. und 3. Finger sowie aller Zehen
<b>Fehlbildungen der Nägel</b>	aplastische Nägel	hypoplastische Nägel der 1. Finger und 2. Zehen	dystrophe Nägel der Finger, die 2. Finger ausgenommen	hypoplastische Nägel der 1. Finger	-	hypoplastische und dystrophe Nägel der Hände und Füße	einige Nägel sind hypoplastisch	aplastische Nägel der 1. Finger und 1. Zehen
<b>Fazies</b>	grobes Gesicht, prominente Lippen, prominente knollige, weiche Nase und Ohren	prominente knollige, weiche Nase und Ohren, Makroglossie	knollige, weiche Nase	grobes Gesicht, prominente Lippen	prominentes Mittelgesicht, Mikrognathie	grobes Gesicht, prominente Lippen, Makroglossie	prominente Nase und Ohren	grobes Gesicht, knollige, weiche Nase, Ptosis, Strabismus
<b>Gingiva- fibromatose</b>	+	+	+	+	+	+	+	+
<b>Hypertrichose</b>	ND	+	-	+	ND	+	+	-
<b>hyperextensible Gelenke</b>	ND	Hände und Füße	-	ND	ND	Finger	ND	Finger
<b>Hepatospleno- megalie</b>	ND	+	-	Hepatomegalie	ND	+	+	ND
<b>mentale Retardierung</b>	+	+	-	+	+	+	+	+
<b>andere</b>	reziproke 3;8-Translokation	Hypertonie, Dysbalance im Umfang der unteren Extremitäten	tapetoretinale Degeneration, Fibroadenome der Brust, Fibromyalgie, intestinale Beschwerden	Krampfanfälle, Hypospadie I°, Hyposomie	Zahnfehlstellungen, hoher Gaumen, hoch angesetzte Ohren, Adipositas	Herzfehler, progressive Dilatation der Aorta	weiblicher dizygoter Zwilling gesund, prominente Rugae palatinae,	Krampfanfälle, maxillare Fibrome, Retrognathie

**Tab. 4: Übersicht der Merkmalausprägungen von Patienten mit ZLS bzw. mit zum ZLS phänotypischen Überschneidungen**

<sup>#</sup> Klinische Merkmale stimmen mit dem ZLS überein; <sup>1</sup> Stefanova *et al.* 2003, <sup>2</sup> de Pina Neto *et al.* 1988, <sup>3</sup> Koch *et al.* 1992, <sup>4</sup> Pfeiffer *et al.* 1992 (Patient 1), <sup>5</sup> Robertson *et al.* 1998, <sup>6</sup> Pfeiffer *et al.* 1992 (Patient 2). (f): weiblich; (m): männlich; ND: nicht dokumentiert; -: Merkmal nicht vorhanden; \*: möglicherweise durch Antikonvulsiva hervorgerufen.

Patient klinische Merkmale	<b>H</b> <sup>#</sup> (m)	<b>I</b> (f)	<b>J</b> (f)	<b>K</b> <sup>#</sup> (f)	<b>L</b> (m)	<b>M</b> <sup>#</sup> (f)	<b>N</b> <sup>7</sup> (f)	<b>O</b> (f)
<b>Skelett- fehlbildungen der Hände und Füße</b>	aplastische Phalangen des 2. und 5. linken, und 5. rechten Fingers sowie aller Zehen außer dem 1.	kurze breite Hände	hypoplastische terminale Phalangen	hypoplastische terminale Phalangen	-	dysplastische terminale Phalangen	Brachymetakarpie	-
<b>Fehlbildungen der Nägel</b>	aplastische Nägel	ND	aplastische Nägel der Zehen, dysplastische Nägel der Finger	aplastische Nägel	aplastische und hypoplastische Nägel	hypoplastische Nägel	Hypoplasie der 3.-5. Finger und Zehen	-
<b>Fazies</b>	Knollige, weiche Nase mit medianer, senkrechter Rille, Synophrys, Makroglossie	grobes Gesicht, volle Wangen	Mikrozephalie	Makroglossie	grobes Gesicht, prominente Nase, antevertierte Ohren	tiefliegende Nasenswurzel, volle Wangen, dysplastische Ohren, tiefer Haaransatz	grobes Gesicht, knollige, weiche Nase, Ptosis, Strabismus, Makroglossie	prominente Lippen und Nase, mandibuläre Prognathie
<b>Gingiva- fibromatose</b>	+	ND	+	+	+*	+	+*	-
<b>Hypertrichose</b>	+	ND	+	-	ND	+	+	+
<b>hyperextensible Gelenke</b>	ND	ND	ND	ND	+	ND	+	ND
<b>Hepatospleno- megalie</b>	ND	+	ND	ND	-	Hepatomegalie	ND	-
<b>mentale Retardierung</b>	+	-	+	+	+	(+)	+	-
<b>andere</b>	axiale and periphere Hypotonie, Valgus der Füße	intraventrikulärer Septumdefekt	Krampfanfälle, intestinale Malrotation, Urinreflux, Katarakt	Krampfanfälle, Mikrozephalie, thorakale Skoliose, Minderwuchs	Krampfanfälle, Hypotonie, gastro- ösophagealer Reflux, Hyposomie	Kleinhirnhypo- plasie, Makrosomie, persistierender Ductus Botalli, Pylorusstenose	Krampfanfälle, Hypothyroidismus, urethrale Stenose	Epikanthus-Falten, lipoathrophie in der Regio glutealis, Myopie

**Tab.5: Übersicht der Merkmalausprägungen von Patienten mit ZLS bzw. mit zum ZLS phänotypischen Überschneidungen**

<sup>#</sup> Klinische Merkmale stimmen mit dem ZLS überein; <sup>7</sup> Göhlich-Ratmann *et al.* 2000; (f): weiblich; (m): männlich; ND: nicht dokumentiert; -: Merkmal nicht vorhanden; \*: möglicherweise durch Antikonvulsiva hervorgerufen.

Patient klinische Merkmale	<b>P</b> <sup>8</sup> (f)	<b>Q</b> (f)	<b>R</b> <sup>9</sup> (f)	<b>S</b> <sup>9</sup> (m)	<b>T</b> (m)	<b>U</b> (m)
<b>Skelett- fehlbildungen der Hände und Füße</b>	-	Klinodaktylie der 5. Finger	ND	ND	ND	hypoplastische Phalangen
<b>Fehlbildungen der Nägel</b>	-	-	hyperkonvexe Fingernägel, hypoplastischer 5. Zehnnagel	Hypoplasie der 2. Finger	tiefsitzend	ND
<b>Fazies</b>	grobes Gesicht, prominente Nase und Lippen, Mikrognathie	Dolichocephalie, Telekanthus, milder Synophrys, tiefliegende Nasenspitze	prominente Ohren	prominente Ohren	abundante Augenbrauen	Synophrys, prominente Stirn, tiefliegende Nasenspitze, volle Lippen, Naevus flammeus
<b>Gingiva- fibromatose</b>	+	ND	ND	ND	+	-
<b>Hypertrichose</b>	+	+	+	+	+	+
<b>hyperextensible Gelenke</b>	Finger	ND	Finger	ND	ND	ND
<b>Hepatospleno- megalie</b>	-	-	ND	ND	ND	ND
<b>mentale Retardierung</b>	-	+	+	+	+	ND
<b>andere</b>	Makrokranium, Somnambulismus, Epikanthus-Falten, Strabismus, Cubitus valgus	Hyposomie, Hypotonie	postnatal Fütterungs- schwierigkeiten, prominente Augenbrauen und Augenlider, vermindertes Hörvermögen, tiefer Haaransatz, tränenloses Weinen	postnatal Fütterungs- schwierigkeiten, Inguinalhernie, prominente Augenbrauen und Augenlider, Hyperaktivität, tränenloses Weinen	löffelartig geformte Finger und Zehen, Dilatation der Blase	Makrocephalie, Naevus flammeus

**Tab. 6: Übersicht der Merkmalausprägungen von Patienten mit ZLS bzw. mit zum ZLS phänotypischen Überschneidungen**

<sup>8</sup> Canun *et al.* 2003; <sup>9</sup> Steward *et al.* 2000. (f): weiblich; (m): männlich; ND: nicht dokumentiert; -: Merkmal nicht vorhanden.

## 1.2 Materialien für molekularbiologische Methoden

Chemikalien, Enzyme und Kits wurden, wenn nicht anders angegeben, von den Firmen Applied Biosystems (Weiterstadt), Amersham Biosciences (Freiburg), BD Biosciences (Heidelberg), Epicenter (Madison, WI, USA), Fermentas (St. Leon-Rot), Genomed (Löhne), Invitrogen/Gibco (Karlsruhe), Merck (Darmstadt), New England Biolabs (Frankfurt a.M.) Promega (Mannheim), Qiagen (Hilden), Roth (Karlsruhe), Sigma-Aldrich (Taufkirchen), Stratagene (Amsterdam, Niederlande) und Vysis Inc. (Downers Grove, IL, USA) bezogen.

Agarose (Ultra Pure Agarose)	Invitrogen (Karlsruhe)
CGH Nick Translation Kit	Vysis, Inc. (Downers Grove, IL, USA)
Humane Cot-1 DNA	Invitrogen (Karlsruhe)
Lachssperma-DNA Typ III	(Sigma, Taufkirchen)
FlexiGene Kit	Qiagen (Hilden)
QIAshredder	Qiagen (Hilden)
RNeasy <sup>®</sup> Kit	Qiagen (Hilden)
PAXgene <sup>™</sup> Blood RNA Kit	Qiagen (Hilden)
RNaseOUT <sup>™</sup>	Invitrogen (Karlsruhe)
RNase Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
Plasmid Midi Kit	Qiagen (Hilden)
TOPO TA Cloning <sup>®</sup> Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
JetQuick PCR Product Purification Spin Kit	Genomed (Löhne)
BigDye <sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
GenomiPhi <sup>™</sup> DNA Amplification Kit	Amersham Biosciences (Freiburg)
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)
	Qiagen (Hilden)
Herculase <sup>®</sup> Enhanced DNA Polymerase	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
SYBR <sup>®</sup> Green Jump Start <sup>™</sup> Taq ReadyMix <sup>™</sup>	Sigma (Taufkirchen)
SuperScript <sup>™</sup> III Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)
Omniscript <sup>®</sup> Reverse Transkriptase	Qiagen (Hilden)
Random Primers (Hexamere)	Invitrogen (Karlsruhe)
Advantage <sup>®</sup> cDNA-Polymerase Mix	BD Biosciences (Heidelberg)
Fail Safe <sup>™</sup> PCR PreMix Selection Kit	Epicenter (Madison, WI, USA)
DNA-Standard (1000, 100 und 50 Bp-Leiter)	Invitrogen (Karlsruhe)
DNA-Standard „Fast Ruler <sup>™</sup> “ („Low Range“ Leiter)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Restriktionsendonukleasen	Promega (Mannheim)
	und NEB (Frankfurt am Main)

## 1.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid 30% (mit 0,8% Bisacrylamid)	Roth (Karlsruhe)
Ammoniumacetat	Merck (Darmstadt)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Dextransulfat	Pharmacia, Heidelberg
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethylendinitrietetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Essigsäure 100%	Merck (Darmstadt)
Ethanol	Merck (Darmstadt)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Fixogum	Marabuwerke (Tamm)
Formaldehyd 37%	Merck (Darmstadt)
Formamid	Merck (Darmstadt)
Glycerin wasserfrei	Roth (Karlsruhe)

Isopropyl- $\beta$ -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumchlorid	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Temed)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
N,N'-Methylen-bis-acrylamid	Biorad (München)
Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Salpetersäure 67%	Merck (Darmstadt)
Salzsäure	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck (Darmstadt)
Tris-(Hydroxymethyl)-aminomethan (Tris)	Merck (Darmstadt)
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Merck (Darmstadt)
Wasser für Chromatographie (HPLC)	Merck (Darmstadt)
Xylencyanol FF	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
5-bromo-4-chloro-3-indoxyl-beta-D-galactopyranoside (X-Gal)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
4',6-Diamidino-2-phenylindol (DAPI)	Serva (Heidelberg)

## 1.4 Puffer und Lösungen

### 1.4.1 PCR-Puffer

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

### 1.4.2 Medium für die chemische Transformation von *E.coli*

SOC-Medium	0,5%	Hefeextrakt
	2%	Tryptone,
	10 mM	0,5 g NaCl; ad 970 ml H <sub>2</sub> O, pH 7 einstellen
	2,5 mM	KCl
	10 mM	MgCl <sub>2</sub>
	20 mM	MgSO <sub>4</sub>
	20 mM	Glukose

### 1.4.3 Puffer und Lösungen für die Agarosegel-Elektrophorese

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

### 1.4.4 Lösungen für die SSCP-Analyse

Ladepuffer	10 mM EDTA 0,025% (w/v) Bromphenolblau 0,025% (w/v) Xylencyanol FF 98% (v/v) Formamid
Entwicklungslösung (Reduktionslösung)	29,6 g Natriumcarbonat 540 µl Formaldehydlösung (36,5%) ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O
Silbernitratlösung	2,02 g Silbernitrat ad 1000 ml ddH <sub>2</sub> O

### 1.4.5 Puffer und Lösungen für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Denaturierungslösung	70% Formamid in 2x SSC pH 7,0
Detektionspuffer	2 x SSC 1% BSA 0,1% Tween 20
Biotinylierter $\alpha$ -Streptavidin- Antikörper	1:100 verdünnt in Detektionspuffer
Streptavidin-FITC-Konjugat	1:200 verdünnt in Detektionspuffer
Hybridisierungspuffer (Master-Mix)	5 ml 50% Formamid 1 ml 10% Dextransulfat in 2x SSC pH 7,0
dNTP-Mix (Biotinylierung)	15 µl Biotin-16-dUTP (1 mM) 10 µl dATP (0,4 mM) 10 µl dCTP (0,4 mM) 10 µl dGTP (0,4 mM) 2 µl dTTP (0,4 mM)
20x SSC	3 M NaCl 0,3 M Tri-Natriumcitrat pH 7,0
Waschlösung I	2 x SSC 0,1% Tween
Waschlösung II	50% Formamid in 2x SSC, pH 7,0
DAPI-Stock-Lösung	5 mg/ml 4', 6-Diamidino-2-phenyl-indole/2HCl
DAPI-Färbe-Lösung	0,1 ‰ DAPI Stocklösung in Waschlösung I

### 1.4.6 Allgemeine Puffer

10x TE Puffer	100 mM Tris 10 mM EDTA pH 8,0 HCl
Ladepuffer für DNA- Sequenzreaktionen	25 mM EDTA 50 mg/ml Dextranblau } pH 8,0 eine Einheit der Dextranblau/EDTA-Lösung mit 5 Einheiten Formamid mischen
APS	1 g /10 ml aqua dest.

## 1.5 Materialien für zellbiologische Arbeiten

F-10 (Ham) Nutrient Mixture + L-Glutamine	Gibco (Karlsruhe)
RPMI1640 Medium + L-Glutamine	Gibco (Karlsruhe)
Chang Medium <sup>®</sup> + L-Glutamine	Gibco (Karlsruhe)
Fötales Rinderserum (FBS)	Gibco (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Karlsruhe)
Phosphatpuffer (PBS, pH 7,4)	Gibco (Karlsruhe)
10x Trypsin-EDTA (0,5 %)	Gibco (Karlsruhe)
Fungizone, Amphotericin B	Gibco (Karlsruhe)
Thymidin	Sigma (Taufkirchen)
Polystyrol-Zellkulturflaschen (T-25 und T-75)	Sarstedt (Nümbrecht)

## 1.6 Zelllinien

### *E.coli* „OneShot<sup>®</sup>“ TOP10 Zellen

Genotyp: F<sup>-</sup> *mcrA*  $\Delta$ (*mrr hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74recA1* *araD139*  $\Delta$ (*ara-leu*)7697  
*galU galK rpsL* (Str<sup>R</sup>) *endA1 nupG*

### Fibroblasten

Die verwendeten primären humanen Fibroblasten wurden aus Hautbiopsien gewonnen und kultiviert. Es lagen primäre Fibroblasten von Patientin I vor.

### Lymphoblastoide Zellen

Die verwendeten immortalisierten B-Lymphozyten (lymphoblastoide Zellen) wurden von Kooperationspartnern hergestellt und zur Verfügung gestellt. Die Immortalisierung basiert auf der Transformation mit Teilen des Epstein-Barr Virus (EBV)-Genoms (Gerber *et al.*, 1970; Kempkes *et al.*, 1995b; Miller *et al.*, 1971). Es lagen lymphoblastoide Zelllinien der Patienten t(3;8), B, C, E, H, L, N, und U vor.

## 1.7 Oligonukleotide

Das Design der verwendeten Oligonukleotide (Primer) erfolgte manuell oder unter Verwendung des Programms „Primer3“. Oligonukleotide für quantitative RT-PCR-Analysen wurden ausschließlich mit diesem Programm erstellt. Es wurde darauf geachtet, dass kein bekannter „single nucleotide polymorphism“ in der Primersequenz vorlag, um eine allelspezifische Amplifikation zu vermeiden. Durch „BLAST“-Analysen der Primersequenzen gegen das humane Genom und/oder „in-silico“-PCR-Analysen (<http://genome.ucsc.edu>) wurde die Spezifität der Oligonukleotide überprüft. Die Oligonukleotideigenschaften wie Schmelztemperatur und die Neigung zur Bildung von Sekundärstrukturen und Primer-Dimeren wurden mit dem Programm „Oligo Calculator“ optimiert. Es wurde nach Möglichkeit ein GC-Gehalt von 50% und ein Guanin bzw. Cytosin am 3'-Ende der Primersequenz gewählt. Alle verwendeten Oligonukleotide wurden im Rahmen dieser Arbeit generiert und von der Firma Sigma-Genosys bzw. Sigma-Aldrich (Steinheim) bezogen.

### 1.7.1 Oligonukleotide für die Mutationsanalyse der positionellen Kandidatengene *CHDH*, *IL17RB*, *ACTR8*, *SELK*, *CACNA2D3*, *LRTM1*, *WNT5A*, *ERC2*, *CCDC66* und *C3orf63*

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
CHDH_3Fa	GTT GGT GAG CAT ACC CTG GAT ATG	CHDH_3Ra	TGG ATC TTC CAC GAG AGC CGC TTG
CHDH_3Fb	GTG CTG GCT GGG AGG CTC ACG GAG	CHDH_3Rb	TTG CGG AAG TAG GGC AGG CAG TGC
CHDH_3Fc	CCT CAA TGC CAT GGT CTA CGT CCG	CHDH_3Rc	AGC CTG GAG CCA CGG GCC AAG ATG
CHDH_4F	GCA GTC AGA GCT GGG CAT ATC CAC	CHDH_4R	GTG ACT CCT GCC CAC TCT GAG CTG
CHDH_5F	AGG CTG TGT TCT CAT GGT GCT GGC	CHDH_5R	GGG CTC TCG GGG ACA ATG TGA TAG
CHDH_6F	GCA GGA GCT GGT CCA GAA GAT AAG	CHDH_6R	TTC CGC ATC AAA CCC AGT GGC CAG
CHDH_7F	GAA GAG GAG CGG CCA GGA GAA AGG	CHDH_7R	GAA TGC TGC CTT GGA AGA TGG GAG
CHDH_8F	CAG GTA AAC CAG GGT TGA CAG AGG	CHDH_8R	GAG GGT CAC TTG TGT CCT AGA AAG
CHDH_9Fa	TCA GAC AGC TTA CAG AGC CTC TCC	CHDH_9Ra	CTG ACC ATG CTA GGC ATG ATG GAG
CHDH_9Fb	CAC CCC TCG TGC ACC TGT AAG ATG	CHDH_9Rb	CTG TGC TGG CCC TCT TGG CTT ATC
IL17RB_1F	CTC TGT TCG GGT GGC GGG AAT GG	IL17RB_1R	ACT GGC GGA TCA GAC GAC GTC AGG
IL17RB_2F	GCT GTG AAG CAG AAC CAG TTC ATC	IL17RB_2R	ACA GAG ACT TCA TCT GCA TCA GCC
IL17RB_3F	GAA GGT TTG GTG TGA GTC ACT GAG	IL17RB_3R	GCG TAG AAG GGG AAT TAA TGG TTC
IL17RB_4F	TGG AGA CAG TGG TGC CTA CCT TTC	IL17RB_4R	GCT TGA GCC CAG AAG ATT GAG GTC
IL17RB_5F	AGG GCA ACA CAC TAA GGT ATA CTG	IL17RB_5R	CTC TCT CTG TGC ATA TCG CAA AGC
IL17RB_6F	ATG TGT GTG TGC ACT TGG CAA AGG	IL17RB_6R	AGG GCT CAG TTC TTC TGT GCA AAG
IL17RB_7F	ATG TAG CAG CGT CCC TAT CTC TTG	IL17RB_7R	GAA TTC ATC AAA GTA GCC CAG CAC
IL17RB_8F	GGC TGG TCT CAA AAT ACT GGG CTC	IL17RB_8R	TGA ACG CCA CTT AAC TGG TGT CTG C
IL17RB_9F	GGC TGA AGT AGG AGT CTT GGT GAG	IL17RB_9R	AGA TTC TAG GTT CTC TGG GAC AGC
IL17RB_10F	TAG GCA ACA AAG CGA GAC TCT GTC	IL17RB_10R	CAT GTG ATT GCC TCC AGA GGA ATC
IL17RB_11aF	CTA GCA AGG GAT CAT TTG TCA GGG	IL17RB_11aR	ATC ACT GCA GAA AAG GTT AAA GGC
IL17RB_11bF	CCT TCT TTC CAA TGA CGT CAA CAG	IL17RB_11bR	CAG GAT CAT CAC ACG TTT TTT CCC
ACTR_1F	CGA CTC CGC GGC GGC CAT CTT G	ACTR_1R	TGC CTG GCA GCG GAG GAC CCA AGC
ACTR_2F	GAG TCA GCT TCT TAG TTT AGC TTG	ACTR_2R	ATT CTG GTG TAC TTG TGT CTA AGC
ACTR_3F	TGA AGG AGC ATT TCC AAA GAT TGG	ACTR_3R	TGG TAT AGG AAG AAC ATG TGA ATG
ACTR_4F	GCC AAT GTG TCT AGT ATG TGA GAG	ACTR_4R	GGT GGC AAC GTA AAT GAA TTT TAG
ACTR_5F	ACC GAC TCC TAC TTC ACT CTC AAC	ACTR_5R	TCG GTA ACG TGT ACT ATC ATT GAC
ACTR_6F	CTA CTC CTT TGG AGG GAA GTC TCT	ACTR_6R	AGC TGA GAT AGC GCC ACT GCA C
ACTR_7F	GAA AGG ATC AGT GTT CCT CAG ATG	ACTR_7R	AAT CTT GCT GGT TTA CCA TGC AGA C
ACTR_8F	GCC CAG CCA TTA ATG GAT TTC TTC	ACTR_8R	AAG TGC TGG GAT TAC AGG CAT GAG
ACTR_9F	TTT AGA TGA TGG TGA GGC TGA AGC	ACTR_9R	TCC AGC AAG GGC ATA TTC TCT CAG
ACTR_10F	AAC TTA GGG AAT CTG ATC TGC CAG	ACTR_10R	TAC AAT GGC CTA TTA ACT CTG GAC
ACTR_11F	TAG GGA GGG ATC TAG CTA GAC AAC	ACTR_11R	GAC TGA ACC AAT TTA TTT AAC TGCAT
ACTR_12F	AAG CAA GAG GTG TTG GTG GCT TG	ACTR_12R	TTG ATC TGT CCA CAT ACA AGC CTG
ACTR_13F	CTC GGC CCC ATA TTC AAG TAA ATG	ACTR_13R	TGT CCA TGA CAC TTA ACG ATT CAG
SELK_F1	GAG CAG AGG GAG ATA CAG AAA CC	SELK_R1	AAG GAA CCT GGA GTC CGA TCT TAC
SELK_F2	CCT CTT GGG TTA GGG ATT TGT AG	SELK_R2	GAT CCC TAA CAT AAT GCA CAT GAT G
SELK_F3	GAG CTA AGT GGG TTT AGT AAT CCT	SELK_R3	TTC CAA AAG TCT AAC TCT ATC TAC C
SELK_F4	GTG CTA TTC AGT TCA TCA CAG TCC	SELK_R4	AGT AAT TAT AAG CTG CTG GGC AAC
SELK_F5	ATT CAC TGG CCT TGT TAT CAA AAT	SELK_R5	GAC ACA GAG CAG TCC TTG TTT AGA
CACN_1AF	GAG CCG GGC GCG CGA GAG GCA GGC	CACN_1AR	GCCCAAACCTGGGCACAGTGGGTCGCAG
CACN_1BF	GTC TGG CAG TTT CTA CCA AGC CGC	CACN_1BR	AGA GTC CTC CGA TAA CTG ATG
CACN_2F	GTA GAT GTG GTC TGA AAT CAC AGC	CACN_2R	AGA GAT TGG TTC ATC AAT CGG ATC
CACN_3F	TCA GAT CAC AAT GTA TGA ACC ACG	CACN_3R	ATT CCA ACT CAG TAC CAT CCT CTC
CACN_4F	GTG AGC AGA TCA GGG TCC ACA GTG	CACN_4R	CAG TTG ATA CCT GAC ACA CTC AGC
CACN_5F	GTA TCT GCC AAG CAG CGT GGG ATG	CACN_5R	ACC CTG ACA ATA GGT TTG GAA TTC
CACN_6F	GTA GAG CAG CCT TGA AAT GCT ATG	CACN_6R	CTA AAA TGA CCA CGT CTT TCG GAG
CACN_7F	CGA AAA TGG TAG GCA GTG GTC AGA	CACN_7R	GCG AGA GCA ATG TTA ACC AGT CAC
CACN_8F	ACC CAT GAG AGA GTT CAC CTT ATG	CACN_8R	AAG GGC CTC AAT GAA AGG GCA GTG
CACN_9F	GCG GGT CGG ACC GGG TGT TAA AAG	CACN_9R	TAG TAA CCA GAA CGG TAC CGC ATG
CACN_10F	AAT CAG GGT CCA GAG TAC AGA GAC	CACN_10R	CAG ATG TAC TCC CTG AAT GAG TAC
CACN_11F	GAG CCA TGC ATG TGA TCT GTG CAG	CACN_11R	GAA GAA ACC GTT ACA AGT CTA TCA G
CACN_12A	GAG GGC AAG AAG GCA TGG CAT ATG	CACN_12B	GAG TGA TAC AGT TGC TAT TTT CTG
CACN_12B F	GAT ACC ACA AAT TCA GAA AGC AGG	CACN_12B R	CAG TGT CAA ATG TAC AAC ACC ATG
CACN_13F	AGC CCC TGG TTT GGA AAG GAC ATG	CACN_3R	CAA AAG TCA CCA GAG CTG GAG TCA
CACN_14F	AGA CGG TAT GTG ACT TCT CGT GAG	CACN_14R	CTC CAA AGT AGA GTT TGA AGC CTG



CACN_15 F1	CAA ATG TCA AGG ATC AGT GCC TTG C	CACN_15 R1	GTG TCA TCA CTG TTG AAT TGA AGG
CACN_16F	GTA AAG ATT GCC CTG GCT GAT GAC	CACN_16R	TGG TAG CCA GGT GTC CCT TCA GTG
CACN_17F	GAT GCA AGA TGT CCA GAT TAC ATG	CACN_17R	CTA TGA TCA GGT TAA CAG TAC TAC
CACN_18F	CTG TTA ACC TGA TCA TAG TGT GTC	CACN_18R	GAT GAG CTC TGA GAG GTG CAG CAG
CACN_19F	TGT TAG CCC ACA AGT CTA TTC GAG	CACN_19R	CTT CAG CTA ACT CAG TAG CTAGC
CACN_20F	TAC CCT AGA ATA TTT GAA GCA CAC	CACN_20R	CAG TAG GAC CTA AGA ACA TGA CAT
CACN_21F	AGT TTT CCT GAT TCC AAG GCA AAG	CACN_21R	GCA AAGCTT CCC TTA ACA AGT GAG
CACN_22F	GCT GCA CAA TGA GCC CAT GAG TGC	CACN_22R	CGA GCC GCT AAT CTG CTC TAG CTC
CACN_23F	GTA AGG GAT ACA AGT TGG CAA TCTG	CACN_23R	ATG CTG GGG CCC GCA TGG TAG AAC
CACN_24F1	CAG AGC TCT GCA AGA TGT TTT TGA G	CACN_24R1	GAG GCT ATT ACT CTT ATG GAA CTG
CACN_25F	TGG GAC CAA GCC CCA GAA CAA TTTG	CACN_25R	AGG AGA TGA CACCAA GCT GAG AAG
CACN_26F	TGC CAT GAC GGA TAA TTT TCA ACG	CACN_26R	TGT GGT GTC TAA CAT GCTGAC AGC
CACN_27F	CTT AAG TAG CTC AGT GGC AGC CAC	CACN_27R	ATT GGC CAGTA CAA TGC GCT AAC
CACN_28F	AGA ACC AGC AGG CTT TTG CAA TTG	CACN_28R	AAG CAG ACT GTG GCA TTC TTA GAG
CACN_29F	CAG TTC CAG GAC ACA GAC TGT GTC	CACN_29R	GAT CTT TTG GAG CAT GAA CAC AAG
CACN_30F	GAC TGC TCA CCT TGT AGT ACA TAG	CACN_30R	GAT TAC GGG CAT GAG CTG CCG CGC
CACN_31F	CTT CAC TTA GCT AGA ACG CCA CTG	CACN_31R	GCA TGA CTC ACA ATC TCT TAG ATC
CACN_32F1	GTA GTA ACT CAG CCA ACT GTG TTG	CACN_32R1	GAC TAG ATA GCA CAG CAC TTA GCA C
CACN_33F	CAG CAG AAG CGG AAC TGT GTT CTG	CACN_33R	CTG CAA GTC ACA CAG ACC CAT CTG
CACN_34F	GTA GTT GCT ACC ACC CAG GAG AGA	CACN_34R	CTC TCT CCA ACA GTG GAA AGG ATG
CACN_35F1	CCA CGG AAA CCA GTA AGG GGT ATC	CACN_35R1	CTT CTG GGA CCT AGA TGA TGG TGC
CACN_36F1	GAC TTC GTT CTT ACG TTA GAG AGG	CACN_36R1	CTA TAT TCA TGT CTC GTA TGT TGC
CACN_37F1	GAT AAT CAC CCT TCA TCA GAA ATGG	CACN_37R	GTT AAA TAT GTG CCT AGA ATC TGC
LRMT1_1F	AGA TCCTCTTATGGA AAC TGA TC	LRMT1_1R	GTC CAG TCT TTT AAG ACA GAC GAC
LRMT1_2F	GAT GTA CTC TGA CCA GCC TGG CTC	LRMT1_2R	AAC CTG CAA GTG CTG AAG CCC ATG
LRMT1_2F 1	ATC TGG CCC CTG GAG CTT TCC ATG	LRMT1_2R1	CAC CGA TGT GTA AAA GCC CAA ATC
LRMT1_3R3	GTA ATA ACT TCC CAG GCC CAG AGC	LRMT1_3F3	GCA GAG GAT TTT GGA ACT CTG TTG
WNT_P_F3	CAG CTG CCC AGG AGC CCT TCC	WNT_P_R3	TAG GGT TCG GCA AAA ACG GGG AGC
WNT_P_F2	GGT TAG TCG CAC CCC TCC AGC TC	WNT_P_R2	CCA GTT CAT TCA CAC CAC AGA TTC
WNT_P_F1	TCG GCT ACA GAC CCA GAG AGG AGG	WNT_P_R1	AGC AAG GGC AGG GCC TGG TCG
WNT5A -3F	GGT TGG AAA GCC CTA ATT ACC GCC	WNT5A -3R	AGC GGA GCG ACC GGG TTA AGC CTG
WNT5A -2F	TGC CCG CTT CAG CTC CGG TTC	WNT5A -2R	GGG AAC TCA GTT AAC TTC CAA CAG
WNT5A -1F	AGG AGA AGC GCA GTC AAT CAA CAG	WNT5A -1R	AAT ACA CCC ACA CTC ATC CAG ACT
WNT5A_F5	CTA TGT ATT GCT GAC ATG CTT TCAG	WNT5A_R5	GTA AAT GCT AAG GAT TTC TTC TAG G
WNT5A_F6	CCA CCC CCG GCA GCA TCC CGG CCC	WNT5A_R6;1	GTC CAC GAA CTC CTT GGC AAA GCG
WNT5A_F7	CGA GGA GAA CTT TGT TCC TAT AGC C	WNT5A_R7	CAT TGC GCA CGC AGT AGT CAG GGC
WNT5A_F8	GCA AGT TGG TAC AGG TCA ACA GCC	WNT5A_R8;1	CAC TGT ACT TTC TAT AAA TAA GCG
WNT5A_9F	GGA GAT CGT GGA CCA GTT TGT GTG	WNT5A_9R	TCT TGC ACC AGA GAA TTT ACA ACT C
WNT5A_10F	GGA TGG GTA GGT TCC AGT TGA AAG	WNT5A_10R	CAT TTA TGT TCA AGC CAA CCT CCC
WNT5A_11F	GAT TTG AAG CTG TTA TAA GAA TTAG	WNT5A_11R	GTA CAA TAG GAG AAG CAT GAG TGG
WNT5A_12F	CTA TGT TTT AAT GAC AGA ACT TGG C	WNT5A_12R	AGA CAA AGG GGT GAG GCA GAA AAG
WNT5A_13F	ACC TTG TTT CTG AGG AAG CTT GAG	WNT5A_13R	ATT CAC TGC AAC TGA GGG GAT GTG
WNT5A_14F	CTT AGG CAG GTT GGC TTT CAT ATC	WNT5A_14R	CTT TTG AAG CTT CCA AAT AGC TTG G
WNT5A_15F	CCA TGA CGG ATA GTT TAG GAT GAC	WNT5A_15R	CAA AGG CTA ATG TAT CAA TCT GTG
WNT5A_16F	ATG AAA ACT GGT TGG AAA CTA AAG G	WNT5A_16R	AAA AGT CTT CTT TCT ATT TGA GCC C
WNT5A_17F	AGC GTA TTC AAG ATC TTC CCA ATA C	WNT5A_17R	AAA ACA CGG CAT CTC TCT TTC ACC
WNT5A_18F	CAC GAA GGC ACA GGT CTA AAA TAC	WNT5A_18R	TAA GCC GTA ATC CGT GCC CAC ATC
ERC2_F1	GGA CAA TCG TGG AAA TAT TAG CTC	ERC2_R1	GTG TAT GAA AGG ACA TCT GTG TGG
ERC2_F2	GAA GGG CTA CAA ATC GAG CTG TAT	ERC2_R2	CTG CAA AGC ATC AAC TAC TCA GTG
ERC2_F3	GCA CTT GAC ATT TTC ATT GAC TT	ERC2_F3A	AGC TGA CCG AGG AGA ACT TTA GGC
ERC2_F4	AAG AGA CAC CTG TGG CTT GTT TAT	ERC2_R4	GCA CCA CCA AGT TAG AAC AAA CTC
ERC2_R5	AAA ATC TTC CGC ATT CTA CTT TGT	ERC2_R5A	TCT TCC GCA TTC TAC TTT GTT GTC
ERC2_F6	GAC CTT TAC AGA TTT TCC TCC AGA	ERC2_R6	AAG GGT TAG GAT AAA GGG TCT TTG
ERC2_F7	CAC AAT AGG GCT TTA AGA AGG ATG	ERC2_R7	CAT GAT GCA ACT ACC AGT AAG TGA
ERC2_F8	ACT TCA GGA ATT TTG GCC TAG GAT	ERC2_R8	GAA AGC CAA GAG TGA TGT AAT CAGA
ERC2_F9	GCA TTT CTT AGA TGT ACT GCC TCT T	ERC2_R9	TCT CTA GTC TCT TGC AGC TTC ATT
ERC2_F10A	GTT GAG CTA ATG CTG TTT TTC TGG	ERC2_R10A	TCA AAA CCT CCC CAG TAT GGC ACA
ERC2_F11	ATT GGT GAC AGC ACT GTC TAT TGT	ERC2_R11	GTC ATC TTT CAC AGG CCA TAT TC
ERC2_F12	TAT CCC TTT TCC TTT CTG CTT ATC	ERC2_R12	GTG CAA GCC ATA AAT TGA GCT TAG
ERC2_13F	AGC CCT TAT CCA GAT AGC CTA TAC	ERC2_R13	AATGGTGACATTTCTGAGAGAGTC
ERC2_F14	AGG CTA ACA AGG GAT GTC TTG TGC	ERC2_R14	CACTCTCAAGAGAGGCTAGAAGAG
ERC2_F15	GAG ACA ATA CTC TGT GGT TCA TTTC	ERC2_R15	AGAGTGGCTAAAATCCAGAGAAAG

ERC2_F16A	GGT ACT GTA ATT ATG CCC TGA ATC	ERC2_R16A	GTT TCA GTT CAA AGA ACG TAT CAC
ERC2_F17	CCT TCT CTT CTT TCA TTC TGG TGC	ERC2_R17	AAT CGA GCA CGC ACA CAA TAC AAC
CCDC66_F18	TAT ATC CAA TTG GCG TAG CGC TTG	CCDC66_R18	TAA AGA CTC CAA GGG ACA ACC CAG
CCDC66_F17	GTG TAC AAG ATT CCT GCA TAA ATT C	CCDC66_R17	TCT GCA GAA GTT TGA GGA AAC AG
CCDC66_F16	TCT TGC ATT ACC ACC TTA GTA TGC	CCDC66_R16	CTT AGA ACA CTT GAC ATT TCC CAG
CCDC66_F15	GAC TGA TTT ATC ACA GAT CAT ATAG	CCDC66_R15	TTC TGG ATA TGA AGA CAG TCT TTATC
CCDC66_F14	CAG TTG GTT CAG AAA CAT CAC AG	CCDC66_R14	GTC ACA GTT ACA TAA AAC CCA ATG
CCDC66_F13	AGA ACT GTA TAG CAC TAT GCC AAG	CCDC66_R13	TTC AGA GTA ACT ATT TCA AGT GCAAG
CCDC66_F12	GTC AGT TGT GTA GAA ATG TAT GATC	CCDC66_R12	AAG TGC TGG TAT TAC AGG TGT GAG
CCDC66_F11	GAT TAG ATC TGT GTT GGT ATC GTC	CCDC66_R11	AAT TCT ATA ATATGAACACTGCTTAGT A
CCDC66_F0	GCT CCT CTT ACA GAT AAA TGC CTC	CCDC66_R0	CTG GTC TTG TCA AGA GTT TCA GAA
CCDC66_F1	GTG ACT TTT AGA AAT CAT CTT TGG	CCDC66_R1	TAA CAA CAG TCT TAC TAA AGC ACA C
CCDC66_F2	GTT TCA GGT TTG GTA TTT GTC TTT G	CCDC66_R2	GGA CAG GAC CTA TGC TGT AAA GTT
CCDC66_F3	CTT GAA TTC CCT CCT GCT TAG AT	CCDC66_R3A	GAT TGC ACC ACT GCA CTC CAA C
CCDC66_F4	CTT TGC CTT GTT GAC TGT TGT ACC	CCDC66_R4	ATG AGT CCT TGT CTC CAA ACA AAG
CCDC66_F5	GTA ACT GAT AGG AAT GTG GGT ACT	CCDC66_R5	ACA TGT TTC AAC AAA GCT GTT AT
CCDC66_F6	GAG TAT AGA GGT TCG GTT TTG TTG	CCDC66_R6A	ATA TTC CAA TCA GGC CTT TTA GGA
CCDC66_14F2	CGG TGT AAT GAC CAG TGT AAT CAG	CCDC66_R6	TAC CAA AGC ATA CGT ATG AGA AAC
CCDC66_F7	CCA TTG CTC AGT CAG TAC CTG TTA	CCDC66_R7	CAC CCT TTC TGA TTG TTC TCT ACA
CCDC66_F8A	CTT CAT CTC ATA AAT AAA GTG AAATG	CCDC66_R8A	GGA ATT ACT AAT TTG GAA TTT AAAGT
CCDC66_F9	GCA CAG GGC TAT GTC ATT TTA CTA	CCDC66_R9	GGA TGC ACC GAA GTA ACT TAA AAC
CCDC66_F10	GAG GTG GTC TAG TAC AAG CAT TTC	CCDC66_R10	GAA AAA TAC AGT TGA GCC AGT GAG
C3orf63_F1	GTG TAT GTG TTA AGA TTG CTA GAG	C3orf63_R1	CAC TAA TAT GAT CAC ACA TGA ATA
C3orf63_F2	TCC TGT TAA TCA GCA GAG TTG GTA	C3orf63_R2	CCA GTA TTT CCT GAA ACA TGA GGT
C3orf63_F3	TTT AGG ATC CTG GAC TTT ACA AGC	C3orf63_R3	CTG AAA GTG GAC TAA ACT GCT GAA
C3orf63_F4	TAC TCA GCT CCC AGA AAT AAA TCC	C3orf63_R4	TTA ATT TAT ACG CCC CTC TGC TAC
C3orf63_F5	GTT GAG TTC CTG ACC ATA AAT GC	C3orf63_R5	TCT TTC ACA CAG ACA CTC ACA AAC
C3orf63_F6	CTT CAG CAC AAA CGT TTA CCA ATC	C3orf63_R6	GAA ACA TTC AGG AAA CTG GTC TCT
C3orf63_F7	ACC GTT TCT CAT TTA GAC ACC TTC	C3orf63_R7	TGG AGT ATC AGA AAT GCA AGT AGC
C3orf63_F8	CCC GGG TAA TAA ATA GAC AGA GAA	C3orf63_R8	CTT AGC ACC AGA ATC GTT AGG ACT
C3orf63_F9	GAG TTT GTA GAT GGT TTG CAT GAG	C3orf63_R9	TAG AGG TCA CAC CAA CAA GAG AAG
C3orf63_F10	AAG GAT TTG ATG GTC TCT TAG AGT G	C3orf63_R10	GAT GGG TCC TTA AGT TTA ATC TCC T
C3orf63_F11	TCT TGT AGG TTC CTT CAC ACT TGA	C3orf63_R11	CTG TGA ATG GCA GAA TAA ATG GAC
C3orf63_F12	GGC ATG TAT AGA TCT GTC TCC CTT A	C3orf63_R12	ATA CTC AAT TAT GGC TGG CTA TGG
C3orf63_F13	CAT TAG TTG CCT CAG TGG AGA AAT	C3orf63_R13	CAG AAT CAA AGC TTA GCA ATA CCC
C3orf63_F14	GTG GGT ATT GCT AAG CTT TGA TTC	C3orf63_R14	CCC TAT GGC TGT TTA TAC TGA GGT
C3orf63_F15	TGA CGC GTT ATA TTG TGT GAG TAG	C3orf63_R15	GTT CTG TTG AAT TGC TGT TCT CTC
C3orf63_F16	TCA GAA ATA TGG GAG AAA GAG ACC	C3orf63_R16	CTT CAA CTG TTA CAG GCC ATC AT

### 1.7.2 Oligonukleotide für die SNP-Analyse

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
rs2056349_F	ATT TTG CCT GTA CTG CCA TGA GGG	rs2056349_R	GGG CCT TTA AGA GTC AGA CAC ATC
rs472631_F	AGA TCC TCC TCT CGT TTT CAT ACG	rs472631_R	GCA GCT GAA GAC CAG AGA GCA TAC
rs556874_F	TTC ACA GAA CCC AAG GTA GGT GCC	rs556874_R	TCT CTT AGC TGT GAT GCA TGA ATT C
rs566926_F	AAC CGC CTG AAG AAG CTG GAA CTC	rs566926_R	ACT CGA TGT TCT CAG AGC AAA AGG
rs9311564_F	AAC TTG AAG TAG TCA AAT GTC CCC	rs9311564_R	ACA GGC CTC TGA CAT TAG AGA AAG
rs17055405_F	CCA GTC TGT ATA CTT GTC CCT CTG	rs17055405_R	CCT GTC ACC ATA TAC CTG AAC CAG
rs9823604_F	AGA GAT ACT GGG GAT CTG CTA CTC	rs9823604_R	TAG GGG GTA GGG GAT CAA TAA GG
rs3732750_F	GTT CAC TTT GTG GAG AGG GCA TTA C	rs3732750_R	ATC TAT GTA GTG GGC TGA ATA TTC C
rs17711385_F	ACC AAG AGT GGA GAT TCT TTT TGG	rs17711385_R	AAA GGC CAA GCA AAG ATC CTC TCC
rs1047898_F	TGG AGG AAA ATT GCA TCT TAG ACC	rs1047898_R	CCG TGC CCA CAT CAA ACT TCA ATG
rs815541_F	CTG TAA TCC GCC GAA TCT GTT ATC	rs815541_R	CTG CAA AGT CAA CTC TCC CCA AGG
rs648872_F	CTC CAA GCT TCG ATT CCT ATT TCC	rs648872_R	GCA AGG CCC AAG TTA CTT CCA AAC
rs3821658_F	GTC TCAC TTT CTT TCT CCC TCT TCC	rs3821658_R	TTT TCA GGC AAC TGC TGG TTC ACC
rs7622120_F	TCC ACA TGT TGC TGC TGC TCT TTC	rs7622120_R	ACA AAG TTC TCC TCG ACC TTC TCC

### 1.7.3 Oligonukleotide für die Mutationsanalyse der funktionellen Kandidatengene *ROR2*, *FZD2*, *FZD5*, *FZD7*, *DKK1*, *DKK2*, *DKK3* und *DKK4*

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
ROR_F1B	TCG AAG TGG ACC CGT TTG CGA AGC	ROR_R1A	GGC GCA GCG GCC GGG AGC ATA GTG
ROR_F2	TAC TGG GTA GTT TTG CTA GAA TGC	ROR_R2	TTC AGG CAA TGG CAG TGC AAG ATG
ROR_F3	GAG CCC CCA GGT AGC CCT TCC TTC	ROR_R3	ACT GGA CCT CTT GCT CGG TGG CTG
ROR_F4	TTC AGC CTG TTT GCC ACT GGC CTG	ROR_R4	TGAG CTG GCA GGA TTT AAA CCC CG
ROR_F5	TCG CAA GAT GCT GGA TCA TAA AAG	ROR_R5	ATG AAA CAC AGT GGC CAC CAT CTG
ROR_F6	GTG GGG ACT GGA TGA ATG TCA AGG	ROR_R6	GAC ACC CCC ATA CAC ATT TCA AGG
ROR_F7	ATT CTA GTT TGG GCA TGT GTA GGC	ROR_R7	CCA ACC CAG GTC AGG ACA GAA CGC
ROR_F8	TGG AGG TGG AGA GTG GGT TGG TAG	ROR_R8A	AAG ACA TTT AAT GTT GGG GGA AAC
ROR_F9;1A	CTA GTC GTG GCC GCA CAG GGA CTC	ROR_R9A	GGA CTT CAC CGT GCG GTC ATC ATC
ROR_F9B	TCT TCA GCT ACT GTT CGC ACG GCG	ROR_R9B	ACC ACA TCC TGG TTG GAGT ACC CG
ROR_F9C1	ACG GCA AGT TCT CCA TCG ACT CAG	ROR_R9C1	TTG ACG GGG ACG TAG AGC TGC GGC
ROR_9FD	CGCTACGTGGGGCCCAAGCAGAAG	ROR_R9D	TCA AAG GTG ACT GAG GTC CCT GTG
FZD2_F1	GGG GCG CCA AGG AGC CGG GTG	FZD2_R1	CGG TGG TGA GTA GCG CGG GAG CTC
FZD2_F2	CAT GAA CAA GTT CGG TTT TCAG TG	FZD2_R2	CTC GGA GAA GCG CTC GTT GCA CAC
FZD2_F3	ACC CAG AGC GGC CTA TCA TTT TTC	FZD2_R3	AAA AAA TAA AAT ACG GAG TCT GTG G
FZD5_E2_F1	GGC CCG GAT TCC TCT GCC TGT GTG	FZD5_E2_R1	AGG CGA AGC CGT ACT GGC GCA TCAG
FZD5_E2_F2	TCT GTC TGC CCG ACT ACC ACA AGC	FZD5_E2_R2	GAG ATG AAG CAC AGC ACC GAC CAC
FZD5_E2_F3	AAC TGC GCG GTA CCC TGC TAC CAG	FZD5_E2_R3	GAC TTG ACG CTG GGG ATG AGC CAC
FZD5_E2_F4	ATC CTG TCG CTC ACC TGG TTC CTG	FZD5_E2_R4	CGC CTC CCA GCT CTC GCG GTA GTG
FZD5_E2_F5	ATC GGC ATC TTC ACG CTG CTC TAC	FZD5_E2_R5	GGC AAA ACT ACC AAA CAA AAC GCC
FZD7_F1	CCC CGC ATC CAA GCC TCT CCC AAC	FZD7_R1	CGG TTC TGG CCC ACG CAG ATC TC
FZD7_F2	CAG GGC TGC GAG GCG CTC ATG AAC	FZD7_R2	CGT GCG GTA GCC ATC GTC CGA GAA
FZD7_F3	ATC TTC CTG TCG GGC TGC TAC TTC	FZD7_R3	ACG ATG GTG GCG GGC ACT GTGT AG
FZD7_F4	TCC CTC TTC CGT ATC CGC ACC ATC	FZD7_R4	GGC CCC CAC CCA GCA GTT CTT TTC
DKK1_F1	TCG TGG GGA CCC AGG CTT GCA AAG	DKK1_R1	CAC GTT CTA CTC CCT CGT CTC CAG
DKK1_F2	GAC AGA TAA GGA CTG TGA TCA GCG	DKK1_R2	CGC CCA ATT CAT AGA CGC TCA AAG
DKK1_F3	GAC TGC CAC TGT CAC AGC TGT TAG	DKK1_R3	TAC TGT TAA ACC TGC ATC GTT TCAC
DKK1_F4	CAT TCT TAG CAC ATC AGA AGT GTC	DKK1_R4	TGA GTT GAT GAA GGT CAT AAA AGG
DKK2_F1	CAA GCC CCC GCG ACC CAA GTG AGG	DKK2_R1	CTC CGA ATG TTG CAA GAT GCA ATG
DKK2_F2	TCC GGG TGA GAT ATA TTG TGA TTC	DKK2_R2	GGA GTC TGA GTA AGG AGA CGA TAG
DKK2_F3	ATA CAC AGATAG ATA AAT GGC TTC	DKK2_R3	CTA GCT AGG ATT AAA GAA ACT TCC
DKK2_F4	GGT AAC AAC ATA GAA GAT AGT ATA A	DKK2_R4	TTC TGC ATC TGA ACC TTA TTT TCC
DKK3_F2A	GTG CGG GAA AGA GGG GCG CCA G	DKK3_R2A	TGG CCA GCG CTC TTC CAT GCC TTC
DKK3_F2B	CGT TTT CAG GGG CCT CGG TTT CC	DKK3_R2B	GAG GTC CCT GGC CAG CGC TCT TCC
DKK3_F3	TTC TAA TAG ACT CCC ATT TGT AAC	DKK3_R3	ATT CTC AATTGTACTTTGGGCTTG
DKK3_F4	GAC TCC TAT ACT GGA TGC TCC TGC	DKK3_R4	GCA TCT GAG TCA CCG TTG GCA AAC
DKK3_F5	GCT GAG CCT GTG GGG TCA AGA ATG	DKK3_R5	CAT GGT GAG GCT CTT CTG GGA AGC
DKK3_F6	AGG ATG CAG GTT GGC CTA TCT GTG	DKK3_R6	ATC CAA GAG GTG GGA CGC GAA ACC
DKK3_F7	CTA GCC TGC ACT TTG GGG TTG AGG	DKK3_R7	ACC CAA CGA CCT CTC AAA CCA ATC
DKK3_F8	GGA GGG GGC ATG AAG GTG AGG CTG	DKK3_R8	GAG GGG AAA CTT ACT GGG AAG AAG
DKK4_F1	TAG TGG AAG CTC TGC TCT GGG TGG	DKK4_R1	ACA TGA ATC AGA ATG ACT TAC TAAA
DKK4_F2	GCC TCC TGC CTT CAA TAA TAA GTC	DKK4_R2	ACC ATT AGA GAG TGC CTA CCC TGG
DKK4_F3	TGC TGC CAA ACT ATG CAA CAG TAG	DKK4_R3	GAA TAA AAT CAG TCT CAC CCT ATC C
DKK4_F4	GGT CCC ATT CCC TTA TCC CAG TAG	DKK4_R4	GAT TTT AAG AGA GAT CTG TAT GGAA

### 1.7.4 Oligonukleotide für die Mutationsanalyse konservierter nicht-kodierender DNA-Sequenzelemente

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
CNGs1_F1	TAA GAG CAG CCT CTA CAA AA TGAG	CNGs1_R1	CTC TGA TGG CTA CCA TCG TAA AAC
CNGs1_F2	CCA TTA GAC ATT TCT GTT CCC AGC	CNGs1_R2	TAC TCT GTC TGC AAT CAA CCT TTC
CNGs2_F1	CAG CAT GCC CAT ACG TTT TCT GTC	CNGs2_R1	GCT GAG GGT GTG TGT CTG CTT GTG
CNGs3_F1	TCC TAG CGA GAA GTC ATT TGG TAG	CNGs3_R1	ACC TTC ATC CAC TCT CGT TAC AGG
CNGs4_F1	GTC AAA GCC ATC CTA AGG ATG TTC	CNGs4_R1	TAT TTG GAT GCA TAT AAG TGG TAC C
CNGs5_F1	CCT CTT CCA TCT GTG ACA GCC TGC	CNGs5_R1	CCC AGA GGA ATA ATC ATT GGC ATT C
CNGs5_F2	AGA ATA TCC AAA TGG TCC CAA CTG	CNGs5_R2	TGA AGT ACA ATG CTC AGT GCA GTG
CNGs6_F1	CCC TGT GGA TAG GCA AAT GTC CCA G	CNGs6_R1	CGT GTC AGC TCA GAG GAC CAT CAG
CNGs6_F2	TTT GAA AAC CTT TAG GAG GCC TGA G	CNGs6_R2	CTG GTT CTA GGC TTT AAG GCC ACG
CNGs7_F1	ATT TAT CAG CCC TTC CCT GGA AGG	CNGs7_R1	GCT ATA TGG GTAG AAC CAC CTG AC
CNGs7_F2	CTG TCA TTA ACA ATC TGC CCA TCT C	CNGs7_R2	GCA ATT GAT TCT AAG CAA GTC TTT GTG
CNGs8_F1	TCT CTA GTC TCT GCT CGG CTG TTC	CNGs8_R1	TTC AGA GAG ACA ATG TGT CTG AGA TG
CNGs9_F1	TCC AGC CTG AGA GAG ACA AGG AGC	CNGs9_R1	GTT GCA TAA TAA AAA GCA TGT GTA AT
CNGs9_F2	ATC TCT AAT AAA GAT GGA GGT AGG C	CNGs9_R2	ACC TGG CTT GAT AAG GCA GAC AAC

### 1.7.5 Oligonukleotide für Expressionsanalysen

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
Fum_1F	CAG CAC CAT GTA CCG AGG ACT	Fum_3R	CTT CAG CGG CCG CTC GCT TCA
RAP_Ex1_F1A	CAA GAG ACT TTG GTG GAC ACT GTT C	RAP_Ex4_R1A	GC AGT AAA CTC TCC ATG TTA CTT CC
AL_Ex4_F1	GCA GTT TGG TGT GTC TAA CAC AAG	AL_Ex8_R1	CTG AAA GGG TGC TCC AGC AGT ACT G
AL_Ex14_F2	CGG TGT AAT GAC CAG TGT AAT CAG	AL_Ex15_R2	CAC TAC TGG AAC TGG TGA TGA TGG
WNT_Ex2_F	GCT GGA AGT GCA ATG TCT TCC AAG	WNT_Ex3_R	ATG TAC TGCA TGT GGT CCT GAT AC
GEF_Ex6_F1	CTCA GCT CCT ATG ATA GCT ACT GC	GEF_Ex9_R1	GTT GAA AGT GTC ATT GGCTTGATAGC
WNT_-2F	TGC CCG CTT CAG CTC CGG TTC	WNT_Ex3_R	ATG TAC TGC ATG TGG TCC TGA TAC
WNT_Ex2_F	GCT GGA AGT GCA ATG TCT TCC AAG	WNT_R6;1	GTC CAC GAA CTC CTT GGC AAA GCG
WNT_Ex3_F1	CCA GTA TCA ATT CCG ACA TCG AAG	WNT_Ex5_R	ATC ACC CAC CTT GCG GAA GTC TGC
WNT5_Q_R2	TGG CAC AGT TTC TTC TGT CCT	WNT5_Q_F2	GCT TTG GCC ATA TTT TTC TCC
ROR2_Q_F4	GAAATGCCCTCATTAACCA	ROR2_Q_R4	TGT CCT TCA GCG TTT TGATG
WNT10BQF2	TTC TCT CGG GAT TTC TTG GA	WNT10BQR2	TCC AGC ATG TCT TGA ACT GG
TUB_Fw	TGG AAC CCA CAG TCA TTG ATG A	TUB_Rev	TGA TCT CCT TGC CAA TGG TGT A
ACT_Fw	AGC CTC GCC TTT GC CGA	ACT_Rev	CTG GTG CCT GGG GCG
RPIL_Fw	GCA CCA CGT CCA ATG ACA T	RPIL_Rev	GTG CGG CTG CTT CCA TAA
HPRT_Fw	CTCAACTTTAACTGGAAAGAATGTC	HPRT_Rev	TCC TTT TCA CCA GCA AG CT
TBP_Fw	TTC GGA GAG TTC TGG GAT TGT A	TBP_Rev	TGG ACT GTT CTT CAC TCT TGG C
GAPDH_F	CAT CTT CTT TTG CGT CGC CA	GAPDH_R	TTA AAA GCA GCC CTG GTG ACC

### 1.7.6 Oligonukleotide für die Typisierung von Fosmid-Klonen

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
1864D6_Fw	CTT CAC TTA GCT AGA ACG CCA CTG	1864D6_Rev	GCA TGA CTC ACA ATC TCT TAG ATC
492L18_Fw	GAC TTC GTT CTT ACG TTA GAG AGG	492L18_Rev	CTA TAT TCA TGT CTC GTA TGT TGC
933M22_Fw	GTC TTT AAG AAA TTG TGA GTG ATA GG	933M22_Rev	CCC ATG TTT TCT TTC TTG AAT ACC
2892J18_Fw	GCT TTA ACC ACA AAC CGC ACT CGC	2892J18_Rev	TGT GAA CAA AGT CCA CTG CTC AGC
1829A5_Fw	TCG TTG GAG GGT TTC AAA CCT AGC	1829A5_Rev	AAC TCT CGT GAC TTC ACA TGT GAC
2546J13_Fw	TCG TTG GAG GGT TTC AAA CCT AGC	2546J13_Rev	AAC TCT CGT GAC TTC ACA TGT GAC
1322L15_Fw	GAG TCA TCC AAG TTC TGT GTG TTG	1322L15_Rev	TCA CAA CAT ACC TAT GAG AAT CAG
1875H7_Fw	CAG TGT CTC ATT GTT CTT TGA GCC	1875H7_Rev	GTA CTG GAT TGT ATG TGA CTA GGG
571C14_Fw	GAA TTC AGA TGT TAA CTC CCC GTG	571C14_Rev	CAG GCC CAG AGA TGA TTC TAT GTC
1251O18_Fw	AAG GCG CTT ATG TTC CCA CTA ATC	1251O18_Rev	ACT TAA CCC AGG AGA AAA GCA GTC
669K13_Fw	AAG GCG CTT ATG TTC CCA CTA ATC	669K13_Rev	ACT TAA CCC AGG AGA AAA GCA GTC

### 1.7.7 Chromosom 3-spezifische Oligonukleotide für die Amplifikation der Bruchpunktsequenzen

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
Chr.3_1F	TAT CAT GGA GAA GGA TGT CTC TCC TTG C	Chr.3_1R	AGT GGG TTC TGG AAA GGC AGG GAT
Chr.3_2F	GCA GAG GCT CAG TTG ATT AAT GAT CTA C	Chr.3_2R	AGG GAT CCG AGC AAA TAT AGA TGC
Chr.3_3F	GTA GAC TTA GGA ACT GCA CAG ATA GCT G	Chr.3_3R	CTT GCT GTC TTT GCA GTA TTC TGA CAT
Chr.3_4F	GTA TTT TGT TTT GGC AGT GGA GGG GAT C	Chr.3_4R	GAT CCT GTG TAG TCT TTA TTA AGT TAG
Chr.3_5F	GTA AGG ATT AGA GGA GCA GAG CAG ATG	Chr.3_5R	TAC TGC ATG CTT TCT CTA TTA CTA TTG
Chr.3_6F	GAT CTT GCA GTG TGC AGA GAT TAG AGA G	Chr.3_6R	TAC CAG AGA GGG TTA TTT AGT AGT
Chr.3_7F	TGG TAT TGG TGA TTT GCA GAG AGG AGT G	Chr.3_7R	TAT CCC CTT ACC TAC TTT AGT CTC CCT
Chr.3_8F	GAT GCA GTA CGA AGT ACC TGG CAT CAC	Chr.3_8R	TCA CCA TCT GCA TTT AAG TGA CCC TTC
Chr.3_9F	CAC AGT CAT ACC CTG CTG ATT TGT CAT G	Chr.3_8RA	TGT GTT AGA CTG CCT CTC GTC CAC
Chr.3_10F	CCT GAT ATG TGT AAG CTA TAA GTA TAT G	Chr.3_8RB	TGC AGG ACT TTG AAG GCA GCA TAG
Chr.3_11F	ACG CAC ACC AGA CTA CTG TAT TCC TTC	Chr.3_9R	AGA GGA GAC AGA TCA TGC TCA TGA
Chr.3_12F	CTA CAG AGT GTC CCG AGT GGA GTC TCT	Chr.3_10R	GCA CTT TCA GCC TTC CCC TGC TCA GTA
Chr.3_13F	ATA GGC TAT TTG CGA TCC TGA GTG ATG	Chr.3_11R	ACT GGA GTT GTT CTC AGA TCA TTT TGT
Chr.3_14F	TCT GAA GAG TGA AAC TCA GGC CCA GTA C	Chr.3_12R	TAG ATG AGT AAC AAG ATT GCC AAC TC
		Chr.3_13R	GCT CTC AAC GAC TGT AAT CTC TTC
		Chr.3_14R	CTG AGT GCT GGG TAC TTT CAA CGA G
		Chr.3_15R	GAG ACC TAA TAC AGA ACA TCA GAC TG
		Chr.3_16R	ATG CCT TGC ATA TAG CCT GCT CTC
		Chr.3_17R	R TCA CCT TCA GTA TTT ACT GTA GAG A
		Chr.3_18R	CGG ATT GCA TTT GGC TGC TTG TAG
		Chr.3_19R	CAG TGG CTC CAC TAT CAA GCA CAA G
		Chr.3_20R	GCA CAA ACT TGG ACA AGT CAG CAT
		Chr.3_21R	CCT ATG ATC CTA TTG AAA TCT CCA G
		Chr.3_22R	CTA TCT GGT AAT GAG TTA TGC TTC TGC
		Chr.3_23R	GCA CAT TTG TGG GTG TCA TGA GTC
		Chr.3_24R	GAA TCA CGC TGG TGT GCT TCA GAC
		Chr.3_25R	GGT CAT GTT GGT GTC AAG GCG CTA
		Chr.3_26R	GCG TTA TTG GCC TCC CCA GTA GAC
		Chr.3_27R	GCA CGA ATG CAT GCT GCA AAT GAC
		Chr.3_28R	CTG AGC TTA CTC AGA CAG GCA ATA G

### 1.7.8 Chromosom 8-spezifische Oligonukleotide für die Amplifikation der Bruchpunktsequenzen

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
Chr.8_F1	CCT CTC TGG ATG TTT TAC TGC CTC	Chr.8_R1	GCA GAA GAC AAA AGA GAC CCA AAC
Chr.8_F2	AGT TGA GGA GTC AGA GCC TTA GTC	Chr.8_R2	ATG AAC ACT CAC TAG TCT GGA CCC
Chr.8_F3	CTT ATG ACC AGA ATA TAG GTG AAG	Chr.8_R3	AGG ACC AAA AAT GAT GCC TCA GAG
Chr.8_F4	CGG GGA ATA AAA TGA AAC ACA GAC	Chr.8_R4	GTT ATA CGT CAG TGT CTC CAC CTC
Chr.8_F5	AAG AAA CGC TAA GGG CAG ATC ACC	Chr.8_R5	CAC CTT ATT AGC AGG ACA AAT GAC
Chr.8_F6	TGG AGT TTC TCT CTG CCA AGA AGC	Chr.8_R6	TGA ACA GGC CAT GGC ACT AAA GAG
Chr.8_F6A	GGG GAC ACA GGC GTG CCA AGC TTC	Chr.8_R7	AAG AAA GAA GGA AGA AGC CAA GGC
Chr.8_F6B	CAC AGT GGT TCA AGT TTG AGA TGC	Chr.8_R8	AAG GCC TGG CAC AGA AAA GGT AAC
Chr.8_F6C	GAG CAC TGA CAG TGA TGA GGG CAG	Chr.8_R9	ATA GCA ATA GTG GCA GTG GTG GTG
Chr.8_F6D	ATG AGA TGT CCA GAA GAG GCA GGC	Chr.8_R10	GTT CAT TAC AGT ACC TAG ATG GTT TGT
Chr.8_F6E	GGA GGG TCC AGT GGA ACC GAT TTG	Chr.8_R11	AGT CCT ATA CTG TCT CTG CTC CGC
Chr.8_F7	TCC TAG CCC CTG TTT CTG AAA TGC		
Chr.8_F8	TCT GGG AGG ACT AAG GAA AAG CTG		
Chr.3_R8A	TGT GTT AGA CTG CCT CTC GTC CAC		
Chr.3_R8B	TGC AGG ACT TTG AAG GCA GGA TAG		
Chr.3_R8C	AAT GCC TAA GGA AAC CTG TCT CGC		
Chr.8_F9	CAT CAC TGC TGC TAC CAC TAC CAC		
Chr.8_F10	GAG TTG AAA GAA TTT TAT AGC AAA		
Chr.8_F11	AGC ATA GGA CTT GGT TGT GGA TTG		
Chr.8_F12	CAT GAA TGT TGT ACC ACA GCA TCC		

## 1.8 Fosmid-Klone

Die in dieser Arbeit verwendeten humanen Fosmid-Klone wurden vom „BACPAC Resources Center“ in Oakland (USA) bezogen und stammen aus der Bibliothek WIBR-2. Die Größe der Fosmid-Inserts beträgt ~40 Kb. Die Größe des Vektors beträgt 7518 Bp. Die in dieser Arbeit verwendeten Fosmide kartieren alle in der Region 3p14.3.

Fosmid	Eigenschaften	Referenz/Herkunft
WI2-1864D6 (G248P86491B3)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center
WI2-492L18 (G248P8775F9)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center
WI2-933M22 (G248P8542G11)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center
WI2-2892J18 (G248P89115E9)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center
WI2-1829A5 (G248P86512A3)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center
WI2-2546J13 (G248P83425E7)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center
WI2-1322L15 (G248P84233F8)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center
WI2-1875H7 (G248P85465D4)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center
WI2-571C14 (G248P8962B7)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center
WI2-1251O18 (G248P85590H9)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center
WI2-669K13 (G248P80032F7)	~40 Kb humanes genomisches DNA-Fragment kloniert in pEpiFOS5	BACPAC Resources Center

## 2. Molekularbiologische Methoden

### 2.1 DNA-Isolierung aus Vollblut

Die genomische DNA wurde aus 1–3 ml EDTA-Vollblut mit dem *QIAamp Midi Kit* (Qiagen, Hilden) oder dem *FlexiGene DNA Kit* (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Bei der DNA-Isolierung mit dem *QIAamp Midi Kit* (Qiagen, Hilden) wurden die Zellen zunächst pelletiert, nachfolgend lysiert und Proteine und andere Bestandteile durch eine Inkubation von 10 Min. bei 70°C denaturiert. Das Lysat wurde dann auf eine Zentrifugationssäule transferiert, wo eine Immobilisierung der DNA an einer Silicagel-Matrix erfolgte. Nach zwei Waschschritten der Säule mit Salzlösung konnte die DNA dann mit einem Hydratisierungspuffer eluiert werden. Die Isolierung mit dem *FlexiGene DNA Kit* (Qiagen, Hilden) basiert auf einer Lyse der Zellen, gefolgt von einer Denaturierung der Proteine und anderer Bestandteile durch die Inkubation von 5 Min. bei 65°C. Anschließend wurde eine Präzipitation der DNA mit Isopropanol und nachfolgend mit 70% (v/v) Ethanol durchgeführt. Nach der Lufttrocknung des nun vorliegenden Pellets wurde die DNA bei 65°C in einem Hydratisierungspuffer resuspendiert.

### 2.2 Isolierung von Fosmid-Klon-DNA aus *E.coli*

Reine Fosmid-DNA für die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) wurde mit dem *Qiagen Plasmid Midi-Kit* (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers isoliert. Das Protokoll beruht

auf einer modifizierten alkalischen Bakterienlyse, gefolgt von der Immobilisierung der DNA durch die Bindung an eine Diethylaminoethanol (DEAE)-basierte Anionenaustauscher Säule. RNA, Proteine und andere Bestandteile wurden durch das Waschen der Säule mit einer Salzlösung entfernt. Durch eine hoch konzentrierte Salzlösung wurde die DNA dann eluiert und anschließend mit einer Isopropanol-Präzipitation entsalzt, letztlich in HPLC-Wasser resuspendiert und bei  $-20^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.3 Isolierung von RNA aus Vollblut

Die Isolierung von RNA aus Vollblut wurde mit dem *PAXgene<sup>TM</sup> Blood RNA Kit* (Qiagen, Hilden) nach den Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Blutzellen zunächst pelletiert und lysiert, um nachfolgend eine Präzipitation der Nukleinsäuren durchzuführen. Um eine Kontamination mit DNA zu vermeiden, wurde ein *DNaseI*-Verdau (Qiagen, Hilden) vollzogen und die RNA anschließend an der Silicagel-Matrix einer Zentrifugationssäule immobilisiert. Nach einem Waschschrift wurde die RNA dann mit *RNase*-freiem Wasser von der Säule eluiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.4 Isolierung von RNA aus humanen Zellen

Die Isolierung von RNA aus humanen Fibroblasten und lymphoblastoiden Zellen wurde mit dem *RNeasy<sup>®</sup> Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach den Vorschriften des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Zellen zunächst durch einen Guanidinisothiocyanat-Puffer und Zentrifugation auf einer *QIAshredder* Säule (Qiagen, Hilden) lysiert und homogenisiert. Anschließend folgte eine partielle Ethanol-Präzipitation, gefolgt von der RNA-Immobilisierung an einer RNA-bindenden Säule, auf der dann ein *DNaseI*-Verdau (Qiagen, Hilden) durchgeführt wurde. Nach 3 Waschschriften der Zentrifugationssäule wurde die RNA mit *RNase*-freiem Wasser eluiert und bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert.

### 2.5 Qualitätskontrolle der isolierten RNA

Um die Integrität der isolierten RNA zu untersuchen, wurden jeweils 3  $\mu\text{l}$  RNA auf einem 0,8%-igen (v/v) Agarosegel, unter *RNase*-reduzierten Bedingungen, einer Gelelektrophorese unterzogen. Nach einer *RNase*-freien Isolierung waren die beiden 18S- und 28S-rRNA-Banden von 1,9 und 5,0 Kb sowie ein leichter Schmier der isolierten mRNA-Moleküle im Ethidiumbromid gefärbten Gel zu erkennen.

### 2.6 Quantifizierung von DNA und RNA durch photometrische Analyse

Die Quantität und Qualität von Nukleinsäuren in wässrigen Lösungen wurde photometrisch im Spektralphotometer bestimmt. Reine DNA und RNA zeigen neben dem Absorptionsmaximum bei 260 nm ein Absorptionsminimum bei 230 nm Wellenlänge. Proteine hingegen haben bei 280 nm Wellenlänge ein Absorptionsmaximum. Der Quotient der Absorption (A)  $A_{260/280}$  sollte bei reinen Nukleinsäuren zwischen 1,8–2,0 liegen. Niedrigere Werte sind auf Verunreinigungen durch Proteine

zurückzuführen. Der Quotient  $A_{260/230}$  hingegen ist ein Indikator für Pufferverunreinigungen oder eine Kontamination mit anderen niedermolekularen Substanzen (z.B. organische Stoffe, Antibiotika etc.). Die photometrische Quantifizierung von Nukleinsäuren wurde mit dem *Eppendorf BioPhotometer* (Eppendorf AG, Hamburg) durchgeführt.

## 2.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, „polymerase chain reaction“) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Vervielfältigung von DNA unter Verwendung hitzestabiler DNA-Polymerasen sowie zweier Oligonukleotide (Primer), die zu je einem Abschnitt der DNA komplementär sind (Mullis & Faloona, 1987). Die Polymerase-Kettenreaktion wurde zur Amplifikation von DNA- und cDNA-Fragmenten verwendet. In der Regel wurden 100 ng „Template“ (Matrize) mit je 10 pMol der beiden Primer und 0,1–0,2 µl (5 U/µl) Polymerase verwendet. Diese wurden mit 2,5 µl 10x PCR-Puffer, 0,5 µl Desoxynukleotiden (2,5 mM je Nukleotid) und Wasser auf ein Reaktionsvolumen von 25 µl gebracht. Nach Denaturierung des PCR-Ansatzes (3 Min., 94°C) wurden 35 Zyklen aus Denaturierung (15 Sek., 94°C), Anlagerung der Primer („annealing“, 10 Sek., 48–68°C) und Polymerisation (0,5–2 Min., 72°C) durchlaufen. Die Anlagerungstemperatur richtet sich nach den Schmelzpunkten der beiden verwendeten Oligonukleotide, die Zeit für die Polymerisation nach der Länge des Amplikons, wobei Polymerasen etwa 500–1.000 Bp pro Minute polymerisieren können. Zur Erhöhung der Spezifität des entstehenden Produkts wurde in den meisten Fällen eine sogenannte „touchdown“-PCR-Reaktion durchgeführt. Hierbei wurde die Anlagerungstemperatur anfangs hoch gewählt, z.B. 62°C, und dann zweimal, nach je drei Zyklen, um 2°C gesenkt, sodass sich bei den restlichen Zyklen eine Anlagerungstemperatur von z.B. 60°C und 58°C ergab. Die Pufferbedingungen wurden gemäß den Herstellerempfehlungen gewählt. Die Reaktionen wurden in einem *PTC-200 Thermocycler* der Firma MJ Research (Waltham, MA, USA) durchgeführt.

### Standard-PCR-Ansatz:

DNA (100 ng/µl)	1,0 µl
10xPCR-Puffer (15 mM MgCl <sub>2</sub> )	2,5 µl
Primer Fw (10 µM)	1,0 µl
Primer Rev (10 µM)	1,0 µl
dNTPs (10 mM)	0,5 µl
DNA-Polymerase (5 U/µl)	0,1 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	18,9 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25,0 µl</b>

## 2.8 Agarosegelelektrophorese

Die Überprüfung von PCR-Produkten und Restriktionsspaltungen von PCR-Produkten sowie Fosmid-Klonen erfolgte durch Agarosegelelektrophorese. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosekonzentrationen von 0,8–2% (w/v) gewählt. Die Agarose wurde in 1xTris-Borat-EDTA (TBE)-Puffer aufgekocht, auf etwa 50°C abgekühlt und in einen geeigneten Gelträger mit eingesetzten Probenkammern gegossen. Die DNA-Proben wurden mit ~1/4 Volumen DNA-Ladepuffer versetzt und



in die Geltaschen überführt. Als Größenstandard dienten DNA-Standard-Marker. Die Elektrophorese erfolgte bei 10–15 V/cm. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einem Ethidiumbromidbad inkubiert. Ethidiumbromid ist ein fluoreszierender Farbstoff und interkaliert in die DNA, sodass nach Anregung mit UV-Licht (254 nm) die DNA durch die resultierende Fluoreszenz nachgewiesen werden kann.

## 2.9 Aufreinigung von PCR-Produkten

### DNA-Isolierung mittels Silica-basierter Anionenaustauscher

Für die DNA-Aufreinigung wurde z.T. der *JETquick Spin Kit* (Genomed, Löhne) den Angaben des Herstellers entsprechend, nach dem Prinzip der DNA-Immobilisierung an einer Silicagel-Matrix mit nachfolgender Elution mit HPLC-Wasser, durchgeführt.

### DNA-Isolierung mittels Ammoniumacetat-Präzipitation

Die amplifizierte DNA wurde vor der Sequenzierung einer Präzipitation mit Ammoniumacetat (4 M) und Ethanol, zum Entfernen der Oligonukleotide aus dem PCR-Ansatz, unterzogen. Zunächst wurde einem 25 µl PCR-Ansatz, zum vollständigen Hydratisieren der DNA, 1 Volumen HPLC-Wasser hinzugefügt und die DNA anschließend in 5 µl Ammoniumacetat und 300 µl absolutem Ethanol für 20 Min. bei 13.000 Upm zentrifugiert. Das Pellet wurde mit 400 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen, 10 Min. bei 13.000 Upm zentrifugiert, anschließend 10 Min. bei 37°C getrocknet und je nach Quantität in 15–30 µl HPLC-Wasser resuspendiert und bei –20°C gelagert.

## 2.10 DNA-Sequenzierung

DNA-Sequenzierungen erfolgten am Institut für Humangenetik nach der Didesoxy-Methode (Sanger *et al.*, 1977) mit dem *ABI Prism BigDye<sup>®</sup> Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (PE Applied Biosystems, Darmstadt) und dem Sequenzierungsgerät *ABI Prism 377 DNA Sequenzierer* (PE Applied Biosystems, Darmstadt). Das Prinzip der Methode beruht auf dem Einbau von fluoreszenz-markierten Didesoxynukleotiden in einer zyklischen DNA-Sequenzierung bei der nur ein Primer und ein zuvor generiertes spezifisches PCR-Produkt als Matrize verwendet werden. Didesoxynukleotide (ddNTPs) führen bei dieser Reaktion zum Kettenabbruch, sodass sich am 3'-Ende der polymerisierten DNA-Stränge stets ein fluoreszenzmarkiertes Nukleotid befindet. Die vier ddNTPs sind mit unterschiedlichen Fluorochromen konjugiert, die während einer Polyacrylamid (PAA)-Gelelektrophorese von einem Laser detektiert werden. Anhand der Länge der einzelsträngigen DNA-Fragmente, die sich jeweils um eine Base unterscheiden, und deren Fluoreszenzfarbe kann die Sequenz einer Probe ermittelt werden.

Die nach der Sequenzierungsreaktion vorliegenden Proben wurden nach einer Natriumacetat-Präzipitation (2.11) zunächst in 3,3 µl Ladebuffer bei 37°C für 15 Min. gelöst. Nun wurde eine Denaturierung bei 90°C für 1 Min., gefolgt von einer Inkubation auf Eis, durchgeführt. Auf das vorbereitete, im Sequenzierer installierte PAA-Gel wurde 1 µl der Sequenzierungsreaktion aufgetragen.

**Standard-Sequenzierungsansatz:**

DNA	5,0 µl
<i>BigDye</i> <sup>®</sup>	2,0 µl
Primer (10 µM)	1,0 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	2,0 µl
Gesamtvolumen	10,0 µl

**2.11 Aufreinigung von Sequenzierungsansätzen**

Nach der Sequenzierungsreaktion wurde dem 10 µl Ansatz 40 µl HPLC-Wasser zur vollständigen Hydratisierung der DNA hinzugefügt und anschließend in 3 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,2) und 100 µl absolutem Ethanol für 20 Min. bei 13.000 Upm zentrifugiert. Nachfolgend wurde das Pellet in 300 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen und erneut, wie beschrieben, zentrifugiert. Der Ethanol wurde quantitativ abgenommen, das Pellet für 10 Min. bei 37°C getrocknet und bis zur Vorbereitung für die elektrophoretische Auftrennung auf dem Sequenzierer (s. 2.10) bei -20°C gelagert.

**2.12 Amplifikation von genomischer DNA**

Um ausreichend DNA für die Mutationsanalysen verfügbar zu haben, wurde ggf. eine „whole genome amplification“ (WGA)-Reaktion mit dem *GenomiPhi*<sup>TM</sup> *DNA Amplification Kit* (Amersham Biosciences, Freiburg), nach den Angaben des Herstellers, durchgeführt. Um zunächst einzelsträngige DNA zu erzeugen, wurde 1 µl (>1 ng/µl) der Ausgangs-DNA für 3 Min. bei 95°C in 9 µl eines speziellen Puffers (Zusammensetzung nicht vom Hersteller angegeben) denaturiert und anschließend >1 Min. auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 1 µl der *Phi29*-DNA-Polymerase (Quantität nicht vom Hersteller angegeben) und 9 µl eines Reaktionspuffers (exakte Zusammensetzung nicht vom Hersteller angegeben), wurde die Amplifikation bei 30°C für 16–18 Std. durchgeführt. Die *Phi29*-DNA-Polymerase besitzt eine sehr hohe Prozessivität und zusätzlich „strand displacement“-Aktivität, sodass im Verlauf der Reaktion generierte DNA-Moleküle als Matrize dienen können. Dies führt zu einer beträchtlichen Amplifikation der Ausgangs-DNA (Dean *et al.*, 2001; Lasken & Egholm, 2003). Bei einer eingesetzten DNA-Menge von 10 ng kann auf diese Weise 4–7 µg DNA generiert werden.

**2.13 Restriktion von DNA**

Zur Qualitätskontrolle von Fosmid-DNA wurde ein Restriktionsverdau mit dem Enzym *EcoRI* durchgeführt (Smith & Birnstiel, 1976). Für die Bestätigung von Punktmutationen wurden einige PCR-Produkte einem Restriktionsverdau mit spezifischen Enzymen unterzogen. Restriktionsenzyme spalten DNA durch Hydrolyse des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats an spezifischen Erkennungssequenzen. Endonukleasen vom Typ II erkennen spezifische, palindromische DNA-Sequenzen aus 4–8 Nukleotiden und schneiden diese in Anwesenheit von MgCl<sub>2</sub>. Die enzymatische Hydrolyse von DNA wurde mit Enzymen von Promega (Mannheim) bzw. NEB (Frankfurt am Main) durchgeführt und die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsendonukleasen wurden den

Herstellerangaben entsprechend gewählt. Es wurde bei einem 20 µl Reaktionsvolumen 0,5–1 U Enzym pro µg DNA eingesetzt. Zur Analyse der DNA-Restriktion wurde die horizontale Agarosegelelektrophorese angewendet.

## 2.14 „Single-Strand Conformation Polymorphism“ (SSCP)-Analyse

Die SSCP-Methode basiert auf der unterschiedlichen Konformationsausbildung einzelsträngiger DNA-Moleküle, die sich in einem oder mehreren Nukleotiden unterscheiden (Orita *et al.*, 1989). Innerhalb der einzelsträngigen DNA kommt es nach Erhitzen und direkt anschließender Abkühlung zu einer stabilen intramolekularen Konformation. Die so Denaturierte DNA wird auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel (PAA-Gel) aufgetragen und unter Anlegen einer konstanten Spannung elektrophoretisch aufgetrennt. Die verschiedenen Konformationen der DNA-Einzelstränge führen zu einem spezifischen Laufverhalten und zeigen sich später als DNA-Banden im PAA-Gel. Bedingt durch die gewählte Größe des SSCP-Gels ist es möglich, sowohl die Einzelstrangbanden (im oberen Teil des Gels) als auch die Heteroduplexformationen (im unteren Teil des Gels) sichtbar zu machen. Die DNA-Einzelstränge werden während der Elektrophorese durch die Ausbildung globulärer Konformationen stärker, die DNA-Doppelstränge, da kompakter, schwächer im PAA-Gel retardiert. Die Einzelstrangformationen liefen wesentlich langsamer, wenn dem Gel Glycerin beigefügt wurde. Die Konformationen sind abhängig von der Komposition der Nukleotidsequenz. Bereits eine Basensubstitution kann durch ein verändertes Bandenmuster im Gel mit einer Spezifität von 60-90% detektiert werden (Gross *et al.*, 1999; Ravnik-Glavac *et al.*, 1994; Sarkar *et al.*, 1992). Eine Aussage über die Art der Mutation kann jedoch nicht getroffen werden. Zur genaueren Identifizierung muss nachfolgend die DNA-Sequenzanalyse (s. 2.10) herangezogen werden.

Es wurden zwei unterschiedliche nicht-denaturierende PAA-Gel-Zusammensetzungen verwendet.

<u>PAA-Gel (8%) mit Glycerin</u>		<u>PAA-Gel (8%)</u>
Glycerin (100%)	12,5 ml	-
ddH <sub>2</sub> O	67,5 ml	80,0 ml
Polyacrylamid/Bisacrylamid (30%)	33,0 ml	33,0 ml
10x TBE	12,5 ml	12,5 ml
APS (10%)	1,0 ml	1,0 ml
TEMED (~99%)	24,0 µl	24,0 µl
Gesamtvolumen	126,5 ml	126,5 ml

5–10 µl eines PCR-Produktes wurden mit 5 µl SSCP-Ladepuffer gemischt und 10 Min. bei 95°C denaturiert, anschließend auf Eis inkubiert und auf das PAA-Gel geladen. Die Elektrophorese erfolgte über einen Zeitraum von 10–14 Std. in 1 x TBE-Puffer bei 5–9 Watt (W) für 8%-ige (v/v) PAA-Gele und bei ~18 W für PAA-Gele mit Glycerin. Um die einzel- und doppelsträngigen Banden sichtbar zu machen, wurden die PAA-Gele, wie im Folgenden beschrieben, einer Silbernitratfärbung unterzogen.

- 5–10 Min. in 10%-igem Ethanol inkubiert, um das Gel zu fixieren
- 3 Min. in 1%-iger Salpetersäure inkubiert, um eine bessere Silbernitrat-Aufnahme zu gewährleisten
- 2 x mit bidest. H<sub>2</sub>O gespült
- 20 Min. in Silbernitratlösung inkubiert
- 2 x mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen
- Gel in Entwicklerlösung (Reduktionslösung) inkubiert, bis Silbernitrat ausfiel
- Entwicklerlösung abgesaugt und frische nachgefüllt
- Gel in der frischen Entwicklerlösung inkubiert, bis die einzel- und doppelsträngigen Banden sichtbar wurden
- 2 Min. in 10%-iger Essigsäure geschwenkt, um die Reaktion zu stoppen
- das Gel mit bidest. H<sub>2</sub>O gewaschen und anschließend in Plastikfolie eingeschweißt

## 2.15 cDNA-Synthese und Reverse Transkriptase (RT)-PCR

Für die Erstellung von „copy DNA“ (cDNA) wurde 1 µg Gesamt-RNA und *Omniscript*<sup>®</sup> Reverse Transkriptase (Qiagen, Hilden) oder *SuperScript III*<sup>™</sup> Reverse Transkriptase (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Vorschriften der Hersteller verwendet. Es dienten *Random Primers* (Invitrogen, Karlsruhe) oder genspezifische Oligonukleotide (GSO) (Sigma Genosys, Steinheim) als Primer für die cDNA-Synthese, die in einem Volumen von 20 µl durchgeführt wurde (Feinberg & Vogelstein, 1984; Haymerle *et al.*, 1986).

### Standard-cDNA-Syntheseansätze:

<u><i>Omniscript</i><sup>®</sup> Reverse Transkriptase</u>		<u><i>SuperScript III</i><sup>™</sup> Reverse Transkriptase</u>	
10x RT-Puffer <sup>#</sup>	2 µl	Dithiothreitol (100 mM)	1 µl
dNTPs (5 mM)	2 µl	5x RT-Puffer*	4 µl
Hexamere (100 µM) oder [GSO (10 µM)]	2 [0,2] µl	dNTPs (5 mM)	2 µl
<i>RNase</i> OUT (10 U/µl)	1 µl	Hexamere (25 µM) oder [GSO (10 µM)]	1 [0,2] µl
<i>Omniscript</i> <sup>®</sup> Reverse Transcriptase (4 U/µl)	1 µl	<i>RNase</i> OUT (40 U/µl)	1 µl
RNA (50 ng –2 µg)	variabel	<i>SuperScript III</i> <sup>™</sup> (200 U/µl)	1 µl
<i>RNase</i> freies H <sub>2</sub> O	variabel	RNA (50 ng –2 µg)	variabel
Gesamtvolumen	20,0 µl	<i>RNase</i> freies H <sub>2</sub> O	variabel
		Gesamtvolumen	20,0 µl

<sup>#</sup> Keine Herstellerangaben

\* [250 mM Tris-HCl (pH 8,4), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>]

Als Kontrolle der reversen Transkriptionsreaktion wurde eine RT-PCR mit spezifischen intronüberspannenden Primern für ein „housekeeping gene“ (Fumarat-Hydratase) mit 1 µl der synthetisierten cDNA durchgeführt. Es wurde dabei die *Advantage*<sup>®</sup> *cDNA Polymerase* (BD Biosciences, Heidelberg) nach den Angaben des Herstellers verwendet.

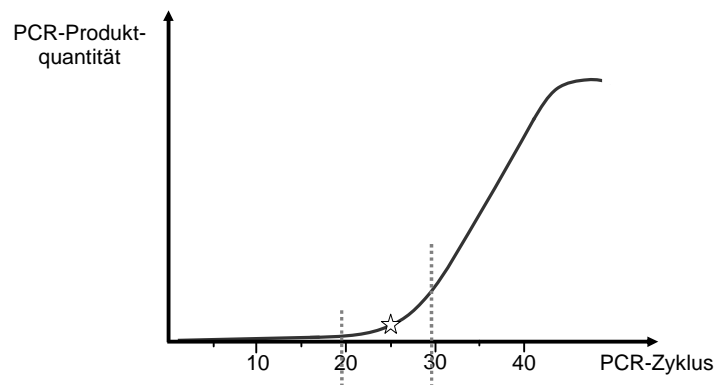
**Standard-RT-PCR-Ansatz:**

cDNA (50 ng/μl)	1,0 μl
10x RT-PCR-Puffer*	2,5 μl
Primer Fw (10 μM)	1,0 μl
Primer Rev (10 μM)	1,0 μl
dNTPs (10 mM)	0,5 μl
<i>Advantage</i> <sup>®</sup> <i>cDNA Polymerase</i> *	0,1 μl
HPLC-H <sub>2</sub> O	18,9 μl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25,0 μl</b>

\* Keine Zusammensetzung und Mengenangaben vom Hersteller angegeben

**2.16 Semiquantitative RT-PCR**

Für semiquantitative Expressionsanalysen wurden RT-PCRs durchgeführt. Zu Beginn wurde geprüft, ob das Amplikon des „gene of interest“ aus 1 μl der zuvor hergestellten cDNA amplifiziert werden konnte. War dies möglich, wurden zunächst die RT-PCR-Bedingungen für die „gene of interest“-Amplikons mit Kontroll-cDNA etabliert. Um nun mögliche Unterschiede der Transkriptmengen und somit Expressionsunterschiede nachzuweisen, wurde eine RT-PCR in der frühen exponentiellen Phase abgebrochen (Abb. 5).



**Abb. 5: Schematische Darstellung des Reaktionsverlaufs einer RT-PCR**

Die Elongationszykluszahl ist auf der X-Achse, die relative PCR-Produktmenge auf der Y-Achse aufgetragen. Die exponentielle Amplifikationsphase ist durch gestrichelte Linien gekennzeichnet. Ein Messpunkt in der exponentiellen Phase ist durch einen Stern dargestellt.

Unter optimalen Bedingungen befindet sich die Amplifikation der PCR-Produkte zwischen dem 20. und 30. Zyklus in der exponentiellen Phase und ist daher sensitiv für die Menge des Ausgangsmaterials. Nachfolgend wurde eine Agarosegelelektrophorese und die densitometrische Messung der PCR-Produktbanden in einem Ethidiumbromid gefärbten Gel für eine Quantifizierung der amplifizierten cDNA durchgeführt. Die durch densitometrische Messungen ermittelten Optische-Dichte (OD)-Werte der „gene of interest“-Amplikons, wurden durch Bildung des Verhältnisses zu den OD-Werte der Fumarat-Hydratase-spezifischen Amplikons normalisiert und somit Unterschiede der cDNA-Quantität und/oder -Qualität berücksichtigt. Zunächst wurde das arithmetische Mittel und die Standardabweichung berechnet. Um die Variabilität der Expressionswerte beurteilen zu können,

wurde zudem der Variationskoeffizient, definiert als die relative Standardabweichung, (d.h. die Standardabweichung dividiert durch das arithmetische Mittel), berechnet. Für die densitometrischen Messungen wurde das Programm ImageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html>) verwendet.

## 2.17 Quantitative real-time PCR (qRT-PCR)-Analysen

Die qRT-PCR ist ein hochempfindliches Verfahren zur RNA-Quantifizierung, bei dem die Expression von Genen gleichzeitig und mit großer Präzision analysiert werden kann. Diese Methode basiert auf der Quantifizierung der im Verlauf der Reaktion polymerisierten DNA-Moleküle (<250 Bp), die durch den spezifisch an doppelsträngige DNA bindenden Farbstoff „SYBR-Green“ detektiert werden kann (Morrison *et al.*, 1998). Der Farbstoff „SYBR-Green“ interkaliert in doppelsträngige DNA-Moleküle und der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert blaues Licht bei  $\lambda_{\max} = 498$  nm und emittiert grünes Licht bei  $\lambda_{\max} = 522$  nm. Durch die kontinuierlich „online“ aufgezeichneten Emissions-Fluoreszenzintensitäten wurde der Verlauf der qRT-PCR dokumentiert.

Der „cycle threshold“ (Ct)-Wert beschreibt den Zyklus, bei dem die Fluoreszenz der Probe einen festgelegten Schwellenwert (engl. threshold) überschreitet. Der Schwellenwert sollte so gewählt werden, dass er möglichst nahe an den Signalen der Hintergrundfluoreszenz liegt, damit die Messungen im exponentiellen Amplifikationsbereich der qRT-PCR erfolgen. Nur so kann ein exakter Rückschluss auf die Menge der Ausgangs-cDNA gezogen werden. Die qRT-PCR-Analysen wurden in einem Gesamtvolumen von 20  $\mu$ l vollzogen. Es wurden 10  $\mu$ l SYBR<sup>®</sup> Green Jump Start<sup>™</sup> Taq ReadyMix<sup>™</sup> (Sigma, Taufkirchen), jeweils 8 pMol der genspezifischen, intronüberspannenden Primer, 3  $\mu$ l einer 1:5 Verdünnung der cDNA und HPLC-Wasser verwendet. Die Reaktion wurde mit dem Rotorgene-3000 (Corbett Research, Sydney, Australien) durchgeführt. Die Rohdaten der qRT-PCRs wurden durch das Computerprogramm „Rotorgene 6.0“ (Corbett Research, Sydney, Australien) ermittelt. Es wurde folgendes Programm für die qRT-PCRs verwendet:

<b>qRT-PCR-Programm:</b>	95°C,	5 Min.	
	95°C,	15 Sek.	← 35 x
	58°C,	10 Sek.	
	72°C,	20 Sek.	
	72°C–95°C	in 1°C Schritten von jeweils 5 Sek.	

### Standard-qRT-PCR-Ansatz:

cDNA (10 ng/ $\mu$ l)	3,0 $\mu$ l
Primer Fw (10 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ l
Primer Rev (10 $\mu$ M)	0,8 $\mu$ l
SYBR <sup>®</sup> Green Jump Start <sup>™</sup> Taq ReadyMix <sup>™</sup> *	10,0 $\mu$ l
HPLC-H <sub>2</sub> O	5,4 $\mu$ l
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>20,0 <math>\mu</math>l</b>

\* 20 mM Tris-HCl, pH 8,3, 100 mM KCl, 7 mM MgCl<sub>2</sub>, 1,6 mM dNTPs, 0,05U/ml Taq DNA-Polymerase, JumpStart Taq Antikörper und SYBR Green I

### 2.17.1 Effizienztest der qRT-PCR-Analysen

Die Effizienzen der qRT-PCRs wurden mit Hilfe von Verdünnungsreihen (0,01, 0,1, 0,75, 1, 10 bzw. 100 ng), einer Standard-cDNA durchgeführt (Rasmussen, 2001). Dabei ist die cDNA-Quantität, angegeben in ng, bezogen auf die eingesetzte Gesamt-RNA-Menge in der reversen Transkriptionsreaktion. Folgende Betrachtungen wurden angewandt (Handbuch: RotorGene 2000 RealTime, Amplifikation version 6.0.14, Corbett-Research):

Die Änderung im Ct-Wert dividiert durch die Änderung in der Kopienzahl ergibt die Steigung ( $m$ ) der Standardkurve ( $y = mx + b$ ). Die Steigung einer Reaktion wird für die Bestimmung der exponentiellen Amplifikation und der Reaktionseffizienz verwendet.

$$\text{Reaktionseffizienz (E)} = 10^{-1/m} - 1$$

Im Idealfall beträgt die Steigung der Standardkurve:  $m = -3,322$

Die berechnete Reaktionseffizienz (E) beträgt dann:  $[10^{-(1/-3,322)}] - 1 = 1$  (100%)

Daraus resultiert ein Amplifikationswert von:  $10^{(-1/-3,322)} = 2$

Eine Steigung  $m$  von  $-3,32$  ergibt somit eine Effizienz von 100%, die Steigung von  $-3,58$  eine Effizienz von 90%. Bei einer Reaktionseffizienz von 100% findet im PCR-Verlauf in jedem Zyklus vor der Plateauphase eine Verdoppelung des Amplifikats statt. Die verwendete Rotorgene-Software ermittelte die  $R^2$ -,  $R$ -,  $m$ - und  $b$ -Werte der Standardkurve. Der  $R^2$ -Wert (Korrelationskoeffizient) gibt einen hypothetischen prozentualen Wert an, nach dem die Standards eine Standardkurve bilden. Wenn  $R^2$  klein ist, passen die verwendeten Standards nicht in eine Linie, die Werte sind dann nicht verlässlich. Ein guter  $R^2$ -Wert sollte bei 0,99 liegen.

### 2.17.2 Relative Expressionsniveau-Quantifizierung – die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode

Hatten die Effizienztests für beide qRT-PCRs, internes Referenzgen und „gene of interest“, annähernd gleiche Reaktionskoeffizienten (E) ergeben, wurde zur relativen mRNA-Bestimmung die von der Firma Perkin Elmer/Applied Biosystems entwickelte „comparative  $\Delta\Delta\text{Ct}$  methode“ angewendet (Livak & Schmittgen, 2001). Um ein Referenzgen mit gleicher qRT-PCR-Effizienz zum „gene of interest“ Amplikon für die Expressionsanalysen verfügbar zu haben, wurden jeweils zwei Gene aus den Bereichen Metabolismus [*GAPDH* (Glyceraldehyd 3-Phosphatdehydrogenase) und *HPRT* (Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase)] Transkriptionsregulation [*TBP* (TATA-Box bindendes Protein) und *RPII* (RNA-Polymerase II)] und Strukturproteine [*TUBA1A* (Tubulin  $\alpha$  1a) und *ACTB* (Aktin  $\beta$ )] ausgewählt und die Reaktionseffizienzen bestimmt (Radonic *et al.*, 2004). Für die Effizienzberechnung wurden zunächst die Ct-Werte des Zielgens von denen des Referenzgens subtrahiert (1. Schritt). Dadurch werden cDNA-Quantitäts- und Qualitätsunterschiede der jeweiligen Proben ausgeglichen. Um den  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Wert zu erhalten wurde eine Subtraktion der  $\Delta\text{Ct}$ -Werte von dem

Kalibrator- $\Delta\text{Ct}$ -Wert (eine Kontrollprobe) durchgeführt (2. Schritt). Nachfolgend wurde durch Anwendung der Formel  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$  ein absoluter Wert, der  $2^{-\Delta\text{Ct}}$ -Wert, berechnet (3. Schritt).

$$\mathbf{1. Schritt: \quad \Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{Zielgen}} - \text{Ct}_{\text{Referenzgen}}$$

$$\mathbf{2. Schritt: \quad \Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} - \Delta\text{Ct}_{\text{Kalibrator}}$$

$$\mathbf{3. Schritt: \quad 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}}$$

Die so berechneten Werte geben die relative Kopienzahl des Zielgentranskripts im Verhältnis zum Kalibratortranskript an.

## 2.18 Klonierung von PCR-Produkten

PCR-Produkte wurden in den Vektor *pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO* des *TOPO TA Cloning<sup>®</sup> Kit* (Invitrogen, Karlsruhe) nach den Angaben des Herstellers kloniert. *Taq*-Polymerase weist eine matrizenunabhängige terminale Transferaseaktivität auf, die am synthetisierten DNA-Strang einen Adenin-Überhang an das 3'-Ende anfügt. *pCR<sup>®</sup>2.1-TOPO* Vektoren liegen linearisiert vor und weisen einen Thymin-Überhang am 3'-Ende auf. Daher sind sie für das Klonieren von *Taq*-Polymerase PCR-Produkten gut geeignet. Die Ligation des PCR-Produktes erfolgte über die *Topoisomerase I*, welche an dem Thymin-Überhang des Vektors gebunden ist und nach der Ligation frei wird. Durch eine *E.coli* Transformation (s. 2.19) wurden die klonierten DNA-Fragmente vereinzelt und nach der Isolierung der Plasmid-DNA einer Sequenzanalyse (s. 2.10) unterzogen.

## 2.19 Transformation chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen

Für die Transformation von *E.coli* (Hanahan, 1983) wurden kompetente *OneShot<sup>®</sup>TOP10*-Zellen auf Eis aufgetaut und pro Ansatz jeweils 100  $\mu\text{l}$  Bakteriensuspension mit 10 pg–100 ng DNA versetzt und leicht gemischt. Nach einer Inkubation von 30 Minuten auf Eis erfolgte ein Temperaturschock bei 42°C für 45 Sek., gefolgt von einer 2-minütigen Abkühlung auf Eis. Nach Zugabe von 250  $\mu\text{l}$  vorgewärmtem SOC-Medium wurde die Suspension unter Schütteln für 1 Std. bei 37°C inkubiert und dann auf selektiven LB-Agarplatten ausplattiert.



### 3. Molekularzytogenetische Methoden

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

Für die Quantifizierung wurden isolierte Fosmid-Klone einem Restriktionsverdau und nachfolgend einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Anschließend erfolgte eine „nick translation“-Markierungsreaktion der Fosmid-Klone.

##### „nick translation“-Ansatz:

Nuklease-freies H <sub>2</sub> O	2,75–6,75 µl
Fosmid-Klon DNA (~500 ng)	2,0–6,0 µl
Spektrum Grün dUTPs (0,2 mM)	1,25 µl
dTTP (0,1 mM)	2,5 µl
dNTP Mix (0,1 mM)	5,0 µl
10x „nick translation“-Puffer*	2,5 µl
„nick translation“-Enzym <sup>#</sup>	5,0 µl
<b>Gesamtvolumen</b>	<b>25,0 µl</b>

\* 500 mM Tris-HCl, pH 7,2, 100 mM MgSO<sub>4</sub>, 1 mM DTT, <sup>#</sup> DNA-Polymerase I, DNase I in 50%-igem Glycerol, 50 mM Tris-HCl, pH7,2, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,1 mM DTT, 0,5 mg/ml Nuklease freies BSA.

Der Ansatz wurde kurz gemischt und für 2–4 h bei 15°C inkubiert. Zum Abstoppen der Reaktion wurde der Ansatz für 10 Min. auf 70°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Nun wurde der Probe 3 µl Natriumacetat (3M), 4 µl humane *Cot-1*-DNA (Invitrogen, Karlsruhe), 0,5 µl Lachssperma-DNA (Sigma, Taufkirchen) und 60 µl Ethanol (100%) zugesetzt, kurz gemischt und bei –20°C für 1 Std. inkubiert. Der Ansatz wurde dann für 20 Min. bei 4°C und 13.000 Upm zentrifugiert, der Überstand dekantiert und das Pellet zweimal mit 250 µl 70% (v/v) Ethanol gewaschen. Das Pellet wurde nun luftgetrocknet, anschließend die DNA in 12 µl Hybridisierungspuffer resuspendiert, für 10 Min. bei 95°C denaturiert und einer kompetitiven Hybridisierung durch die *Cot-1*-DNA bei 37°C für 90 Min. unterzogen. Die zu verwendenden, mit Zellsuspension betropften Objektträger wurden für 5 Min. in 2x SSC und anschließend 10 Min. in 70% (v/v) Ethanol, gefolgt von 5 Min. in 80% (v/v) Ethanol und dann 5 Min. in 95% (v/v) Ethanol bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Die Objektträger wurden anschließend bei RT getrocknet. Nun wurden die Objektträger in einer 70% (v/v) Formamid/2x SSC-Lösung bei 68–72°C für 3 Min. und nachfolgend in eiskaltem 2x SSC-Puffer für 5 Min. bei RT inkubiert. Sodann wurden die Objektträger analog zur ersten Dehydratisierung in einer Ethanolreihe mit aufsteigender Konzentration für jeweils 2 Min. bei RT inkubiert und anschließend bei RT getrocknet. Nun wurde der Fluoreszenz-markierte DNA-Ansatz (12 µl) auf den Objektträger getropft und mit einem Deckglas, welches mit Fixogum (Marabuwerke, Tamm) luftdicht abgedichtet wurde, überschichtet. Die Objektträger wurden dann über Nacht in einer Feuchtekammer inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Deckglas vorsichtig entfernt und der Objektträger in 2x SSC für 5 Min. bei RT, dann für einige Sekunden in einer 50% (v/v) Formamid/2x SSC-Lösung bei 42–45°C, gefolgt von 5 Min. in 2x SSC/0,1% Tween bei RT inkubiert. Die Chromosomen wurden für 5 Min. mit DAPI gefärbt. Anschließend wurden die Objektträger für 5 Min. in Wasser bei RT und anschließend zur Verstärkung der Hybridisierung in „mounting medium“ inkubiert.

## **4. Zellbiologische Methoden**

### **4.1 Allgemeine Kulturbedingungen**

Die verwendeten humanen lymphoblastoiden Zellen und primären humanen Fibroblasten wurden in Begasungsbrutschränken bei 37°C, 95% relativer Feuchte und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen durchgeführt. Primäre humane Fibroblasten wurden als Adhäsionskulturen auf Polystyrol-Zellkulturschalen (T-25 und T-75) (Sarstedt, Nümbrecht) gehalten. Lymphoblastoide Zellen wurden als Suspensionskultur in Kulturflaschen (T-25 und T-75) (Sarstedt, Nümbrecht) kultiviert. Für die Kultivierung primärer humaner Fibroblasten wurde F-10 Medium (+L-Glutamin) (Gibco, Karlsruhe), welches mit 20% fötalem Rinderserum (FBS) (Gibco, Karlsruhe) (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) supplementiert war, verwendet. Die lymphoblastoiden Zellen wurden in RPMI 1640 Medium (+L-Glutamin) (Gibco, Karlsruhe), welches mit 20% FBS (Gibco, Karlsruhe) (v/v) und 1% Penicillin/Streptomycin (v/v) supplementiert war, kultiviert.

### **4.2 Passagieren von primären humanen Fibroblasten**

Für die kontinuierliche Kultivierung wurden die primären humanen Fibroblasten bei einer Konfluenz von ca. 90% zunächst mit 5 ml 1x PBS-Puffer gewaschen, dann mit 2 ml 10x Trypsin-EDTA (0,5%) (Gibco, Karlsruhe) behandelt und nach dem vollständigen Ablösen von der Polystyrolmatrix in 10 ml F10-Kulturmedium aufgenommen und auf zwei neue Kulturflaschen verteilt.

### **4.3 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Die verwendeten Zellen wurden bei -150°C gelagert und bei Bedarf wieder aufgetaut. Zum Einfrieren wurden Fibroblasten zunächst mittels Trypsin/EDTA in Suspension gebracht, die Trypsinreaktion durch Zugabe von Vollmedium gestoppt und die Zellen durch Zentrifugation (5 Min., 1.000 Upm, RT) pelletiert. Lymphoblastoide Zellen wurden direkt durch Zentrifugation (5 Min., 1.000 Upm, RT) pelletiert. Das Zellpellet wurde in Einfriermedium resuspendiert, sodass eine Konzentration von ~10<sup>6</sup> Zellen/ml vorlag. Diese Zellsuspension wurde in 2 ml Kryoröhrchen aliquotiert und in einem Styroporbehälter, der einen langsamen Einfriervorgang ermöglichte, für 1–3 Tage bei -80°C deponiert und danach in die Langzeitlagerung (-150°C) überführt. Zum Auftauen von Zellen wurden die gefrorenen Aliquots in einem 37°C Wasserbad erwärmt und unmittelbar nach dem Auftauen 10 ml Vollmedium hinzugefügt und für 2 Min. bei 1.000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet erneut in Vollmedium aufgenommen und in Kulturgefäße überführt.

### **4.4 Synchronisierung von Zellen**

Zunächst wurden die lymphoblastoiden Zellen durch Zentrifugation (2 Min. bei 1.000 Upm) pelletiert und anschließend die Konzentration durch Zählen bestimmt. Nun wurde durch Verdünnung mit frischem Medium eine Konzentration von 3 x 10<sup>5</sup> Zellen/ml in einem Gesamtvolumen von 20 ml

hergestellt. Bei der Behandlung der Zellen durch FBS-reduziertes bzw. FBS-freies Medium kommt es zum Mangel von Wachstumsfaktoren, wodurch die Zellen in der G<sub>0</sub>-Phase arretiert werden. Für die Synchronisierung durch FBS-Entzug wurden  $6 \times 10^6$  Zellen für 30 Std. in RPMI-Medium mit 1% FBS (v/v) und anschließend für 18 Std. in RPMI-Medium ohne FBS kultiviert (modifiziert nach Berman *et al.*, 1978). Alternativ wurde die Synchronisierung mit einem doppelten Thymidinblock durchgeführt (Merril, 1998). Dabei wurde durch einen hohen Thymidingehalt im Medium eine Akkumulation von Thymidintriphosphat bewirkt, welches zu einer allosterischen Inhibierung der Ribonukleotidreduktase führt und einen Mangel von Cytidindiphosphat nach sich zieht. Dies bedingt eine Unterversorgung der Zellen mit Desoxycytidintriphosphat an der Replikationsgabel und führt zu einer Anreicherung der Zellen in der G<sub>1</sub>/S-Phase. Es wurden  $6 \times 10^6$  Zellen für 8 Std. mit Thymidin (2,5 mM) inkubiert, anschließend in Medium gewaschen und für 10 Std. unter normalen Bedingungen kultiviert. Nun erfolgte der zweite Thymidinblock, analog zum ersten, ebenfalls durch Thymidinzugabe (2,5 mM) für 8 Std. Nachfolgend wurden die Zellen in Medium gewaschen und vor der RNA-Isolierung für 1 Std. unter Standardbedingungen kultiviert (Chiurazzi *et al.*, 1998; Sleiman & Stewart, 2000).

## 5. Genbank-Einträge, Computerprogramme und Datenbanken

### 5.1 Genbank-Einträge der analysierten Gene

Gen	Exons	Genbank Accession No.
<i>ACTR8</i>	13	NM_022899
<i>ARHGEF3</i>	10	NM_019555
<i>CACNA2D3</i>	38	NM_018398
<i>CCDC66</i>	18	NM_001012506
<i>CHDH</i>	7	NM_018397
<i>C3orf63</i>	15	NM_015224
<i>DKK1</i>	4	NM_012242
<i>DKK2</i>	4	NM_014421
<i>DKK3</i>	8	NM_001018057
<i>DKK4</i>	4	NM_014420
<i>ERC2</i>	16	NM_015576
<i>FZD2</i>	1	NM_001466.2
<i>FZD5</i>	2	NM_003468.2
<i>FZD7</i>	1	NM_003507.1
<i>IL17RB</i>	11	NM_018725, NM_172234
<i>LRTM1</i>	3	NM_020678
<i>ROR2</i>	9	NM_004560
<i>SELK</i>	5	NM_021237
<i>WNT5A</i>	5	NM_003392
<i>WNT10B</i>	5	NM_003394.2

## 5.2 Datenbanken

Name	Daten (Web Adresse)
National Center for Biotechnology Information (NCBI)	Genom-Sequenzen, RNA-Sequenzen, BAC-Klonsequenzen, physikalische Darstellung der Organisation des Genoms. ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a> )
University of California, Santa Cruz (UCSC)	Genom-Sequenzen, RNA-Sequenzen, BAC- und Fosmid-Klonsequenzen, graphische Darstellung der Organisation des Genoms. ( <a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a> )
The European Bioinformatics Institute and Genome Research (Ensembl)	Genom-Sequenzen, RNA-Sequenzen, physikalische Darstellung der Organisation des Genoms, Darstellung bekannter Variationen (SNPs) in genomischer DNA. ( <a href="http://www.ensembl.org/index.html">http://www.ensembl.org/index.html</a> )

## 5.3 Computerprogramme

Name	Funktion (Hersteller)
ABI Prism™ 377 XL Collection	Steuerung sowie Gel- und Sequenzauswertung des ABI 377 Sequenzierers. (Applied Biosystems)
Rotor-Gene 6.0	Steuerungs- und Auswertungs-Software für quantitative real-time PCRs mit dem Rotor-Gene 3000. (Corbett Research)
Sequence Pilot 2.3	Auswertung von DNA-Sequenzelektropherogrammen. (JSI GmbH, Medical Systems)
EditSeq	Editieren von DNA-Sequenzen. (Dnastar)
SeqMan	Homologievergleiche multipler Sequenzen. (Dnastar)
MapDraw	Ermittlung von Restriktionsschnittstellen in DNA-Sequenzen sowie Ermittlung der abgeleiteten Aminosäuresequenz einer cDNA- bzw. RNA-Sequenz. (Dnastar)

## 5.4 „Online“-Computerprogramme

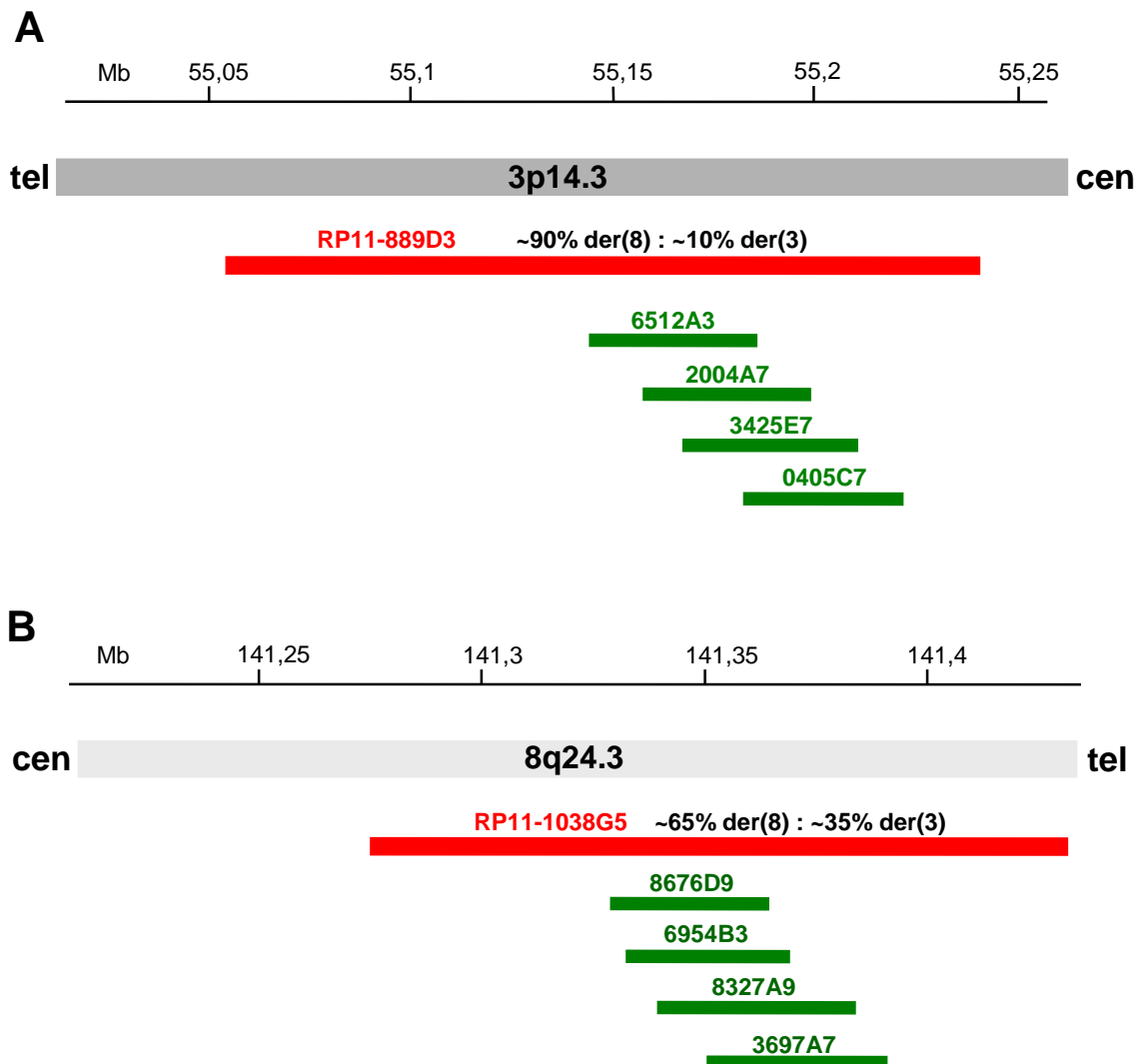
Name	Funktion (Web Adresse)
Primer3	Ableiten von Oligonukleotiden aus DNA-Sequenzen. ( <a href="http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3">http://frodo.wi.mit.edu/cgi-bin/primer3</a> )
In-silico PCR (UCSC)	Computeranalyse der Spezifität eines Primer-Paars. ( <a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgPcr</a> )
Oligo Calculator	Berechnung der Oligonukleotid-Eigenschaften wie GC-Gehalt, Schmelzpunkt, Neigung zur Bildung von Sekundärstrukturen und Dimeren. ( <a href="https://www.sigmaaldrich.com">https://www.sigmaaldrich.com</a> )

Name	Funktion (Web Adresse)
Repeat Masker	Identifizierung und Maskierung von eingestreuten (interspersed) Sequenzelementen und DNA-Bereichen mit geringer Komplexizität. ( <a href="http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/">http://woody.embl-heidelberg.de/repeatmask/</a> )
Genetic Information Research Institute (GIRI)	Identifizierung und Maskierung von Repetitiven Elementen in DNA-Sequenzen. ( <a href="http://www.girinst.org/repbase/update/index.html">http://www.girinst.org/repbase/update/index.html</a> )
Basic Local Alignment Search Tool (BLAST)	Homologievergleich von DNA- bzw. Aminosäuresequenzen. ( <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/</a> )
Basic Local Alignment Tool (BLAT)	Anzeige der genomischen DNA-Sequenz eines Gens durch Einspeisung der mRNA-Gen-Sequenz. ( <a href="http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat">http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat</a> )
Pairwise FLAG version Web 0.3 (Fast Local Alignment for Gigabases)	Identifizierung und Lokalisation von homologen DNA-Sequenzabschnitten zweier Sequenzen und graphische Darstellung. ( <a href="http://bioinformatics.itri.org.tw/prflag/prflag.php">http://bioinformatics.itri.org.tw/prflag/prflag.php</a> )
UTRscan	Identifizierung von funktionellen Elementen der untranslatierten Regionen (UTR) eines Gens. ( <a href="http://www.ba.itb.cnr.it/BIG/UTRScan/">http://www.ba.itb.cnr.it/BIG/UTRScan/</a> )
Neural Network Promoter Prediction (Berkeley Drosophila Genome Project)	Erkennung und Voraussage von eukaryotischen Promotorsequenzen. ( <a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html</a> )
Promoter 2.0 Prediction (Center for Biological Sequence Analysis, CBS)	Erkennung und Voraussage von <i>PoIII</i> -Promotorsequenzen in Vertebraten DNA. ( <a href="http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/">http://www.cbs.dtu.dk/services/Promoter/</a> )
Splice Site Prediction by Neural Network (Berkeley Drosophila Genome Projekt)	Erkennung und Voraussage von Spleißstellen. ( <a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a> )
GENIO/splice Splice Site and Exon Prediction in Human Genomic DNA	Erkennung und Voraussage humaner Spleißstellen. ( <a href="http://www.biogenio.com/splice/">http://www.biogenio.com/splice/</a> )
ImageJ	Bildbearbeitung und Bildverarbeitung. ( <a href="http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html">http://rsb.info.nih.gov/ij/download.html</a> )

## VI. Ergebnisse

### 1. Vorarbeiten: Identifizierung von bruchpunktüberspannenden BAC- und Fosmid-Klonen bei einer balancierten 3;8-Translokation in den Regionen 3p14.3 und 8q24.3

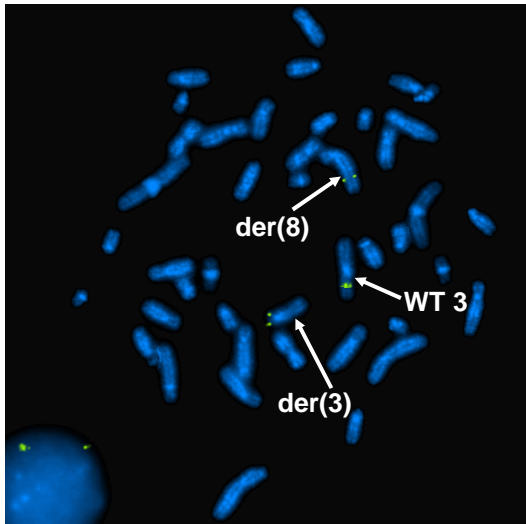
Nach der relativ groben Eingrenzung der beiden Translokationsbruchpunkte in 3p21.1 und 8q24.3 auf etwa 1,5 Mb führte Frau Dr. Margarita Stefanova serielle FISH-Analysen mit BAC-Klonen durch und identifizierte einen den Bruchpunkt überspannenden spezifischen Chromosom 3 BAC-Klon, RP11-889D3, welcher Fluoreszenzsignalintensitäten von etwa 10% auf dem derivativen Chromosom 3 und etwa 90% auf dem derivativen Chromosom 8 ergab (Abb. 6A). Hierdurch gelang die Feinkartierung des Bruchpunktes in der Region 3p14.3. Des Weiteren konnte ein bruchpunktüberlappender Chromosom 8-spezifischer BAC-Klon, RP11-1038G5, gefunden werden, der Fluoreszenzsignalintensitäten von etwa 65% auf dem derivativen Chromosom 8 und 35% auf dem derivativen Chromosom 3 erbrachte (Abb. 6B). Die beiden Bruchpunkte konnten so jeweils auf einen Bereich von ~50 Kb eingegrenzt werden. Für die Feinkartierung der eingegrenzten Bruchpunktregionen wurden im weiteren Verlauf anhand einer physikalischen Karte Fosmid-Klone ausgewählt (Abb. 6A und B). Dabei wurden die Fosmid-Klone so gewählt, dass sie in den Bereichen der BAC-Inserts lokalisiert waren, die durch FISH-Analysen als putative Bruchpunktregionen identifiziert worden waren. Zudem wurde auf ein Überlappen der Fosmidinserts geachtet, um durch mögliche „split signals“ dieser Sonden den Bruchpunkt auf wenige Kb eingrenzen zu können. Der Übersichtlichkeit halber wurde die Bezeichnung der Fosmid-Klone im weiteren Verlauf abgekürzt. Auf die Anfangsbezeichnung „G248P8“ wurde verzichtet, und es wurden jeweils nur die darauf folgenden Kennziffern angegeben.



**Abb. 6: Schematische Darstellung der physikalischen Lokalisation bruchpunktüberspannender BAC-Klone mit den Hybridisierungseigenschaften und die ausgewählter Fosmid-Klone in der Region 3p14.3 bzw. 8q24.3**

(A) Ein Ausschnitt aus der Region 3p14.3 bzw. (B) 8q24.3 ist jeweils durch einen dunkelgrauen bzw. hellgrauen Balken dargestellt, über welchem die Abstände in Megabasen (Mb) und die Orientierung von Centromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben sind. Die „split signal“ ergebenden BAC-Klone sind jeweils als rote Linie, die Fosmid-Klone als grüne Linien dargestellt. Die Fluoreszenzsignalintensitäten der BAC-Klone in der FISH sowie die Bezeichnungen der BAC- und Fosmid-Klone sind angegeben.

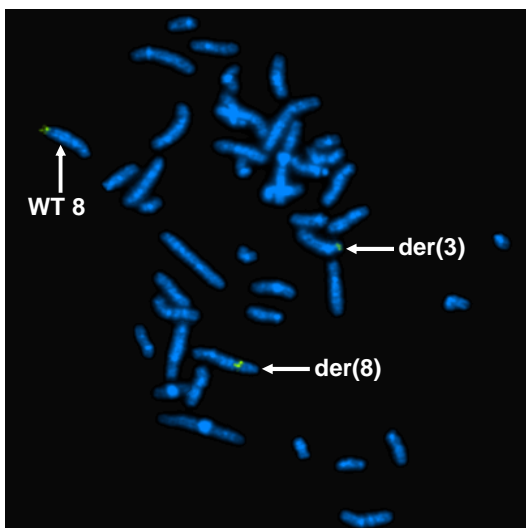
Die beiden aus der Bruchpunktregion 3p14.3 stammenden Fosmide 2004A7 und 3425E7 zeigten in der FISH „split signals“, wobei die Sonde 3425E7 Fluoreszenzsignalintensitäten von etwa 60% auf dem der(3) und etwa 40% auf dem der(8) ergab (Abb. 7 und Daten nicht gezeigt).



**Abb. 7: FISH-Analyse mit dem Fosmid 3425E7 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen einer 3;8-Translokationspatientin (Tochter)**

Die grün-fluoreszierende Fosmid-Sonde 3425E7 aus der Region 3p14.3 ergab auf dem Wildtyp-Chromosom 3 (WT 3), auf dem derivativen Chromosom 3 [der(3)] und dem derivativen Chromosom 8 [der(8)] Signale. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Fosmid 6512A3 hybridisierte auf dem der(8), also distal vom Bruchpunkt, und Fosmid 0405C7 auf dem der(3) und somit proximal vom Chromosom 3-Bruchpunkt. Die Fosmid-Sonden 6954B3 und 8327A9 aus der Bruchpunktregion 8q24.3 ergaben ebenfalls „split signals“, wobei Fosmid 6954B3 Fluoreszenzsignalintensitäten von ~70-80% auf dem der(8) und ~20-30% auf dem der(3) ergab (Abb. 8 und Daten nicht gezeigt).

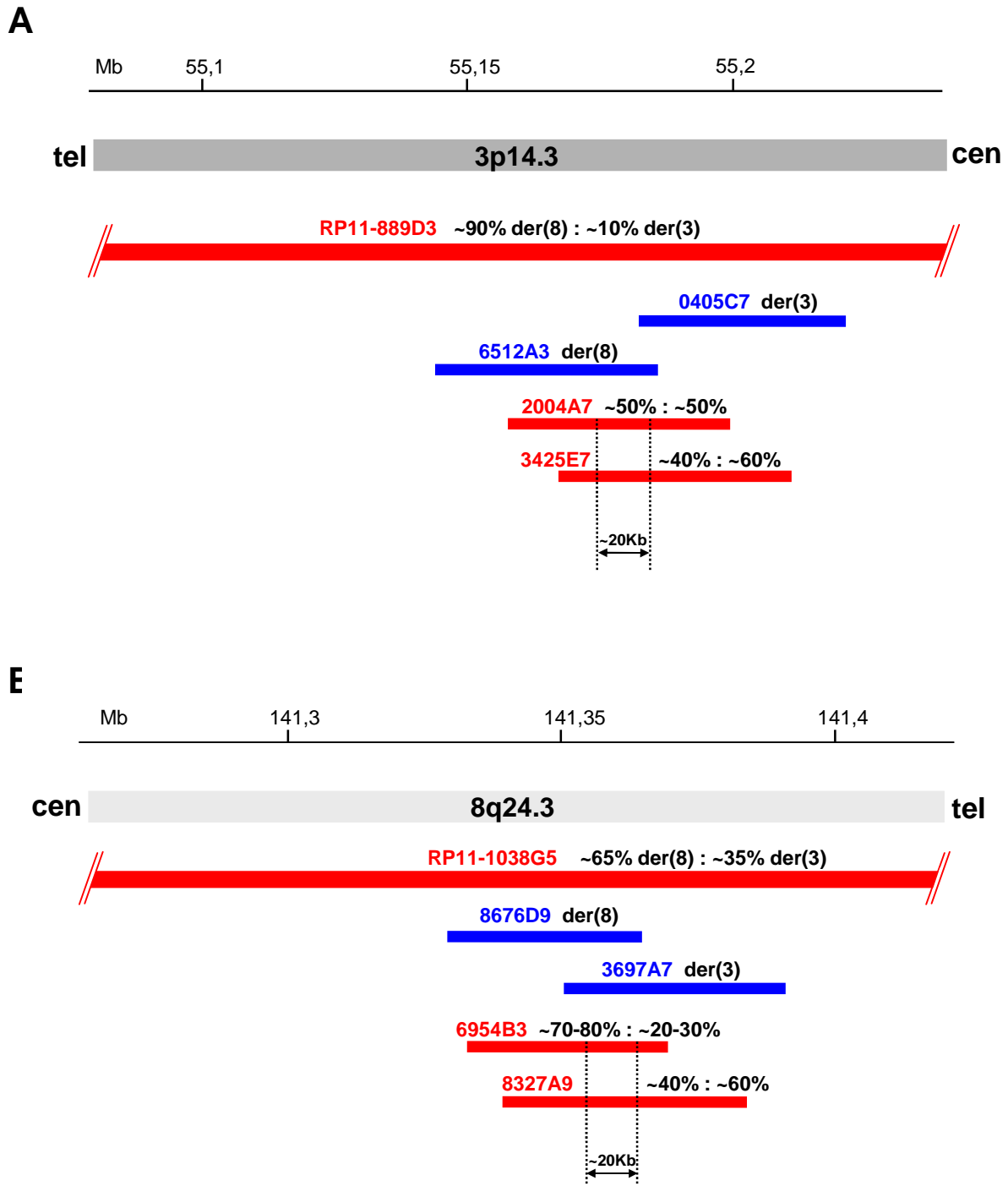


**Abb. 8: FISH-Analyse mit dem Fosmid 6954B3 als DNA-Sonde an Metaphasechromosomen einer 3;8-Translokationspatientin (Tochter)**

Die grün-fluoreszierende Fosmid DNA-Sonde 6954B3 aus der Region 8q24.3 ergab sowohl auf dem Wildtyp-Chromosom 8 (WT 8), auf dem derivativen Chromosom 3 [der(3)] als auch auf dem derivativen Chromosom 8 [der(8)] Signale. Die Chromosomen wurden mit DAPI gefärbt.

Fosmid 8676D9 hybridisierte auf dem der(8), also proximal vom Bruchpunkt, Fosmid 3697A7 auf dem der(3) und somit distal vom Chromosom 8-Bruchpunkt. Die beiden Bruchpunktregionen der t(3;8) konnten so auf einen Bereich von ~20 Kb eingegrenzt werden (Abb. 9).



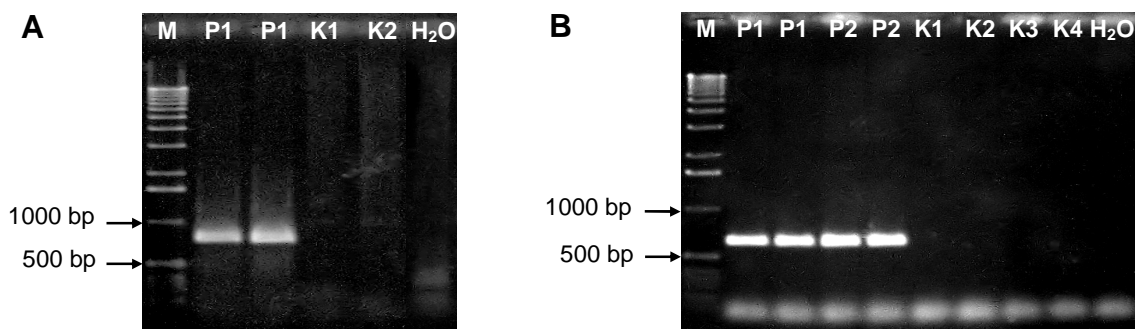


**Abb. 9: Schematische Darstellung der physikalischen Lokalisation der bruchpunktüberspannenden BAC- und Fosmid-Klone in den Regionen 3p14.3 und 8q24.3 und deren Hybridisierungseigenschaften**

(A) Ein Ausschnitt aus der Region 3p14.3 bzw. (B) 8q24.3 ist durch einen dunkelgrauen bzw. hellgrauen Balken dargestellt, über welchem die Abstände in Megabasen (Mb) und die Orientierung von Centromer (cen) nach Telomer (tel) angegeben sind. Die BAC- sowie die Fosmid-Klone, die bruchpunktüberspannende Signale zeigten, sind als rote, die proximal und distal der Bruchpunkte hybridisierenden Fosmid-Klone sind als blaue Linien dargestellt. Die Fluoreszenzsignalintensitäten sind jeweils prozentual angegeben. Die gestrichelten vertikalen Linien geben die auf ~20 Kb eingegrenzte Bruchpunktregion an.

## 2. Molekulare Charakterisierung der Translokationsbruchpunktregionen 3p14.3 und 8q24.3 einer 3;8-Translokation durch PCR und DNA-Sequenzanalyse

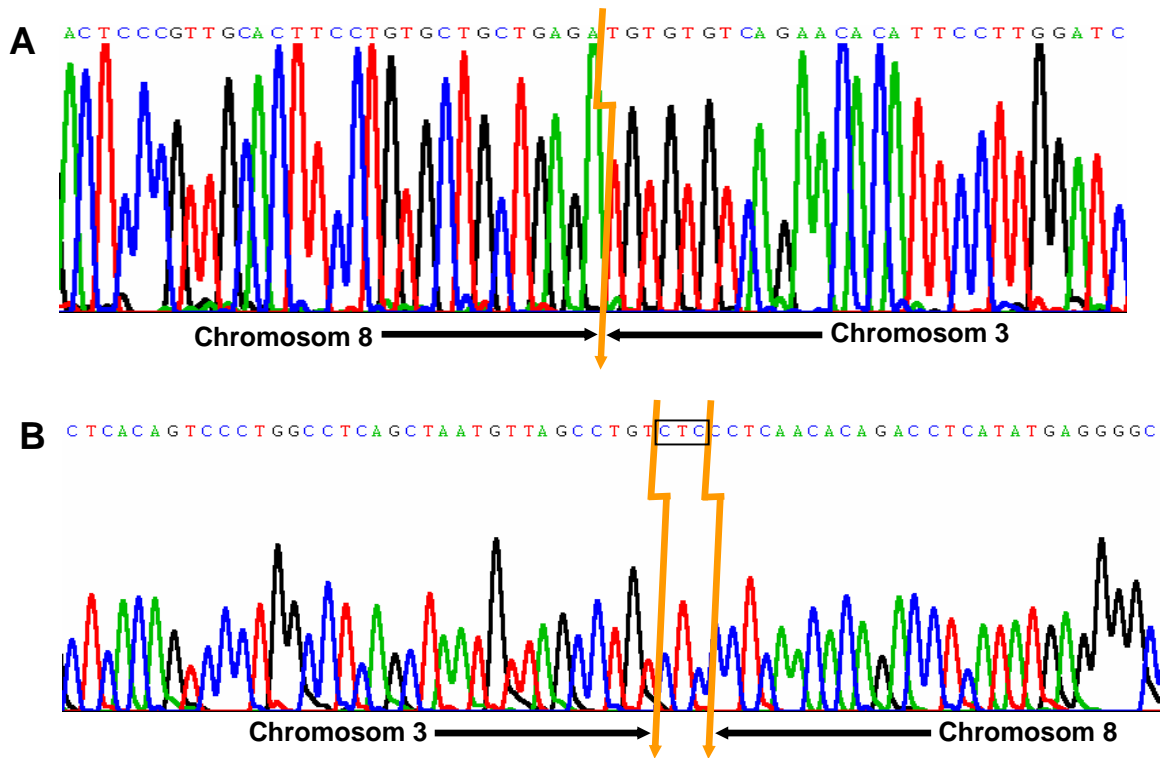
Nach der Eingrenzung durch FISH-Experimente sollten die Bruchpunktregionen auf molekularer Ebene charakterisiert werden. Um so genannte Verbindungs- oder „junction“-Fragmente, die DNA-Anteile aus den Bruchpunktregionen beider beteiligter, rearrangierter Chromosomen aufweisen, zu amplifizieren, wurden serienhaft PCR-Reaktionen durchgeführt, in denen je ein Vorwärts-Primer aus der Bruchregion 3p14.3 mit je einem Rückwärts-Primer aus der in 8q24.3 und *vice versa* an genomischer DNA der Translokationspatienten bzw. Kontroll-DNAs als Matrizen kombiniert wurde. Für beide Bruchpunkte gelang die spezifische Amplifikation von „junction“-Fragmenten (Abb. 10).



**Abb. 10: Agarosegelfotos mit den amplifizierten „junction“-Fragmenten der t(3;8)-Bruchpunkte**

(A) Amplifikation eines ~800 Bp „junction“-Fragments des der(3). (B) Amplifikation eines ~700 Bp „junction“-Fragments des der(8). M: 1 Kb DNA-Leiter, P1: Translokationspatientin (Mutter); P2: Translokationspatientin (Tochter); K1-K4: Kontrollpersonen 1-4; H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle. Die Größen von zwei Banden des DNA-Markers sind angegeben.

Für die Amplifikation eines ~800 Bp Verbindungsfragments des derivativen Chromosoms 3 wurden die Primer Chr.8\_F6A und Chr.3\_8RA, für die Amplifikation eines ~700 Bp Fragments des der(8) die Primer Chr.3\_8F und Chr.8\_R6 verwendet. Die erhaltenen „junction“-Fragmente wurden direkt sequenziert. Es zeigte sich jeweils eine Sequenz mit Anteilen beider an der Translokation beteiligter Chromosomen (Abb. 11), die eine CTC-Trinukleotid-Überlappung an der Bruchpunktsequenz des der(8) aufwies, so dass dieses Trinukleotid nicht eindeutig einem der beiden beteiligten Chromosomen zugeordnet werden konnte und der Bruchpunkt auf diesen Sequenzabschnitt eingegrenzt wurde.



**Abb. 11: Ausschnitte aus Sequenzelektropherogrammen der t(3;8) „junction“-Fragmente**

(A) Bruchpunktsequenz des derivativen Chromosoms 3. (B) Bruchpunktsequenz des derivativen Chromosoms 8. Die Bruchpunkte sind durch orangefarbene Pfeile markiert, die chromosomale Zugehörigkeit der Sequenzen ist jeweils unterhalb angegeben. Eine nicht zuzuordnende CTC-Trinukleotidsequenz ist schwarz eingerahmt.

Nach einem DNA-Sequenzvergleich der bruchpunktflankierenden Sequenzen zeigte sich auf dem derivativen Chromosom 3 eine 8 (bzw. 11) Bp große Deletion von Chromosom 8-Material sowie eine 9 (bzw. 12) Bp große Deletion von Chromosom 3-Material (Abb. 12).

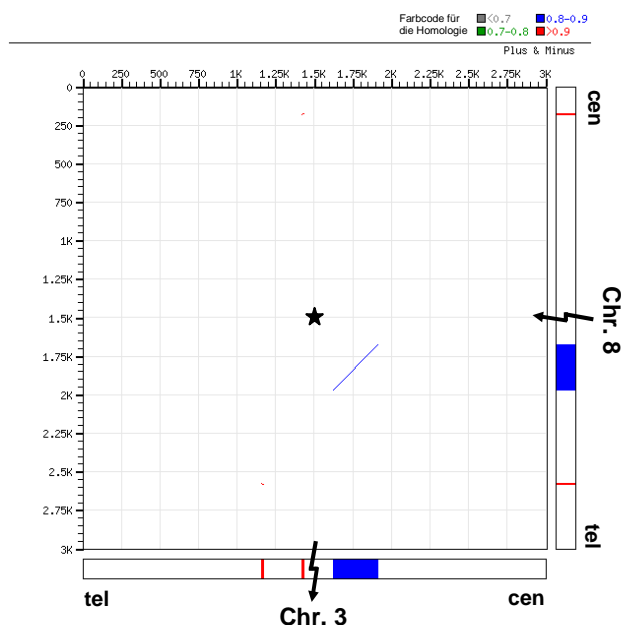
<b>WT Chr.8</b>	tel	TGCTGCTGAGAC <b>CC</b> CAGGGG <u>CTC</u> CCTCAACACAGACCTCATATGA	cen
<b>der(3)</b>	tel	TGCTGCTGAGA----- <u>      </u> -----tgtgtgtcagaac	cen
<b>der(8)</b>	tel	tcagctaagttagcctgt <u>CTC</u> CCTCAACACAGACCTCATATGA	cen
<b>WT Chr.3</b>	tel	tcagctaagttagcctgt <u>ctct</u> <b>catgg</b> tattgtgtgtcagaac	cen

**Abb. 12: DNA-Sequenzvergleich von Wildtyp- und Bruchpunktsequenzen der t(3;8)**

Chromosom 8 spezifische Sequenzen sind in Großbuchstaben, solche vom Chromosom 3 in Kleinbuchstaben dargestellt. Deletierte Basen sind in den Wildtypsequenzen fett gedruckt. Das CTC-Trinukleotid ist unterstrichen und die Chromosom 8-Sequenz ist revers komplementär abgebildet. Die Centromer- (cen) und Telomer- (tel) Orientierung ist angegeben. WT Chr: Wildtyp-Chromosom; der(3): derivatives Chromosom 3; der(8): derivatives Chromosom 8.

Die Analyse der Sequenzen aus den Bruchpunktregionen mit Hilfe verschiedener Datenbanken ergab, dass die unmittelbar flankierenden Sequenzen des Bruchpunktes auf dem der(3) den Sequenzelementen der SINE/MIR („short interspersed elements“/„mammalian interspersed repeat“-)Familie zuzuordnen sind. Die unmittelbar flankierenden Sequenzen des Bruchpunktes des der(8) hingegen sind „single copy“-DNA-Sequenzen.

Für die Identifizierung von möglichen homologen Sequenzabschnitten im Bereich der Bruchpunkte wurden jeweils 1,5 Kb distaler und proximaler Wildtyp-Sequenz der Bruchpunktbereiche mit dem Programm FLAG (Fast Local Alignment for Gigabases) untereinander verglichen. Mit anderen Worten: Es wurde ein Homologievergleich von je 3 Kb der Chromosom 3- und Chromosom 8-Wildtyp-Sequenz aus den Bruchpunktregionen durchgeführt. In der Chromosom 3-Sequenz wurde ein 236 Bp großes Element mit 84%-iger Homologie zu einem 289 Bp großen DNA-Element innerhalb der Chromosom 8-Sequenz identifiziert (Abb. 13).



**Abb. 13: Sequenzhomologievergleich von jeweils 3 Kb der Chromosom 3- und Chromosom 8-Wildtyp-Sequenz aus den Bruchpunktregionen der t(3;8) mit dem Programm FLAG**

Die Sequenzen sind schematisch als Balken unterhalb bzw. rechts neben dem Diagramm abgebildet. Im Diagramm ist die Länge und Lokalisation von homologen Sequenzabschnitten durch farbige Linien angezeigt. Der Farbcodierung ist oben rechts angegeben. Die Lage der Chromosomenbruchpunkte ist durch einen schwarzen Stern im Zentrum des Diagramms bzw. durch einen schwarzen Pfeil dargestellt. Die centromer (cen) bzw. telomer (tel) sowie die distal bzw. proximal des Bruchpunktes gelegenen Bereiche sind gekennzeichnet.

Des Weiteren wurden zwei Sequenzelemente (12 und 13 Bp) mit einer 100%-igen Homologie in beiden Sequenzen identifiziert (rote Linien in Abb. 13). Diese Elemente sind jedoch nicht annähernd in gleichen Abständen zu den jeweiligen Bruchpunkten lokalisiert. Durch die Verwendung des „Repeat Masker“-Programms stellte sich heraus, dass die durch FLAG-Analyse identifizierten homologen DNA-Sequenzbereiche repetitive DNA darstellen und *AluSx*-Elemente repräsentieren. 129 Bp proximal vom Bruchpunkt des derivativen Chromosoms 3 befindet sich eins dieser Elemente (312 Bp) und 162 Bp distal vom Bruchpunkt des der(8) das andere (294 Bp) (blaue Kästen in Abb. 13).

### 3. Mutationsanalyse von zehn positionellen Kandidatengen in 3p21.1-p14.3 bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom

#### 3.1 Vorbemerkungen

Nach der Identifizierung der 3;8-Translokationsbruchpunkte galten die in diese Region kartierten Gene als Kandidatengene für das ZLS. Da ein weiterer ZLS-Patient mit einer 3;17-Translokation bekannt war (Kim *et al.*, 2006), bei dem sich ebenfalls ein Bruchpunkt auf dem Chromosom 3 in der Region p14.3 befindet, wurde zunächst diese Region favorisiert (Abb. 14) und eine Mutationsanalyse von dort kartierenden Genen wurde bei sporadischen Patienten mit dem ZLS durchgeführt. Das durch die 3;17-Translokation direkt unterbrochene *CACNA2D3*-Gen war zunächst das vielversprechendste positionelle Kandidatengen; es liegt ~120 Kb distal vom Chromosom 3-Bruchpunkt der t(3;8) und wurde als erstes bei sporadischen Patienten mit ZLS einer Mutationsanalyse unterzogen.

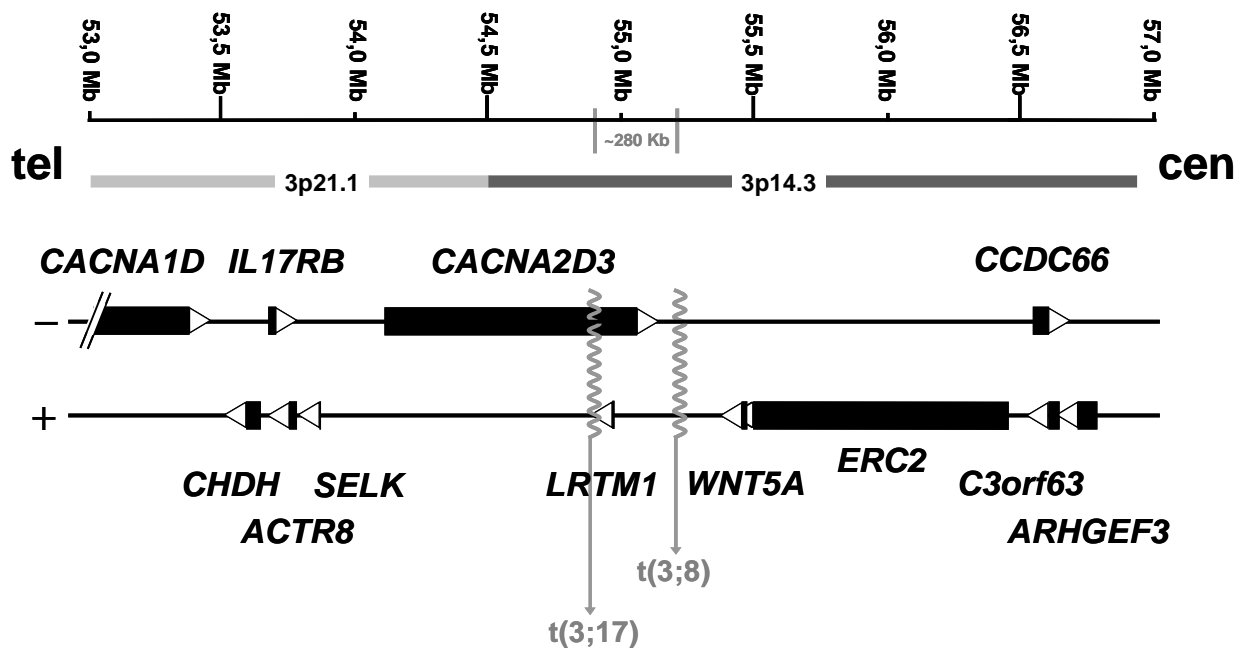
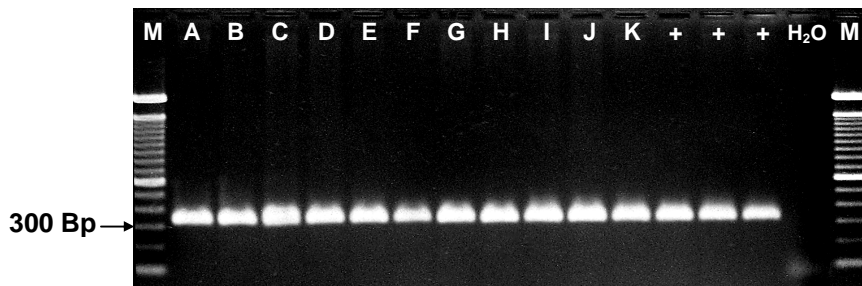


Abb. 14: Schematische Darstellung der physikalischen Bruchpunktregion in 3p21.1-p14.3

Gene sind durch schwarze Balken dargestellt und bezeichnet; ihre 5'→3'-Orientierung ist durch eine Pfeilspitze wiedergegeben. Die Orientierung von Telomer (tel) nach Centromer (cen) ist angegeben. Oberhalb der Gene sind die chromosomalen Regionen als graue horizontale Balken und der Maßstab in Megabasen (Mb) angezeigt. Die Translokationsbruchpunkte sind durch graue gewellte Linien, die in einen Pfeil münden, symbolisiert und bezeichnet.

### 3.2 Mutationsanalyse des *CACNA2D3*-Gens

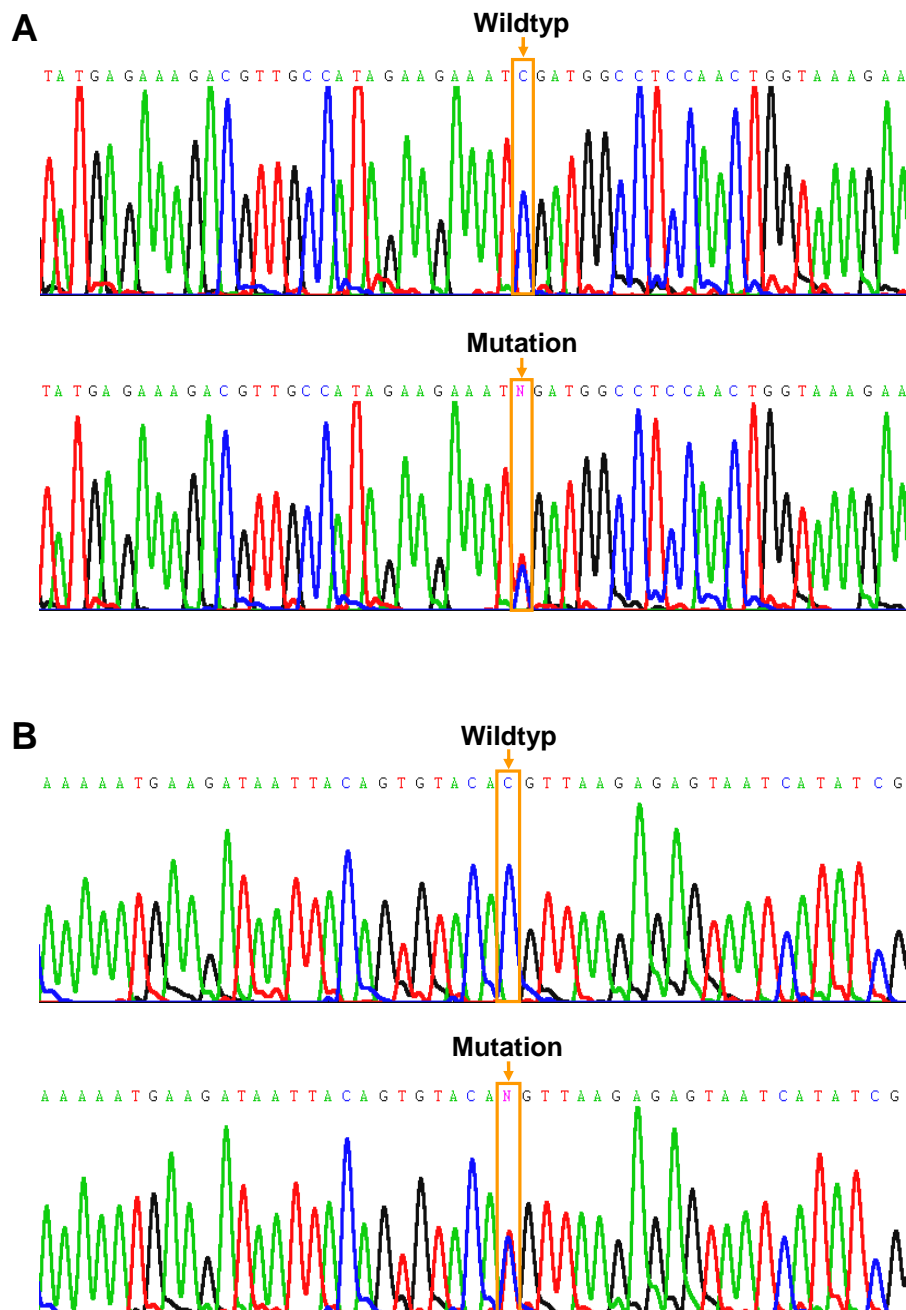
Um eine Mutationsanalyse des *CACNA2D3*-Gens bei Patienten mit dem Zimmermann-Laband-Syndrom durchführen zu können, wurde zunächst die Exon-Intron-Struktur des Gens mit Hilfe des BLAT-Programms bestimmt und exonflankierende Primer abgeleitet. Das *CACNA2D3*-Gen besteht aus 38 kodierenden Exons und erstreckt sich auf der genomischen DNA-Ebene über einen Bereich von ~950 Kb. Durch alternatives Spleißen werden zehn unterschiedliche Transkripte, aus denen ebensoviele putative Isoformen resultieren, gebildet. Die Etablierung optimaler PCR-Bedingungen für jedes Amplikon wurde an genomischer DNA von Kontrollpersonen durchgeführt. Anschließend wurden die Exons aus genomischer DNA der Patienten amplifiziert und die Produkte durch Agarosegelelektrophorese auf Qualität und Quantität überprüft. Die PCR-Produktgrößen lagen zwischen 211 Bp und 493 Bp. Im Rahmen der durchgeführten Mutationsanalyse wurden die 38 kodierenden Exons sowie angrenzende kurze Intronbereiche (~40 Bp) bei 20 ZLS-Patienten bzw. Patienten mit einem ähnlichen Phänotyp (Patienten A-S und U ) zunächst amplifiziert und nachfolgend direkt sequenziert. In der Abb. 15 ist exemplarisch ein Agarosegelbild für die PCR-Produkte des Exons 8 dargestellt.



**Abb. 15: Exemplarisches Foto eines Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels mit PCR-Produkten von Exon 8 des *CACNA2D3*-Gens**

Das Foto zeigt die 336 Bp großen PCR-Produkte von Exons 8 des *CACNA2D3*-Gens von 11 der 20 untersuchten ZLS-Patienten (A-K) sowie von 3 Kontrollen (+). M: 1 Kb DNA-Marker; H<sub>2</sub>O: Wasserprobe.

Nach DNA-Sequenzanalyse wurden verschiedene Sequenzvarianten in der Kodierregion und auch in intronischen Bereichen identifiziert. Die Dokumentation der Mutationen erfolgte nach den Nomenklaturvorgaben und Empfehlungen der „Human Genome Variation Society“ (<http://www.genomic.unimelb.edu.au/mdi/>) (den Dunnen & Antonarakis, 2000). Einige Elektropherogramme sind exemplarisch in der Abb. 16 dargestellt.



**Abb. 16: Exemplarische Darstellung von Elektropherogrammen mit identifizierten Sequenzvarianten im *CACNA2D3*-Gen**

(A) Darstellung der heterozygoten Sequenzvariante c.246C>T bei Patient G (unten) und Wildtyp-Sequenz von Patient D (oben). (B) Revers komplementäre Darstellung der heterozygoten Sequenzvariante IVS26-52G>A mit der Mutation bei Patientin E (unten) und der Wildtyp-Sequenz (oben). Die Position der jeweiligen Sequenzvariante ist orange eingerahmt, durch einen orangen Pfeil markiert und mit der Beschriftung Wildtyp oder Mutation gekennzeichnet.

So zeigte Patientin A die heterozygote c.246C>T Mutation und Patient E die heterozygote Sequenzvariante IVS26-52G>A. Die Mutation c.246C>T war bereits in den Datenbanken als „single nucleotid polymorphism“ (SNP) bekannt, während die Mutation IVS26-52G>A durch den Nachweis bei der gesunden Mutter des Patienten als nicht-pathogene Sequenzvariante identifiziert wurde.

Insgesamt wurden 17 hetero- und/oder homozygote Sequenzvarianten bei den untersuchten Patienten mit ZLS identifiziert (Tab. 7).

Gen	Nukleotid-austausch	Aminosäure-austausch	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
<i>CACNA2D3</i>	IVS2+89A>T		3/40	rs2290132
	c.246C>T	p.I82	11/40	rs9879885
	IVS5-12T>C		12/40 (1) <sup>c</sup>	rs9814659
	c.1260G>A	p.Q420	7/40 (1) <sup>c</sup>	rs3732748
	c.1593A>G	p.G531	4/40	rs3773603
	IVS21-36A>G		11/40 (3) <sup>c</sup>	rs1405330
	IVS22-36G>A		9/40	rs2293662
	IVS25-77A>T		5/40	rs6445708
	c.2265C>T	p.G755	4/40	rs17054524
	IVS26-52G>A <sup>b</sup>		8/40	
	IVS29-16_-17insG <sup>a</sup>		4/40	
	IVS32+33A>G		15/40 (7) <sup>c</sup>	rs4955827
	IVS32-94T>G		4/40	rs2280187
	IVS34+143G>C		9/40 (4) <sup>c</sup>	rs3773570
	IVS37+58A>G <sup>b</sup>		4/40	
	IVS37+115_118del <sup>b, e</sup>		4/40	
	c.3231A>G <sup>d</sup>	p.T1077	2/40 (1) <sup>c</sup>	

**Tab. 7: Identifizierte Sequenzvarianten im *CACNA2D3*-Gen**

<sup>a</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Kontrollpersonen identifiziert; <sup>b</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Familienangehörigen des Patienten identifiziert; <sup>c</sup> Anzahl der homozygot vorliegenden Sequenzvariante; <sup>d</sup> Sequenzvariante wurde in heterozygotem Status bei gesunden Kontrollpersonen identifiziert; <sup>e</sup> Deletion der Nukleotide TTCA; dbSNP: Datenbank „single nucleotide polymorphism“; rs: Referenznummer für den SNP in der NCBI-Datenbank.

Von den 17 detektierten Mutationen waren fünf synonyme Mutationen in der Kodierregion und 12 in intronischen Bereichen lokalisiert. 12 dieser Mutationen waren in Datenbanken als SNPs beschrieben. Drei intronische Mutationen konnten bei den Eltern der Patienten nachgewiesen werden. Eine synonyme und eine intronische Mutation konnte bei Kontrollpersonen detektiert werden. Die 17 identifizierten Sequenzvarianten sind somit nicht mit dem ZLS assoziiert.

### 3.3 Mutationsanalyse des *WNT5A*-Gens

Die 3;17- und 3;8-Translokationen könnten möglicherweise zu einem Positionseffekt führen, der zur fehlregulierten Expression eines Gens bzw. mehrerer Gene in der Region 3p21.1-p14.3 führen könnte. Das *WNT5A*-Gen, das sich proximal von beiden Bruchpunkten in 3p14.3 befindet, ist ein besonders interessantes Kandidatengen für das ZLS, da das Genprodukt an



der Extremitätenausbildung beteiligt ist (Kawakami *et al.*, 1999) und das Gen in den terminalen Phalangen im Verlauf der Extremitätendifferenzierung exprimiert ist (Yamaguchi *et al.*, 1999). Da Patienten mit ZLS einen skelettalen Phänotyp, mit Fehlbildungen der terminalen Phalangen zeigen, ist das *WNT5A*-Gen somit ein äußerst vielversprechendes positionelles und auch funktionelles Kandidatengen. Das *WNT5A*-Gen besteht aus 5 kodierenden Exons und erstreckt sich auf genomischer DNA-Ebene über einen Bereich von ~22 Kb. Durch alternatives Spleißen werden vier unterschiedliche Transkripte gebildet.

### 3.3.1 Mutationsanalyse der untranslatierten Regionen, der putativen Promotorregion und der Kodierregion des *WNT5A*-Gens

Im Rahmen der durchgeführten Mutationsanalyse wurden die 5 kodierenden Exons und deren Exon-Intron-Grenzen (>40 Bp), der untranslatierte 5'-Bereich von 318 Bp, der untranslatierte 3'-Bereich von 4377 Bp Länge sowie ~1 Kb der putativen Promotorregion des *WNT5A*-Gens bei 11 sporadischen ZLS-Patienten (Patienten A-K) zunächst amplifiziert und nachfolgend direkt sequenziert. Für die Mutationsanalyse der 3'-untranslatierten Region (UTR) wurden überlappende Amplikons hergestellt und sequenziert. Es konnten elf Sequenzvarianten identifiziert werden (Tab. 8).

Gen	Nukleotid-austausch	Aminosäure-austausch /UTR	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
<i>WNT5A</i>	IVS2+47T>A <sup>b</sup>		4/22	
	c.405G>T <sup>b</sup>	p.T135	1/22	
	r.1499c>u <sup>b</sup>	3'	2/22	
	r.3330c>u	3'	2/22 (1) <sup>c</sup>	rs3732750
	r.4406a>g	3'	11/22 (2) <sup>c</sup>	rs1829556
	r.4579c>g	3'	11/22 (4) <sup>c</sup>	rs669889
	r.4656delc <sup>b</sup>	3'	4/22	
	r.4881t>c	3'	4/22	rs17055392
	r.5176a>u	3'	8/22	rs10865994
	r.5536a>u	3'	5/22	rs11708810
	r.5800a>g	3'	8/22	rs1047898

**Tab. 8: Identifizierte Sequenzvarianten im *WNT5A*-Gen**

<sup>b</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Familienangehörigen des Patienten identifiziert; <sup>c</sup> Anzahl der homozygot vorliegenden Sequenzvariante; dbSNP: Datenbank „single nucleotid polymorphism“; rs: Referenznummer für den SNP in der NCBI-Datenbank.

Es zeigte sich eine heterozygote synonyme Mutation (c.405G>T) in der Kodierregion bei Patient E sowie jeweils eine heterozygote intronische Mutation (IVS2+47T>A) bei den Patienten B, C, E und H. Diese Mutationen konnten bei einem gesunden Elternteil der Patienten nachgewiesen werden. In der 3'-UTR wurden neun Mutationen identifiziert, von denen sieben in der NCBI SNP-Datenbank annotiert waren. Zwei Mutationen (r.1499c>u und r.4656delc) wurden jeweils bei einem gesunden Elternteil der Patienten nachgewiesen.

In der putativen Promotorregion konnten zwei Sequenzvarianten detektiert werden (Tab. 9).

Gen	Nukleotid-austausch in NT_022517.17	Position zum Startkodon	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
WNT5A	g.55461757G>T	c.-387G>T	3/22	rs620014
	g.55461996G>C	c.-625G>C <sup>b</sup>	2/22	

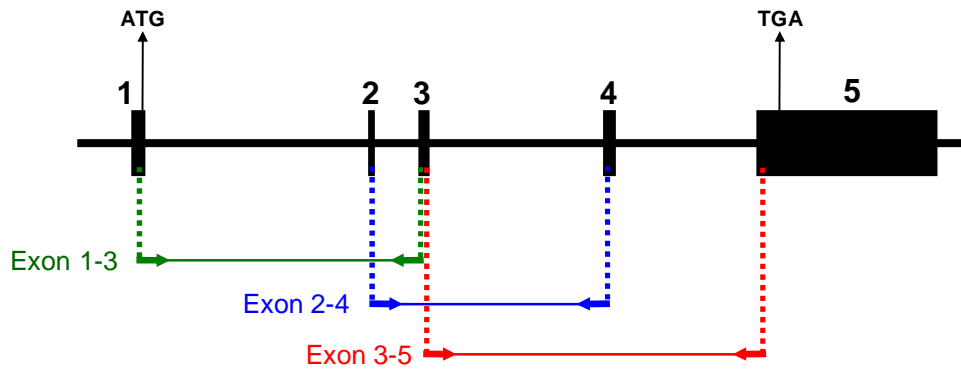
**Tab. 9: Identifizierte Sequenzvarianten in der putativen Promotorregion des WNT5A-Gens**

<sup>b</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Familienangehörigen des Patienten identifiziert; dbSNP: Datenbank „single nucleotid polymorphism“; rs: Referenznummer für den SNP in der NCBI-Datenbank.

Die in der putativen Promotorregion 387 Bp stromaufwärts des Startkodons gelegene heterozygote Mutation c.-387G>T bei den Patienten F, K und Q war in den Datenbanken als SNP annotiert. Die zweite heterozygote Mutation (c.-625G>C) bei den Patienten I und O konnte durch den Nachweis bei einem gesunden Elternteil als Sequenzvariante eingestuft werden.

### 3.3.2 Mutationsanalyse des WNT5A-Gens auf cDNA-Ebene

Pathogene Mutationen, die sich beispielsweise im Bereich des „branch points“ eines Introns befinden, können durch die Analyse exonflankierender intronischer Sequenzen u.U. nicht identifiziert werden. Solche genetischen Veränderungen können zu einem aberranten Spleißen führen, so dass es zu einem Überspringen eines einzelnen bzw. mehrerer Exons kommen kann. Um nach entsprechenden Mutationen zu suchen, wurde bei sieben Patienten mit ZLS eine Mutationsanalyse des WNT5A-Gens auf cDNA-Ebene durchgeführt. Hierfür wurde aus lymphoblastoiden Zellen von sechs ZLS-Patienten bzw. Fibroblasten eines ZLS-Patienten RNA isoliert und diese in cDNA umgeschrieben. Es wurden drei exon- und intronüberspannende Primerkombinationen für die Amplifikationen verwendet und die entsprechenden PCR-Produkte direkt sequenziert (Abb. 17).



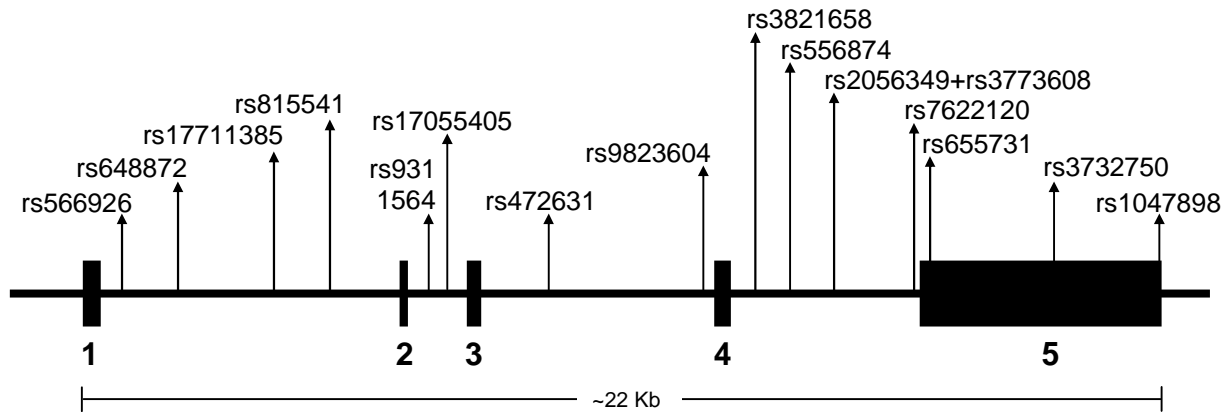
**Abb. 17: Schematische Darstellung der genomischen Organisation des *WNT5A*-Gens und relative Lage der für die cDNA-Amplifikationen verwendeten Primer**

Die genomische Region des *WNT5A*-Gens ist schematisch als horizontale Linie und Exons sind durch schwarze, oben nummerierte Rechtecke dargestellt. Die Position von Start- (ATG) und Stop-Kodon (TGA) ist gekennzeichnet. Die Lage der verwendeten Primer im jeweiligen Exon ist durch gestrichelte farbige Linien angedeutet und unten durch Pfeile dargestellt. Die amplifizierten Bereiche sind durch Verbindungslinien zwischen den Primern angedeutet.

Von der cDNA der sieben ZLS-Patienten konnten *WNT5A*-spezifische PCR-Produkte amplifiziert werden. Nach DNA-Sequenzanalyse aller Amplikons wurden keine Sequenzabweichungen zur mRNA-Sequenz des *WNT5A*-Gens in der Datenbank gefunden. Die auf genomischer DNA-Ebene identifizierte c.405G>T-Mutation wurde nicht detektiert, da von dem entsprechenden Patienten keine Zelllinie und somit RNA bzw. cDNA vorhanden war.

### 3.3.3 *WNT5A*-SNP-Analyse bei sieben Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom und deren Eltern

Um zu untersuchen, ob heterozygote submikroskopische Deletionen im *WNT5A*-Gen ursächlich für das ZLS sind, wurde eine SNP-Analyse bei sieben Patienten und deren Eltern durchgeführt. Hierfür wurden 16 SNPs aus der genomischen *WNT5A*-Gen-Region untersucht (Abb. 18).



**Abb. 18:** Schematische Darstellung der genomischen Organisation des *WNT5A*-Gens mit Lokalisation der 16 untersuchten SNPs

Die genomische DNA ist schematisch als horizontale Linie und Exons sind durch schwarze unten nummerierte Rechtecke dargestellt. Die Position der SNPs ist durch einen Pfeil gekennzeichnet und die jeweiligen „reference SNP“ (rs) Nummern sind angegeben. Der das Gen überspannende genomische DNA-Bereich ist unten in Kb angegeben.

Es wurden Primer abgeleitet, um die entsprechenden genomischen DNA-Bereiche zu amplifizieren, und die Etablierung optimaler PCR-Bedingungen wurde an genomischen Kontroll-DNAs durchgeführt. Die Genotypen der ZLS-Patienten wurden dann durch Amplifikation und direkte Sequenzierung bestimmt. War der Patient homozygot für den analysierten SNP, erfolgte die Analyse der Eltern. In Tabelle 10 sind die untersuchten SNPs zusammenfassend dargestellt.

Patient \ SNP	B			C			D			E			F			H			I		
	M	V	P	M	V	P	M	V	P	M	V	P	M	V	P	M	V	P	M	V	P
rs566926	-	-	*A/C	C	C	-	A	C/A	A	C	C	-	-	-	*A/C	-	-	*A/C	-	-	*A/C
rs648872	C/T	C	C	C/T	C	C	-	-	*C/T	C	C	-	C	C	-	C	C/T	C	C	C/T	C
rs17711385	T	T/C	T	-	-	*T/C	T	T/C	T	-	-	*T/C	T/C	T/C	T	T	T	-	-	-	*T/C
rs815541	C/G	C	C	C	C/G	C	C	C	-	C	C/G	C	-	-	*C/G	C	C	-	C	C	-
rs9311564	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-
rs17055405	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-
rs472631	-	-	*C/T	-	-	*C/T	C	C	-	-	-	*C/T	-	-	*C/T	-	-	*C/T	-	-	*C/T
rs9823604	G	G	-	G	G	-	G	G	-	G	G	-	G	G	-	G	G	-	G	G	-
rs3821658	-	-	*G/A	-	-	*G/A	-	-	*G/A	-	-	*G/A	G	G	-	G/A	G	*G/A	G/A	G	G
rs556874	-	-	*A/G	-	-	*A/G	A/G	G	G	-	-	*A/G	-	-	*A/G	-	-	*A/G	-	-	*A/G
rs2056349	-	-	*G/A	-	-	*G/A	-	-	*G/A	-	-	*G/A	G	G	G	-	-	*G/A	G	G	G
rs3373608	A	A	-	A	A	-	A	A	-	A	A	-	A	A	-	A	A	-	A	A	-
rs7622120	-	-	*T/C	-	-	*T/C	T/C	C	C	-	-	*T/C	-	-	*T/C	-	-	*T/C	-	-	*T/C
rs655731	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-	T	T	-
rs3732750	C	C	-	C	C	-	C	C	-	C	C	-	C	C	-	C	C	-	C	C	-
rs1047898	-	-	*A/G	-	-	*A/G	A/G	A	A	-	-	*A/G	-	-	*A/G	-	-	*A/G	-	-	*A/G

**Tab. 10:** Homozygote und heterozygote SNPs in der genomischen *WNT5A*-Region bei sieben Vater-Mutter-Kind (ZLS)-Trios

M: Mutter; V: Vater; P: sporadischer ZLS-Patient; G: Guanin; A: Adenin; T: Thymin; C: Cytosin; SNP: „single nucleotid polymorphism“; -: SNP-Status nicht angegeben bzw. nicht untersucht; \*: informativer SNP; rs: Referenznummer für den SNP in der NCBI-Datenbank.

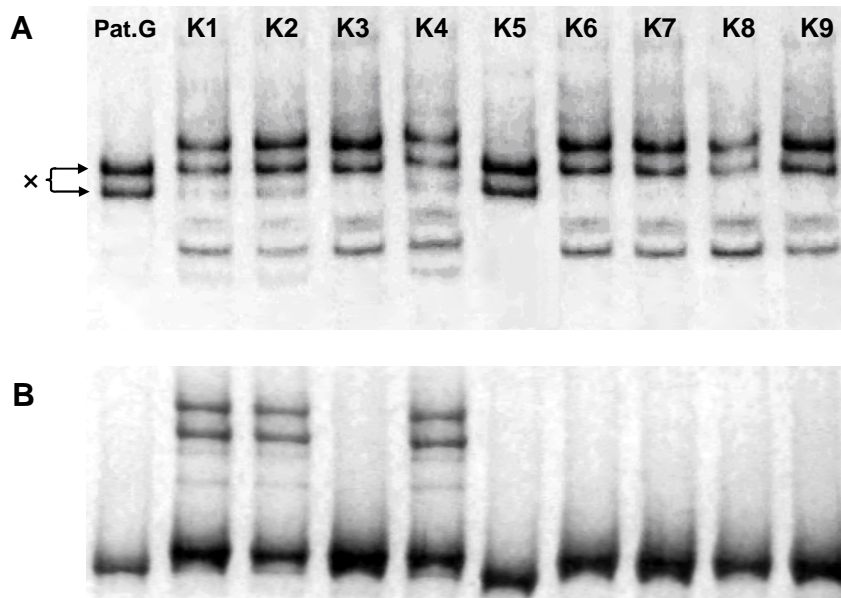
Von 16 SNPs, die jeweils bei 7 Patienten untersucht wurden, waren insgesamt 43 SNPs informativ. Durch den Nachweis der heterozygoten SNPs rs566926 und rs1047898, die eine Entfernung von 21724 Bp zueinander aufweisen, konnte bei den Patienten B, F, H und I angenommen werden, dass eine Hemizygotie dieses gesamten Bereichs mit großer Wahrscheinlichkeit nicht vorlag. Bei den Patienten C und E waren die SNPs rs17711385 und rs1047898, mit einem Abstand von 19042 Bp zueinander, jeweils heterozygot, wodurch das diploide Vorliegen dieses Bereichs angenommen werden konnte. Der Patient D war heterozygot für die SNPs rs648872 und rs2056349, die eine Entfernung von 14015 Bp zueinander aufweisen. Somit wurde eine heterozygote Deletion dieses Bereichs zunächst nicht vermutet. Diese Annahmen konnten durch den Nachweis von weiteren heterozygoten SNPs, die sich innerhalb der untersuchten Bereiche befanden, gestützt werden.

### 3.4 Mutationsanalyse der Gene *CHDH*, *IL17RB*, *ACTR8*, *SELK*, *LRTM1*, *ERC2*, *CCDC66* und *C3orf63*

Durch einen Positionseffekt könnte die Expression von Genen in der Region 3p21.1-p14.3 bei den beschriebenen Translokationspatienten verändert sein. Bei den sporadischen ZLS-Patienten hingegen würde man eher von einer Mutation in einem dieser Gene ausgehen. Da keine pathogenen Mutationen im *CACNA2D3*- und *WNT5A*-Gen detektiert werden konnten, wurde sukzessiv bei weiteren Genen aus der Bruchpunktregion 3p21.1-p14.3 eine Mutationsanalyse durchgeführt. Es wurden bei 11 sporadischen ZLS-Patienten (Patienten A-K) die Kodierregionen sowie ~40 Bp der exonflankierenden intronischen Sequenzen der folgenden 8 Gene einer Mutationsanalyse unterzogen: *CHDH* (*cholin dehydrogenase*) (7 Exons), *IL17RB* (*interleukin 17 receptor B*) (11 Exons), *ACTR8* [*actin-related protein 8 homolog (yeast)*] (13 Exons), *SELK* (*selenoprotein K*) (5 Exons), *LRTM1* (*leucine-rich repeats and transmembrane domains 1*) (3 Exons), *ERC2* (*ELKS/RAB6-interacting/CAST family member 2*) (17 Exons), *CCDC66* (*coiled-coil domain containing 66*) (18 Exons) und *C3orf63* (*chromosome 3 open reading frame 63*) (17 Exons).

Im Rahmen der Mutationsanalyse konnten im *CHDH*-Gen fünf, im *IL17RB*-Gen 11, im *ACTR8*-Gen acht, im *SELK*-Gen zwei, im *ERC2*-Gen sechs, im *CCDC66*-Gen 13 und im *C3orf63*-Gen acht Mutationen detektiert werden (Tab. 11 und 12). Für den Nachweis identifizierter Sequenzvarianten bei Kontrollpersonen wurden SSCP-Analysen durchgeführt, von denen eine exemplarisch in Abbildung 14 dargestellt ist. Die bei Patient G im Intron 17 des *CCDC66*-Gens identifizierte homozygote Mutation IVS17+70delGGTTT, führte bei dem

entsprechenden PCR-Produkt zu einem zu Wildtyp-PCR-Produkten unterschiedlichen Wanderungsverhalten der DNA-Einzelstränge (Abb. 18).



**Abb. 19: Exemplarische Darstellung des Bandenmusters einiger PCR-Produkte von Exon 17 des *CCDC66*-Gens in einem SSCP-Gel ohne Glycerin**

(A) Banden der DNA-Einzelstränge vom Exon 17-Amplikon des *CCDC66*-Gens sind im oberen Bereich des PAA-Gels dargestellt. Das Bandenmuster des Patienten G (×) zeigt deutliche Unterschiede zu dem von acht Kontrollpersonen. PCR-Produkte des Patienten G und K5 zeigen hingegen ein identisches Bandenmuster. Die nur bei K1, K2 und K4 vorhandenen schwachen Banden, auf Höhe der unteren Bande des Patienten G, sind vermutlich durch einen heterozygoten Status der untersuchten Deletion bedingt. Weitere Banden in diesem Gelabschnitt von K1-K4 und K6-K9 sind höchstwahrscheinlich durch das Wildtyp-Allel ohne Deletion hervorgerufen. (B) Im unteren Bereich des PAA-Gels sind Banden der DNA-Doppelstränge zu sehen. Die Homoduplices von Patient G und K5 sind am weitesten im PAA-Gel migriert. Weitere Banden der Kontrollen K1, K2 und K4 im mittleren und oberen Bereich dieses Gelabschnitts stellen DNA-Heteroduplices dar. Sie sind sehr wahrscheinlich durch den heterozygoten Status der untersuchten Deletion entstanden. Pat.G: ZLS-Patient G; K1-K9: Kontrollpersonen 1-9.

Die bei der Sequenzierung des 286 Bp großen PCR-Produkts von Exon 17 des *CCDC66*-Gens identifizierte Mutation konnte durch SSCP-Analysen bei einer Kontrollperson (K5) identifiziert und durch eine nachfolgende Sequenzierung als nicht-pathogene Sequenzvariante verifiziert werden.

Gene	Nukleotid-austausch	Aminosäure-austausch	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
<i>CHDH</i>	c.233G>T	p.R78L	10/16 (3) <sup>c</sup>	rs12676
	c.360G>A	p.L120	1/16	rs17053532
	c.462C>T <sup>a</sup>	p.G154	1/16	
	c.720G>A	p.A240	8/16 (3) <sup>c</sup>	rs2241808
	c.921C>G <sup>a</sup>	p.L307	1/16	
<i>IL17RB</i>	IVS1-18delT		16/16 (8) <sup>c</sup>	rs5849009
	IVS1-28G>A		11/16 (5) <sup>c</sup>	rs1025690
	IVS1-31A>G		4/16 (1) <sup>c</sup>	rs2232333
	c.126C>G	p.P42	11/16 (5) <sup>c</sup>	rs1025689
	c.369C>T	p.Y123	2/16	rs3733075
	c.441T>A <sup>b</sup>	p.N147K	1/16	
	IVS6+71T>C		2/16 (1) <sup>c</sup>	rs2232338
	IVS6-84G>A		2/16	rs3821867
	IVS7+84C>G		3/16	rs2276840
	IVS9+12G>A		1/16	rs2227287
	c.1450C>T	p.Q484X	2/16 (1) <sup>c</sup>	rs1043261
<i>ACTR8</i>	c.209G>A <sup>b</sup>	p.S70N	1/16	
	IVS3+4C>T <sup>a</sup>		1/16	
	IVS3+43G>T		4/16 (1) <sup>c</sup>	rs3733081
	IVS6+14C>G		2/16 (1) <sup>c</sup>	rs13073855
	IVS6-11T>C		4/16	rs744277
	IVS6-15delC		4/16	rs5849012
	c.1200C>T	p.I400	5/16 (1) <sup>c</sup>	rs4687757
	c.1518A>G	p.G506	3/16	rs1046677
	IVS2-61A>G		3/16	rs1020082
	IVS2-67A>C		5/16 (1) <sup>c</sup>	rs10440151
<i>SELK</i>	c.720C>A <sup>b</sup>	p.H240Q	2/16	
	c.1058A>T <sup>b</sup>	p.N353I	1/16	
<i>ERC2</i>	IVS8+82C>A		7/16	rs3816575
	IVS10+22G>A		2/16	rs1379715
	IVS11+51G>A		2/16	rs4974160
	IVS12+76G>A <sup>b</sup>		1/16	

**Tab. 11: Identifizierte Sequenzvarianten in den Genen *CHDH*, *IL17RB*, *ACTR8*, *SELK* und *ERC2***

<sup>a</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Kontrollpersonen identifiziert; <sup>b</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Familienangehörigen des Patienten identifiziert; <sup>c</sup> Anzahl der homozygot vorliegenden Sequenzvariante; dbSNP: Datenbank „single nucleotide polymorphism“; rs: Referenznummer für den SNP in der NCBI-Datenbank.

Gene	Nukleotid-austausch	Aminosäure-austausch	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
<i>CCDC66</i>	IVS3+58T>C		16/16 (8) <sup>c</sup>	rs11130525
	IVS3-19G>C <sup>b</sup>		1/16	
	IVS3-24A>G		7/16 (1) <sup>c</sup>	rs6781293
	c.-7C>T		15/16 (7) <sup>c</sup>	rs6769055
	c.426G>A <sup>b</sup>	p.S142	1/16	
	c.636A>G	p.Q212	16/16 (8) <sup>c</sup>	rs1388256
	c.797A>G	p.Q266R	16/16 (8) <sup>c</sup>	rs1491170
	c.1028G>A	p.R343Q	8/16	rs7637449
	c.1342C>T	p.L448	1/16	rs6807338
	c.1465_1467dupTCT <sup>b</sup>	p.S489dup	8/16 (1) <sup>c</sup>	
	IVS11+21T>C <sup>b</sup>		1/16	rs17216685
	c.2361C>T	p.N787	16/16 (8) <sup>c</sup>	rs1015329
	IVS17+72_76del <sup>d</sup>		2/16 (1) <sup>c</sup>	rs3830333
	<i>C3orf63</i>	IVS2-15A>T		5/16
IVS3-15T>C			7/16 (1) <sup>c</sup>	rs9858728
IVS6+9T>G <sup>b</sup>			1/16	
IVS8-32T>G			12/16 (6) <sup>c</sup>	rs1489949
c.1826G>C		p.R609T	8/16 (1) <sup>c</sup>	rs9835332
IVS13+24C>T <sup>b</sup>			1/16	
IVS16+26C>G			6/16 (1) <sup>c</sup>	rs2291499
c.3570A>G		p.S1190	2/16	rs3732506

**Tab. 12: Identifizierte Sequenzvarianten in den Genen *CCDC66* und *C3orf63***

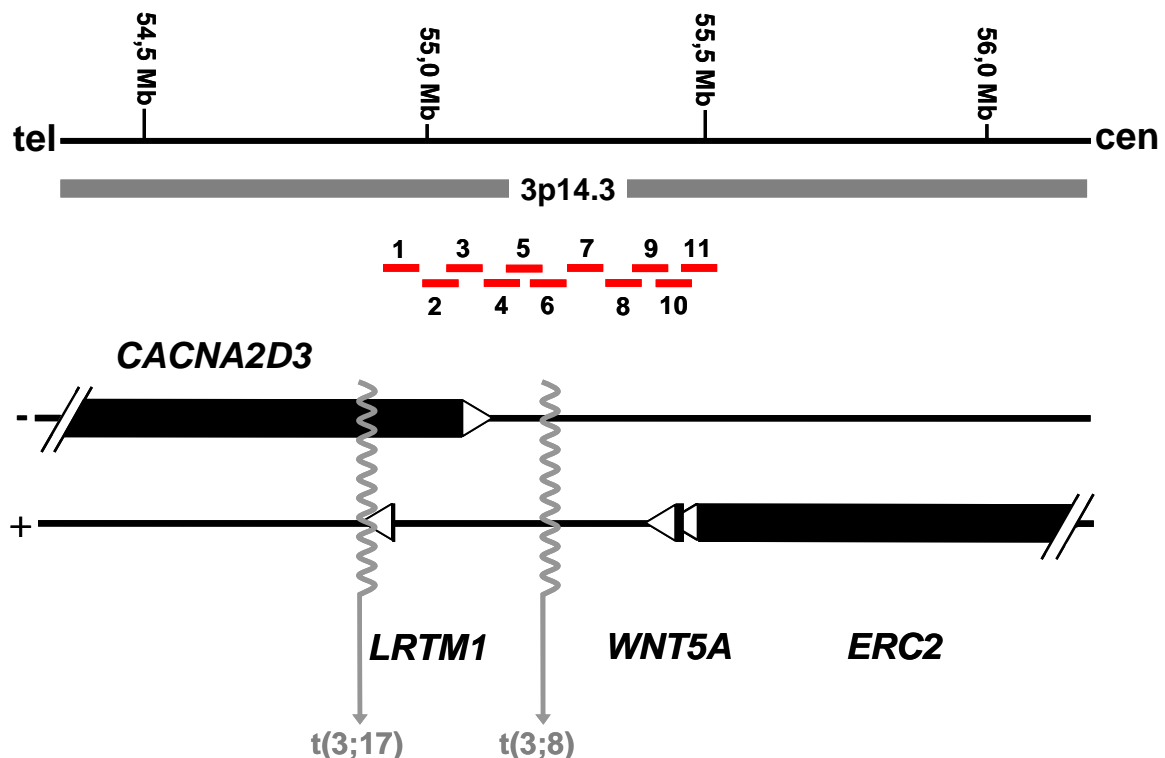
<sup>a</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Kontrollpersonen identifiziert; <sup>b</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Familienangehörigen des Patienten identifiziert; <sup>c</sup> Anzahl der homozygot vorliegenden Sequenzvariante; <sup>d</sup> Deletion der Nukleotide TTTGT; dbSNP: Datenbank „single nucleotid polymorphism“; rs: Referenznummer für den SNP in der NCBI-Datenbank.

Insgesamt wurden 53 Mutationen in den acht untersuchten Genen identifiziert (Tab. 11 und 12), von denen 13 nicht durch Datenbankrecherche als Sequenzvarianten verifiziert werden konnten. 23 Mutationen sind in den Kodierregionen, 29 in intronischen Bereichen und eine im untranslatierten 5'-Bereich der untersuchten Gene lokalisiert. Durch den Nachweis der nicht in Datenbanken beschriebenen Mutationen bei einem gesunden Elternteil oder bei einer Kontrollperson konnten diese als nicht-pathogene Sequenzvarianten eingestuft werden. Im *LRTM1*-Gen wurde keine Mutation detektiert.



#### 4. Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung zur Identifizierung möglicher submikroskopischer Deletionen in 3p14.3 bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom

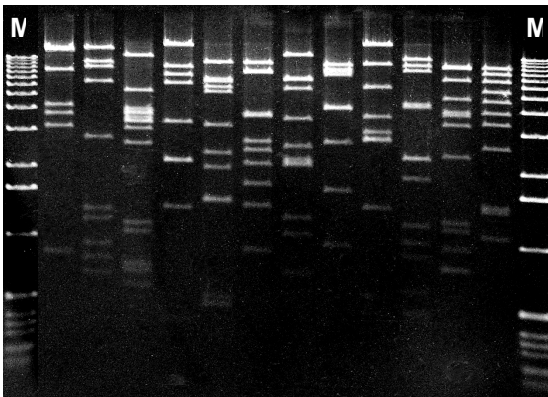
Für die Untersuchung, ob mögliche submikroskopische Deletionen in der Region 3p14.3 zur Ausprägung des ZLS-Phänotyps führen, wurden neben SNP- auch serielle FISH-Analysen mit Fosmid-Klonen durchgeführt. Die Lage der Fosmid-Sonden wurde mit Hilfe von Datenbankrecherchen ermittelt (Abb. 20).



**Abb. 20: Schematische Darstellung der physikalischen Bruchpunktregion in 3p14.3 und Lokalisation ausgewählter Fosmide**

Fosmid-Sonden sind durch rote, von 1 bis 11 nummerierte horizontale Linien dargestellt. Gene sind durch schwarze Balken abgebildet und bezeichnet; ihre 5'→3'-Orientierung ist durch eine Pfeilspitze wiedergegeben. Die Orientierung von Telomer (tel) nach Centromer (cen) ist angegeben. Oberhalb der Gene ist die chromosomale Region und der Maßstab in Megabasen (Mb) angezeigt. Die Translokationsbruchpunkte sind durch graue gewellte Linien, die in einen Pfeil münden, symbolisiert und bezeichnet. Fosmide aus der Bibliothek G248P8: 1: 6491B3; 2: 775F9; 3: 542G11; 4: 9115E9; 5: 6512A3; 6: 3425E7; 7: 4233F8; 8: 5465D4; 9: 962B7; 10: 5590H9; 11: 0032F7.

Die Fosmid-DNAs wurden aus kultivierten *E.coli* Zellen im Midi-Maßstab isoliert. Anschließend wurden die Fosmid-DNAs einem *EcoRI*-Restriktionsverdau zur Qualitäts- und Quantitätsüberprüfung unterzogen (Abb. 21).

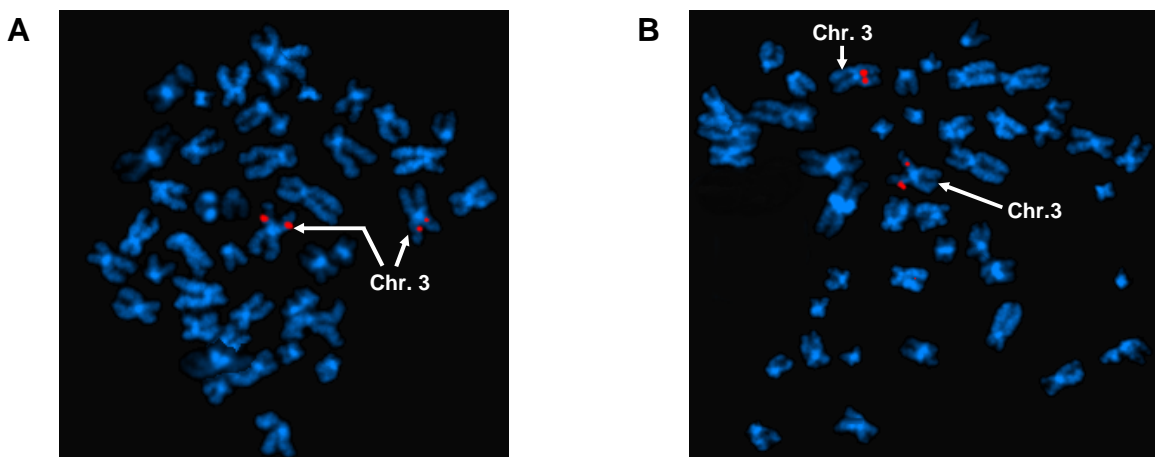


**Abb. 21: Exemplarische Darstellung der *EcoRI*-Restriktionsfragmente von isolierten Fosmid-Klonen aus der Region 3p14.3 im Agarosegel**

Das Foto zeigt ein Ethidiumbromid gefärbtes 0,8%-iges Agarosegel, in dem pro Spur jeweils 5  $\mu$ l isolierte Fosmid-DNA nach einem *EcoRI*-Verdau aufgetrennt wurde. M: 1 Kb DNA-Leiter.

Die Quantität und Qualität der isolierten Fosmid-DNAs war einheitlich.

Zeigte eine Fosmid-Sonde bei den FISH-Experimenten auf beiden homologen Metaphasechromosomen 3 ein Fluoreszenzsignal gleicher Intensität, konnte von einer entsprechend diploid vorliegenden Region ausgegangen werden (Abb. 22).



**Abb. 22: Exemplarische Darstellung von FISH-Experimenten an Metaphasechromosomen lymphoblastoider Zellen von Patient C**

Die Fosmid-Sonden 6 (3425E7) (A) und 5 (6512A3) (B) zeigten gleiche Fluoreszenzsignalintensitäten auf den homologen Metaphasechromosomen 3 (Chr. 3) von Patient C. Die Fosmid-Sonden sind mit Texas-Red markiert und die Chromosomen mit DAPI gefärbt.

Es konnten keine unterschiedlichen Fluoreszenzsignalintensitäten bzw. fehlende Fluoreszenzsignale für die verwendeten Fosmid-Sonden im Rahmen der durchgeführten FISH-Experimente identifiziert werden. Da lymphoblastoide Zelllinien einiger Patienten erst im Laufe der Arbeit generiert wurden, variiert die Anzahl der durchgeführten FISH-Experimente pro Patient. Die Ergebnisse sind zusammenfassend in Tab. 13 dargestellt.

Fosmid	Abkürzung der Fosmide*	ZLS-Patienten	Fluoreszenz- signale
6491B3	1	E, H, L, N	je 2
775F9	2	L, N	je 2
542G11	3	C, E, H, I, L, N	je 2
9115E9	4	C, E, H, I, L, N	je 2
6512A3	5	C, E, H, I, L, N	je 2
3425E7	6	C, E, H, I, L, N	je 2
4233F8	7	C, E, H, I, L, N	je 2
5465D4	8	C, E, H, I, L, N	je 2
962B7	9	C, H, N, M	je 2
5590H9	10	C, H, N, M	je 2
0032F7	11	C, H, N, M	je 2

**Tab. 13: Ergebnisse der FISH-Experimente zur Identifizierung möglicher submikroskopischer Deletionen in der Region 3p14.3 bei Patienten mit ZLS**

\*Fosmid-Abkürzungen sind korrespondierend zur Abb. 20 angegeben.

Durch die FISH-Experimente mit 11 Fosmid-Sonden aus der Region 3p14.3 wurde ein Bereich von ~540 Kb abgedeckt. Dieser Abschnitt beinhaltet in der telomerwärts gelegenen Region den 3'-Bereich des *CACNA2D3*-Gens und in der centromerwärts gelegenen Region das gesamte *WNT5A*-Gen und den 3'-Bereich des *ERC2*-Gens (Abb. 20). Im Rahmen der FISH-Experimente konnten keine submikroskopischen Deletionen festgestellt werden.

## 5. Expressionsanalyse ausgewählter Gene in der Region 3p14.3 bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom

Um zu untersuchen, ob Expressionsunterschiede von Genen aus der Region 3p14.3 bei sporadischen Patienten mit ZLS möglicherweise mit der Erkrankung in einem Zusammenhang stehen, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Die für diesen Zweck aus lymphoblastoiden Zellen isolierte RNA wurde zunächst zur Integritätsanalyse einer Agarosegelelektrophorese unterzogen. Es waren zwei Banden der ribosomalen RNA (28S und 18S rRNA) sowie ein Schmier der ebenfalls isolierten mRNA-Moleküle im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel zu erkennen (Abb. 23).

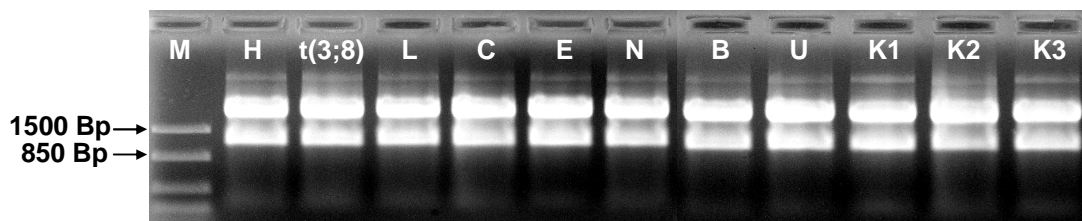


Abb. 23: Foto eines 0,8%-igen Agarosegels mit Gesamt-RNA aus lymphoblastoiden Zellen

Für Integritätsanalysen der isolierten Gesamt-RNA wurden je 3  $\mu$ l einer Agarosegelelektrophorese unter *RNase* reduzierten Bedingungen unterzogen. H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: ZLS-Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3; M: DNA-Marker. Die Größen von zwei Banden des DNA-Markers sind angegeben.

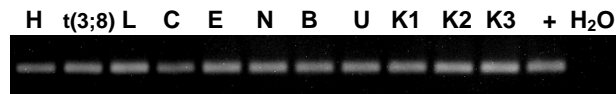
### 5.1 Semiquantitative RT-PCR-Analyse der Gene *WNT5A*, *C3orf63*, *CCDC66* und *ARHGEF3*

Um zu untersuchen, ob veränderte Expressionslevel der Gene *WNT5A*, *CCDC66*, *C3orf63* und *ARHGEF3* mit dem ZLS in Zusammenhang stehen könnten, wurden RT-PCR-Analysen für eine semiquantitative Transkriptquantifizierung durchgeführt. Für die cDNA-Synthese wurden Hexanukleotide und Gesamt-RNA aus synchronisierten lymphoblastoiden Zellen von acht Patienten mit ZLS sowie drei Kontrollpersonen verwendet. Die erfolgreiche cDNA-Synthese wurde zunächst durch Amplifikation eines Haushaltsgens, der Fumarat-Hydratase (*FH*), bestätigt (Daten nicht gezeigt).

Bei den nachfolgenden semiquantitativen RT-PCRs wurde die Zyklenanzahl so gewählt, dass die RT-PCR beendet wurde, als die Amplifikation noch in der exponentiellen Phase war. Die RT-PCR-Produkt-Quantifizierung der einzelnen Proben erfolgte durch densitometrische Messung der optischen Dichte (OD) der Bandenintensitäten im Ethidiumbromid gefärbten Agarosegel.

Um eine Normalisierung durchführen zu können, bei der die cDNA-Quantität und -Qualität der einzelnen Proben berücksichtigt wird, wurde eine RT-PCR, die in der frühen

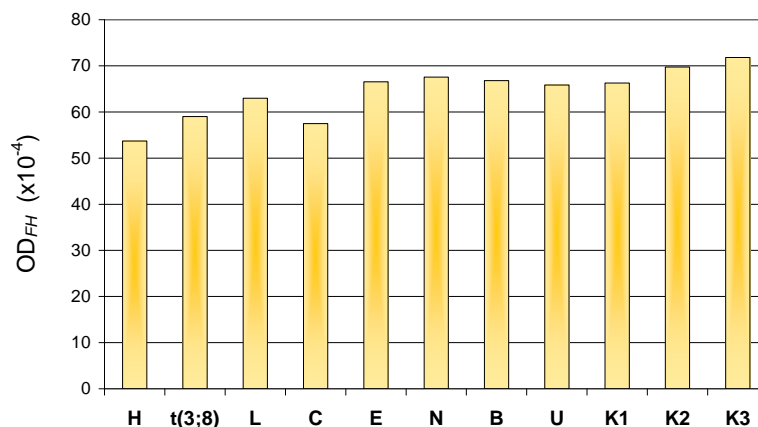
exponentiellen Phase beendet wurde, für die Ermittlung der Referenzgen-Expression durchgeführt (Abb. 24).



**Abb. 24: Ausschnitt des Ethidiumbromid gefärbten Agarosegels mit den Referenzgen-spezifischen RT-PCR-Produkten**

Für die Normalisierung der cDNA im Rahmen der semiquantitativen Expressionsanalyse wurde ein *FH*-Gen spezifisches Fragment von 322 Bp Länge in der RT-PCR mit 25 PCR-Zyklen amplifiziert. *FH*: Fumarat-Hydratase; H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: ZLS-Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3; +: Hoden-spezifische cDNA; H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle.

Die OD der RT-PCR-Produktbanden aus der frühen exponentiellen Phase der Referenzgen-Amplifikation wurden ermittelt (Abb. 25).

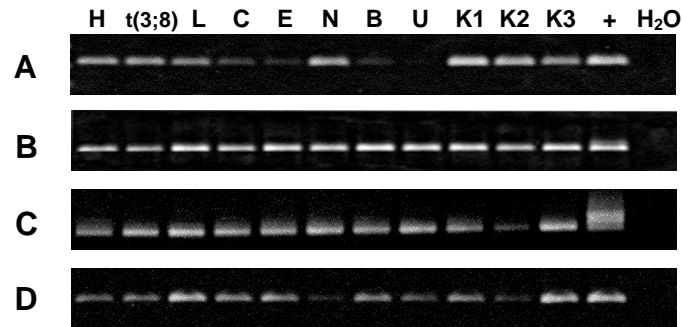


**Abb. 25: *FH*-Expression in lymphoblastoiden Zellen**

Die sequenzspezifischen RT-PCR-Produkte wurden durch Messung ihrer optischen Dichte (OD) nach Färbung mit Ethidiumbromid quantifiziert. *FH*: Fumarat-Hydratase; H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: ZLS-Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3.

Es zeigte sich der höchste Fluoreszenzwert bei Kontrollperson 3 und der niedrigste bei Patient H. Es ergab sich ein Mittelwert der OD-Werte von 64,34 bei einer Standardabweichung von 5,50 und folglich ein Variationskoeffizient von 8,54%. Es wurde somit eine relativ einheitliche *FH*-Expression in den untersuchten Zelllinien festgestellt.

Im Folgenden konnten spezifische RT-PCR-Produkte für die Gene *C3orf63*, *CCDC66* und *ARHGEF3* amplifiziert werden (Abb. 26).

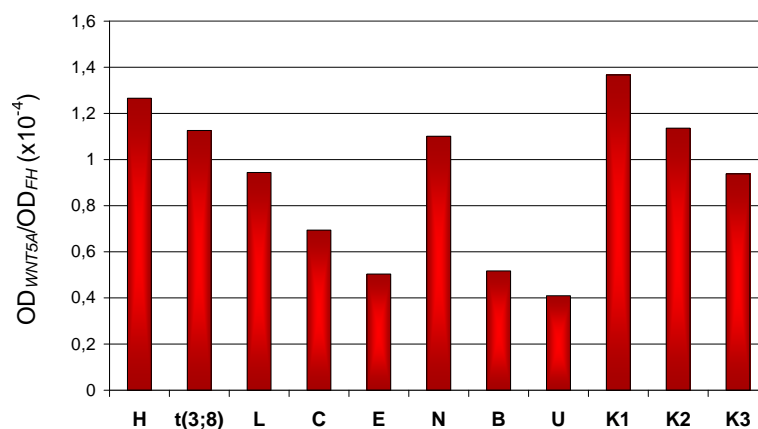


**Abb. 26:** Ethidiumbromid gefärbte Agarosegele mit spezifischen RT-PCR-Produkten für die semiquantitative Expressionsanalyse

(A) *WNT5A*-spezifische-, (B) *C3orf63*-spezifische-, (C) *CCDC66*-spezifische- und (D) *ARGHEF3*-spezifische RT-PCR-Produkte. H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: ZLS-Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3; +: Hodenspezifische cDNA; H<sub>2</sub>O: Wasserkontrolle.

Für die semiquantitative Berechnung der Expressionslevel wurde der Quotient aus den jeweils ermittelten OD-Werten der „gene of interest“ Amplikons ( $n = 1$ ) und denen des Referenzgens (*FH*) ( $n = 1$ ) gebildet.

Der *WNT5A*-Expressionslevel konnte für alle untersuchten 11 Zelllinien bestimmt werden (Abb. 27).



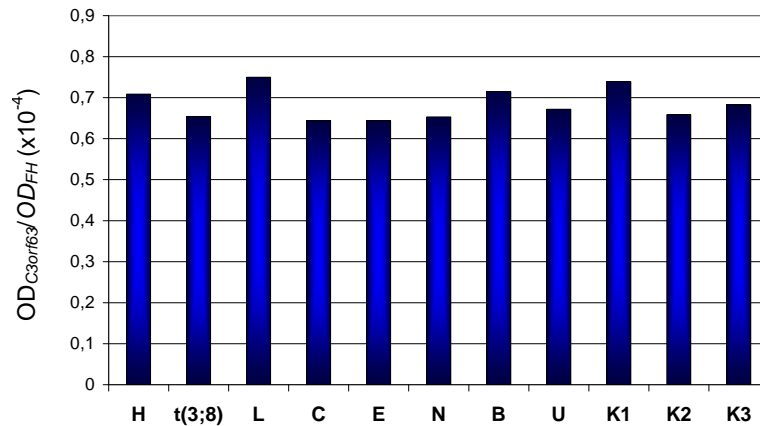
**Abb. 27:** *WNT5A*-Expression in lymphoblastoiden Zellen

Die sequenzspezifischen RT-PCR-Produkte wurden durch Messung ihrer optischen Dichte (OD) nach Färbung mit Ethidiumbromid quantifiziert. Um Konzentrationsschwankungen des cDNA-Ausgangsmaterials zu berücksichtigen, wurden die OD-Werte der *WNT5A*-Banden in Relation zu OD-Werten der entsprechenden *FH*-spezifischen Banden gesetzt. H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: ZLS-Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3.

Den höchsten relativen OD-Wert wies Kontrollperson 1 auf und damit das 3,4-fache im Vergleich zu Patient U. Bezüglich der ermittelten Werte konnten tendenziell zwei Gruppen gebildet werden. So zeigten zum einen die Patienten H, t(3;8), L und N sowie Kontrollpersonen 1, 2 und 3 ähnliche und andererseits die Patienten C, E, B und U vergleichbare relative *WNT5A*-Transkriptmengen. Die relativen Werte der 11 Zelllinien ergaben ein arithmetisches Mittel von 0,90, bei einer Standardabweichung von 0,32, und

demgemäß einen Variationskoeffizienten von 35,55%. Es konnte eine sehr variable *WNT5A*-Expression in den untersuchten Zelllinien dokumentiert werden.

Im Zuge der Analysen wurde das *C3orf63*-Expressionsniveau bestimmt (Abb. 28).

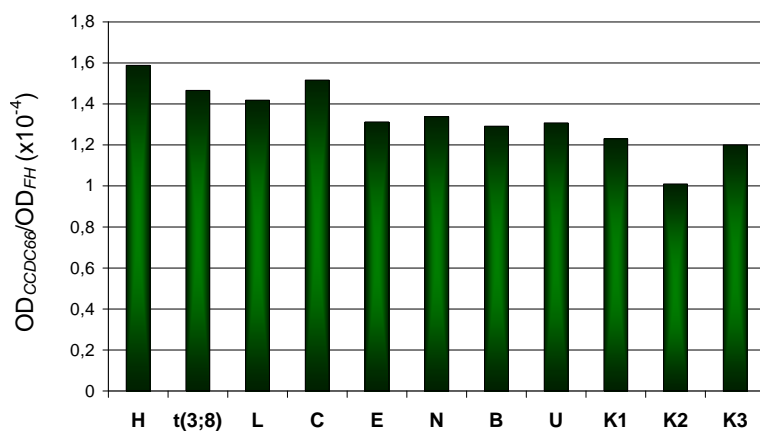


**Abb. 28: *C3orf63*-Expression in lymphoblastoiden Zellen**

Die sequenzspezifischen RT-PCR-Produkte wurden durch Messung ihrer optischen Dichte (OD) nach Färbung mit Ethidiumbromid quantifiziert. Um Konzentrationsschwankungen des cDNA-Ausgangsmaterials zu berücksichtigen, wurden die OD-Werte der *C3orf63*-Banden in Relation zu OD-Werten der entsprechenden *FH*-spezifischen Banden gesetzt. H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: ZLS-Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3.

Es wurden relative OD-Werte der *C3orf63*-RT-PCR-Produkte zwischen 0,64 (Patient C und E) und 0,74 (Patient L) gemessen. Insgesamt ergab sich aus den relativen Werten ein arithmetisches Mittel von 0,68, bei einer Standardabweichung von 0,03, und ergo ein Variationskoeffizient von 4,41%. Es konnte eine homogene *C3orf63*-Expression in den 11 untersuchten Zelllinien festgestellt werden.

Im Rahmen der semiquantitativen RT-PCR-Analysen wurde ferner die *CCDC66*-Expression untersucht (Abb. 29).

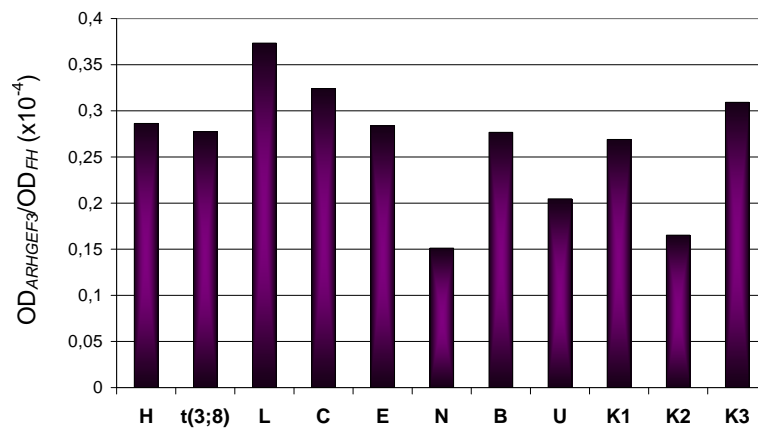


**Abb. 29: *CCDC66*-Expression in lymphoblastoiden Zellen**

Die sequenzspezifischen RT-PCR-Produkte wurden durch Messung ihrer optischen Dichte (OD) nach Färbung mit Ethidiumbromid quantifiziert. Um Konzentrationsschwankungen des cDNA-Ausgangsmaterials zu berücksichtigen, wurden die OD-Werte der *CCDC66*-Banden in Relation zu OD-Werten der entsprechenden *FH*-spezifischen Banden gesetzt. H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: ZLS-Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3.

Den höchsten relativen OD-Wert (1,58) zeigten die Zelllinien des Patienten H, den niedrigsten (1,00) die Zellen von Kontrollperson 2. Die densitometrischen relativen Werte ergaben ein arithmetisches Mittel von 1,33 bei einer Standardabweichung von 0,16. Demzufolge lag ein Variationskoeffizient von 12,03% vor. In den lymphoblastoiden Zelllinien von acht ZLS-Patienten und drei Kontrollpersonen konnte somit eine relativ homogene *CCDC66*-Expression festgestellt werden.

Des Weiteren wurden auch die *ARHGEF3*-Expressionslevel untersucht (Abb. 30).



**Abb. 30: *ARHGEF3*-Expression in lymphoblastoiden Zellen**

Die sequenzspezifischen RT-PCR-Produkte wurden durch Messung ihrer optischen Dichte (OD) nach Färbung mit Ethidiumbromid quantifiziert. Um Konzentrationsschwankungen des cDNA-Ausgangsmaterials zu berücksichtigen, wurden die OD-Werte der *CCDC663*-Banden in Relation zu OD-Werten der entsprechenden *FH*-spezifischen Banden gesetzt. H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: ZLS-Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3.

Zelllinien des Patienten N wiesen einen um den Faktor 2,4 geringeren Expressionswert im Vergleich zu denen von Patient L auf. Die gemessenen Werte der untersuchten Zelllinien können tendenziell in zwei Gruppen eingeteilt werden. Die Zellen der Patienten N und U sowie Kontrollperson 2 zeigten annähernd gleiche und die übrigen untersuchten Zelllinien von Patient H, t(3;8), L, C, E, B und Kontrollpersonen 1 und 3 wiesen ebenfalls relativ homogene OD-Werte auf. Zusammengefasst ergab sich ein arithmetisches Mittel der relativen Werte von 0,26 und eine Standardabweichung von 0,06. Der daraus berechnete Variationskoeffizient betrug 23,07%. Die *ARHGEF3*-Expression zeigte demgemäß bei den untersuchten Zelllinien starke Schwankungen.

Im Rahmen semiquantitativer RT-PCR-Analysen mit Hilfe von RNA aus lymphoblastoiden Zelllinien von acht ZLS-Patienten und drei Kontrollpersonen konnte sowohl eine sehr variable *WNT5A*- als auch *ARHGEF3*-Expression und eine relativ homogene *FH*-, *C3orf63*- und *CCDC66*-Expression dokumentiert werden.



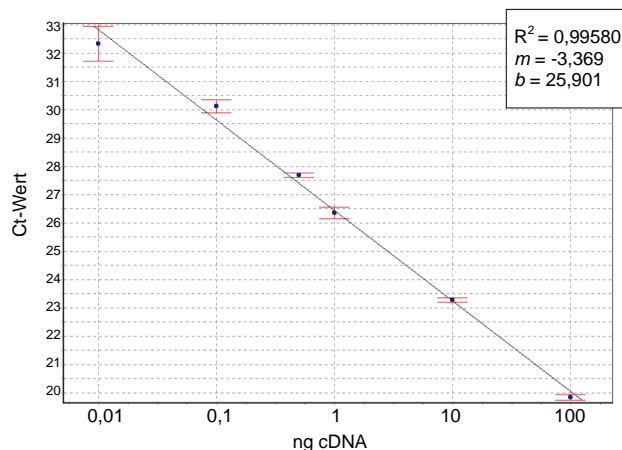
## 6. Quantitative real time-PCR-Analysen (qRT-PCR)

Die Expression des sowohl positionell als auch funktionell vielversprechenden ZLS-Kandidatengens *WNT5A* wurde durch quantitative Real-Time-PCR (qRT-PCR)-Analysen untersucht. Um die Effizienzen der qRT-PCRs zu bestimmen, wurde zunächst eine cDNA-Synthese mit genspezifischen Primern an Gesamt-RNA aus synchronisierten lymphoblastoiden Zellen durchgeführt, die im Anschluss daran in die qRT-PCR eingesetzt wurde.

### 6.1 Effizienzen der quantitativen real-time PCR

Die Reaktionseffizienzen der qRT-PCRs für die *WNT5A*- und Referenzgen-spezifischen Amplifikationen wurden durch sechs unterschiedliche cDNA-Konzentrationen, wovon fünf aus einer 1:10 Verdünnungsreihe hervorgingen, und den daraus erhaltenen Standardkurven ermittelt.

Die Standardkurve, die Steigung ( $m$ ) und der Y-Achsenabschnitt ( $b$ ) wurden von der Rotorgene-Software (entsprechend der Formel  $y = mx + b$ ) berechnet. Mit der Steigung der Standardkurve ( $m = -3,369$ ), die aus den *WNT5A*-spezifischen Amplifikationswerten hervorging (Abb. 31), wurde die Reaktionseffizienz berechnet.



**Abb. 31: Darstellung der Standardkurve zur Berechnung der qRT-PCR-Effizienz der *WNT5A*-spezifischen Amplikons**

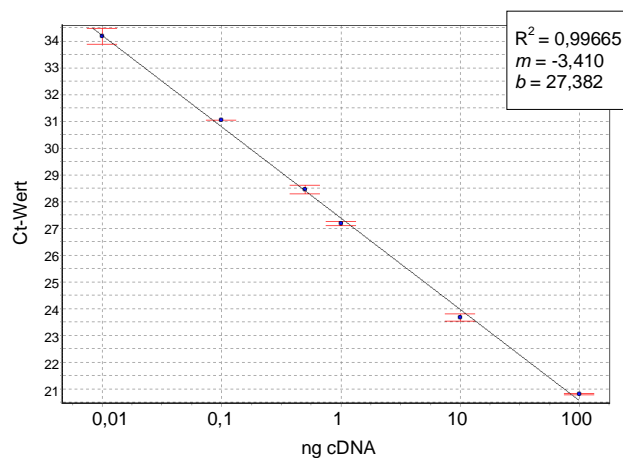
Die X-Achse gibt die cDNA-Konzentrationen und die Y-Achse die korrespondierenden Ct-Werte an. Die Standardabweichungen der als Duplikate durchgeführten Reaktionen ( $n = 1$ ) sind im Diagramm durch rote Fehlerbalken angegeben.  $R^2$ : Korrelationskoeffizient;  $m$ : Steigung;  $b$ : Y-Achsenabschnitt.

$$(WNT5A\text{-Reaktionseffizienz}) E = [10^{(-1/-3,369)}] - 1 = 0,9807 (= 98,07\%)$$

Im Fall der *WNT5A*-spezifischen Amplikons wurde eine Reaktionseffizienz der qRT-PCR von 98% berechnet. Um ein Referenzgen für die Expressionsanalysen vorliegen zu haben, wurden verschiedene Gene ausgewählt: *GAPDH* (Glyceraldehyd 3-Phosphatdehydrogenase), *HPRT*

(Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase), *TBP* (TATA-Box bindendes Protein), *RPII* (RNA-Polymerase II), *TUBA1A* (Tubulin  $\alpha$  1a) und *ACTB* (Aktin  $\beta$ ). Die Reaktionseffizienzen der entsprechenden Amplikons wurde ebenfalls bestimmt. Für die angewendete Berechnungsmethode der Transkriptmengen [ $\Delta\Delta C_t$ -( $\Delta\Delta C_t$ )-Methode] ist es erforderlich, dass Referenzgen und „gene of interest“ eine annähernd gleiche Reaktionseffizienz aufweisen.

Mit der Steigung der Standardkurve ( $m = -3,410$ ), die aus den *TBP*-spezifischen Amplifikationswerten hervorging (Abb. 32), wurde die Reaktionseffizienz berechnet.



**Abb. 32: Darstellung der Standardkurve zur Berechnung der qRT-PCR-Effizienz der *TBP*-spezifischen Amplikons**

Die X-Achse gibt die cDNA-Konzentrationen und die Y-Achse die korrespondierenden Ct-Werte an. Die Standardabweichungen der als Duplikate durchgeführten Reaktionen ( $n = 1$ ), sind im Diagramm durch rote Fehlerbalken angegeben.  $R^2$ : Korrelationskoeffizient;  $m$ : Steigung;  $b$ : Y-Achsenabschnitt.

$$(\textit{TBP}\text{-Reaktionseffizienz}) E = [10^{(-1/-3,41)}] - 1 = 0,9645 (= 96,45\%)$$

Die Reaktionseffizienz der qRT-PCR des *TBP*-spezifischen Amplikons betrug 96%. Im Fall der *GAPDH*-spezifischen Amplifikation wurde durch die ermittelte Steigung der Standardkurve ( $m = -3,442$ ) eine Reaktionseffizienz von 95% berechnet. Die Reaktionseffizienzen der Gene *TUBA1A* und *ACTB* lagen bei 89% und 85%. Die Ergebnisse der qRT-PCR-Effizienzanalysen sind in Tabelle 14 zusammengefasst.

Gen	Reaktionseffizienz der quantitativen real-time PCR [%]	Amplifikationseffizienz der quantitativen real- time PCR
<i>WNT5A</i>	98	1,98
<i>HPRT</i>	94	1,94
<i>GAPDH</i>	95	1,95
<i>TBP</i>	96	1,96
<i>RPII</i>	90	1,90
<i>TUBA1A</i>	89	1,89
<i>ACTB</i>	85	1,85

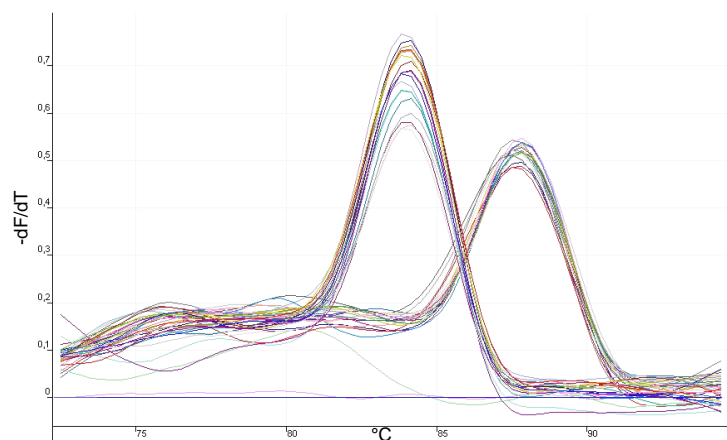
**Tab. 14: *WNT5A*- und Referenzgen-spezifische Reaktions- und Amplifikationseffizienzen der quantitativen real-time PCR**

Die Reaktionseffizienz beschreibt die prozentuale Amplifikation des Zielamplikons pro Zyklus, die Amplifikationseffizienz die Quantität des amplifizierten Zielamplikons pro Zyklus in der exponentiellen Phase der Reaktion. Eine 100%-ige Reaktionseffizienz würde in einem Amplifikationswert von 2 resultieren, was eine Verdopplung eines Amplikons in jedem Zyklus bedeuten würde.

Aufgrund der geringen Unterschiede zwischen den Reaktionseffizienzen der *WNT5A*-, *TBP*- und *GAPDH*-Amplikons wurden bei den nachfolgenden Untersuchungen die beiden letztgenannten als Referenzgene verwendet.

## 6.2 *WNT5A*-Expressionsanalyse mit Hilfe der qRT-PCR

Zunächst wurde die Spezifität der zu amplifizierenden Produkte der Referenzgene und des *WNT5A*-Gens durch die Analyse der Schmelztemperatur der entsprechenden Amplikons überprüft (Abb. 33).

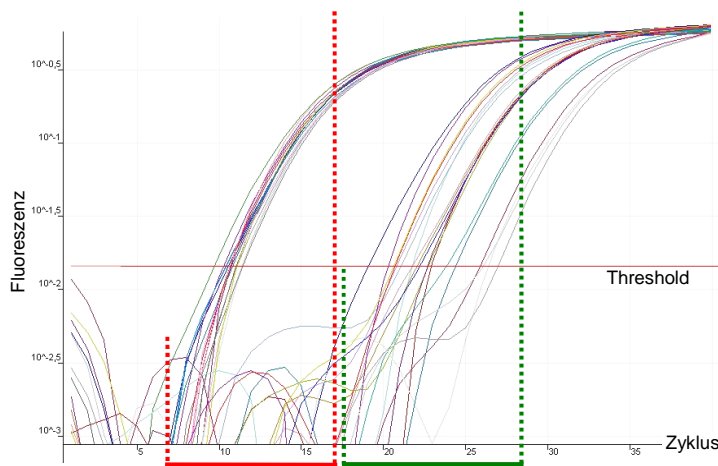


**Abb. 33: Exemplarische Darstellung der Schmelzkurvenanalyse der *WNT5A*- und *GAPDH*-Amplikons**

Von links nach rechts: Amplituden der Schmelzkurven der *WNT5A*- und *GAPDH*-spezifischen Amplikons. X-Achse: Grad Celsius (°C); Y-Achse: erste negative Ableitung der Fluoreszenzänderung pro Temperaturanstieg (-dF/dT).

Die synchronen Schmelzkurven der einzelnen Amplikons, mit jeweils einer Amplitude, zeigten, dass ein spezifisches qRT-PCR-Produkt vorlag.

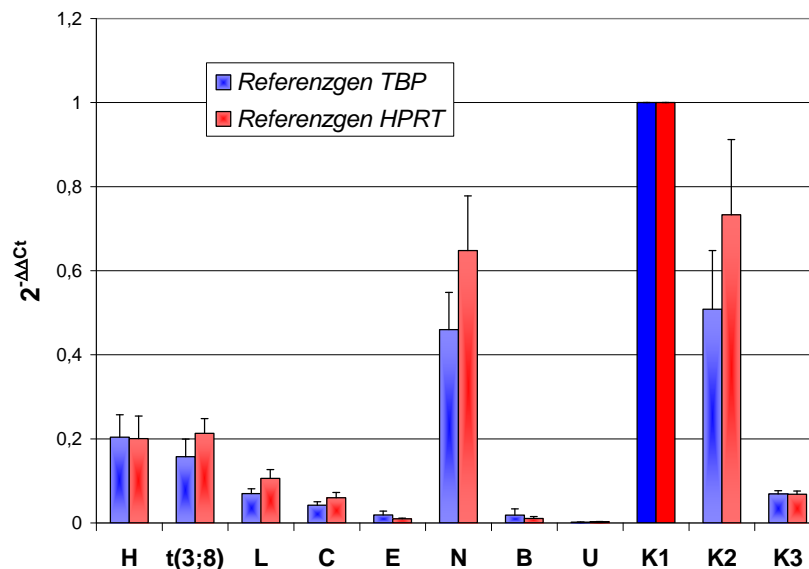
Bei einer halblogarithmischen Darstellung der im Verlauf einer qRT-PCR gemessenen Fluoreszenzwerte zeigten sich, bedingt durch stark differierende Ct-Werte, deutliche Unterschiede in der *WNT5A*-Expression (Abb. 34).



**Abb. 34: Diagramm der gemessenen Fluoreszenzen der *WNT5A*- und *GAPDH*-Amplikons in halblogarithmischer Darstellung, aufgetragen gegen die Zykluszahl einer quantitativen real-time PCR**

Die halblogarithmische Darstellung der Fluoreszenz auf der Y-Achse ermöglicht eine eindeutige Abbildung der exponentiellen Amplifikationsphase. Der Zyklus-Schwellenwert (Threshold) ist durch eine rote horizontale Linie dargestellt. Etwa ab Zyklus 7 beginnt die exponentielle Phase der *GAPDH*- (durch gestrichelte rote Linien eingegrenzt), etwa ab Zyklus 17 die der *WNT5A*-spezifischen Amplikons (durch gestrichelte grüne Linien eingegrenzt).

Die relativen *WNT5A*-Expressionswerte wurden mit der  $\Delta\Delta C_t$ -Methode berechnet. Es zeigte sich eine sehr unterschiedliche *WNT5A*-Expression zwischen den getesteten Zelllinien der acht ZLS-Patienten und denen von drei Kontrollpersonen (Abb. 35).



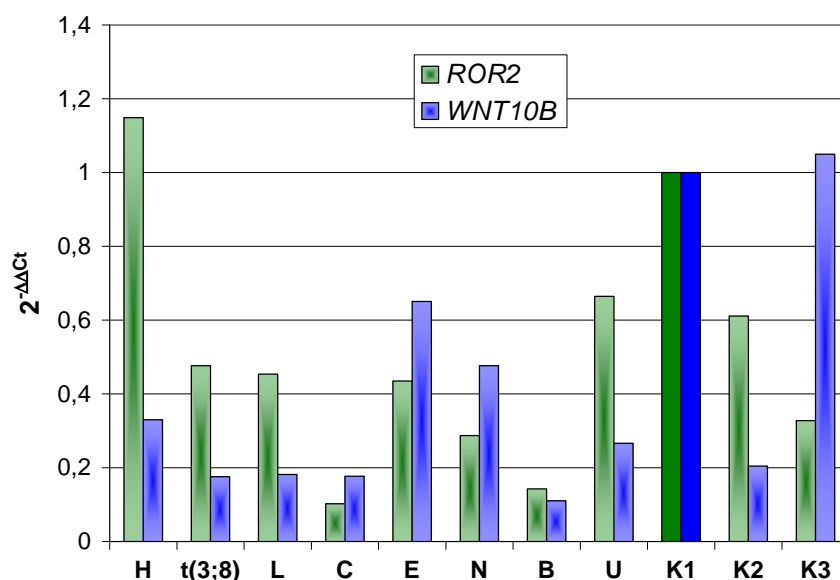
**Abb. 35: Das relative *WNT5A*-Expressionsniveau synchronisierter lymphoblastoider Zellen von acht ZLS-Patienten und drei Kontrollpersonen (Referenzen *TBP* bzw. *HPRT*)**

Die relativen Expressionswerte sind als Balken mit Fehlerindikatoren für die Standardabweichung dargestellt. Auf der X-Achse sind die Patienten bzw. Kontrollen und auf der Y-Achse die relativen Expressionswerte ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) angegeben. Es wurden Duplikate der Reaktionen durchgeführt. *WNT5A* (n=3) und *HPRT* (n=1), *WNT5A* (n=6) und *TBP* (n=1). K1 wurde als interner Kalibrator verwendet. H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: ZLS-Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3.

Neben den deutlich differierenden Expressionswerten bei Einzelvergleichen der untersuchten Zelllinien konnten aufgrund gleicher Tendenzen der Expressionswerte Gruppen gebildet werden. Dabei zeigten die Expressionswerte der Zelllinien von Patient E, B und U, als erste Gruppe, das geringste Expressionsniveau ( $2^{-\Delta\Delta Ct} \approx 0,01$ ). Die Zelllinien von Patienten L, C und Kontrollperson 3, als zweite Gruppe, wiesen im Durchschnitt, im Vergleich zu Gruppe eins, eine um den Faktor sieben erhöhte *WNT5A*-Expression auf ( $2^{-\Delta\Delta Ct} \approx 0,07$ ). Die Zelllinien von Patient H und t(3;8), als dritte Gruppe, zeigte einen etwa dreifach höheren *WNT5A*-Expressionswert ( $2^{-\Delta\Delta Ct} \approx 0,2$ ) im Vergleich zur zweiten Gruppe. Die Zelllinien von Patient N, Kontrollperson 1 und 2 stellen die vierte Gruppe dar und wiesen mit der höchsten *WNT5A*-Expression, im Vergleich zur dritten Gruppe, um den Faktor dreieinhalb gesteigerte Werte auf ( $2^{-\Delta\Delta Ct} \approx 0,7$ ) (Abb. 35).

### 6.3 *WNT10B*- und *ROR2*-Expressionsanalyse mit Hilfe der qRT-PCR

Um zu untersuchen, ob die unterschiedlich starke Expression für Gene der *WNT*-Familie in lymphoblastoiden Zellen charakteristisch ist, wurden auch die *WNT10B*-Expressionslevel untersucht. Zusätzlich wurde das Expressionsniveau des *ROR2*-Gens, einem nicht kanonischen *WNT5A*-Rezeptor analysiert. Die *WNT10B*- und *ROR2*-Expressionswerte sind in der Abb. 36 graphisch dargestellt.



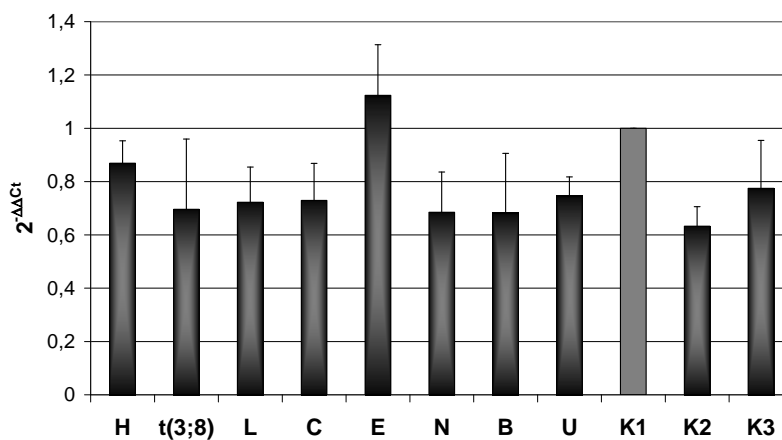
**Abb. 36: Das relative *WNT10B*- und *ROR2*-Expressionsniveau synchronisierter lymphoblastoider Zellen von acht ZLS-Patienten und drei Kontrollpersonen (Referenzgen *TBP*)**

Die relativen *ROR2*- und *WNT10B*-Expressionswerte sind als Balken dargestellt. An der X-Achse sind die Patienten bzw. Kontrollen und an der Y-Achse die relativen Expressionswerte ( $2^{-\Delta\Delta Ct}$ ) aufgetragen. Es wurden Duplikate der Reaktionen ( $n=1$ ) durchgeführt, der Standardmittelwert gebildet, K1 als interner Kalibrator und *TBP* als Referenzgen verwendet. H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3.

Es zeigten sich ebenfalls sehr variable *WNT10B*- und *ROR2*-Expressionswerte bei den elf untersuchten Zelllinien. Von den niedrigsten Werten ausgehend lagen Schwankungen der Expressionswerte mit dem Faktor 10 vor.

#### 6.4 Verifizierung der qRT-PCR

Da für die drei Gene *WNT5A*, *WNT10B* und *ROR2* sehr unterschiedliche Expressionswerte in 11 analysierten Zelllinien bestimmt wurden, sollte, um methodische Fehler auszuschließen, die Expression eines Referenzgens (*HPRT*) untersucht werden (Abb. 37).



**Abb. 37: Das *HPRT*-Expressionsniveau synchronisierter lymphoblastoider Zellen von acht ZLS-Patienten und drei Kontrollpersonen (Referenzgen *TBP*)**

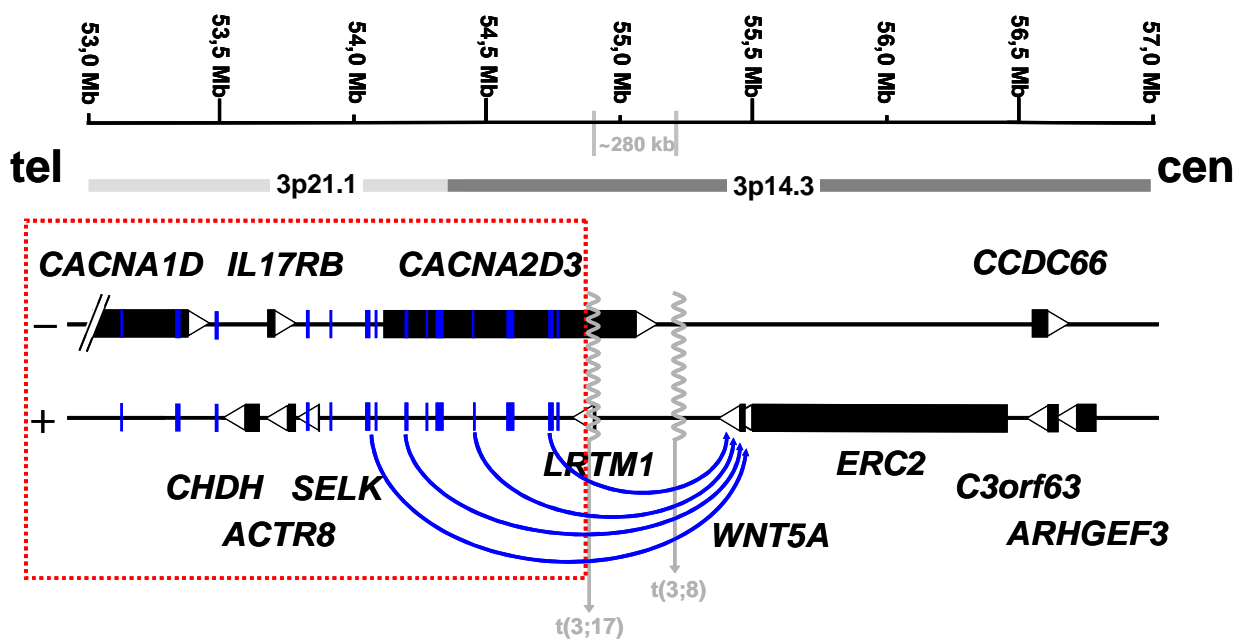
Die berechneten Expressionswerte sind als Balken mit Fehlerindikatoren der Standardabweichung dargestellt. An der X-Achse sind die Patienten bzw. Kontrollen und an der Y-Achse die relativen Expressionswerte ( $2^{-\Delta\Delta C_t}$ ) aufgetragen. Es wurden Duplikate der Reaktionen ( $n=3$ ) durchgeführt, K1 als interner Kalibrator und *TBP* als Referenzgen verwendet. Es wurde der Standardmittelwert der berechneten  $2^{-\Delta\Delta C_t}$ -Werte gebildet. H, t(3;8), L, C, E, N, B, U: Patienten; K1, K2, K3: Kontrollpersonen 1-3.

Bei der Bestimmung der *HPRT*-Expressionswerte, unter Zuhilfenahme des *TBP* als Referenzgen, zeigte sich der niedrigste relative Expressionswert bei der Zelllinie von Kontrollperson 2 ( $2^{-\Delta\Delta C_t} = 0,63$ ) und der höchste bei Zellen von Patient E ( $2^{-\Delta\Delta C_t} = 1,12$ ).

Zusammengenommen wiesen die 11 untersuchten Zelllinien, Patient E ausgenommen, annähernd gleiche *HPRT*-Expressionslevel auf (Abb. 36).

## 7. Identifizierung und Mutationsanalyse von konservierten nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen in der Region 3p14.3

Durch die 3;8- und die 3;17-Translokation wurde die jeweils distal vom Chromosom 3-Bruchpunkt gelegene Region aus ihrem genomischen Kontext entfernt und damit auch putative *cis*-regulatorische DNA-Sequenzelemente (Abb. 38). Solche Sequenzelemente wurden unter anderem als „conserved nongenic sequences“ (CNGs) beschrieben und sind möglicherweise für eine korrekte zeitliche und örtliche Expression von Genen in der Region 3p21.1-14.3 verantwortlich (Dermitzakis *et al.*, 2005).



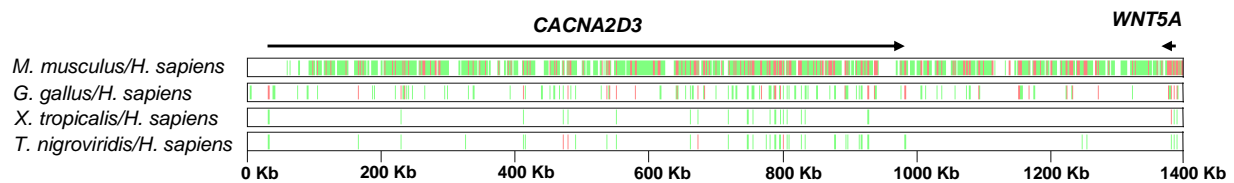
**Abb. 38:** Schematische Darstellung der t(3;8)- und t(3;17)-Translokationsbruchpunkte und Markierung der dadurch aus dem genomischen Kontext entfernten telomerwärts gelegenen Region

Die durch beide Translokationen aus ihrem genomischen Kontext entfernte Region ist mit rot gestrichelten Linien eingerahmt. Gene sind durch schwarze Balken abgebildet und bezeichnet; ihre 5'→3'-Orientierung ist durch eine Pfeilspitze wiedergegeben. Die Orientierung von Telomer (tel) nach Centromer (cen) ist angegeben. Oberhalb der Gene sind die chromosomalen Regionen als graue horizontale Balken und der Maßstab in Megabasen (Mb) angezeigt. Die Translokationsbruchpunkte sind durch graue gewellte Linien, die in einen Pfeil münden, symbolisiert und bezeichnet. Putative *cis*-regulatorische DNA-Sequenzelemente sind schematisch durch blaue vertikale Linien angedeutet. Blaue Pfeile symbolisieren exemplarisch einen möglichen regulatorischen Einfluss von konservierten nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen auf die Expression des *WNT5A*-Gens.

Um zu untersuchen, ob Mutationen in CNGs bei ZLS-Patienten zur Ausprägung des Syndroms führen, sollten insbesondere CNGs in dem in der Abb. 38 gekennzeichneten Bereich untersucht werden.

### 7.1 Vorarbeiten: Identifizierung von konservierten nicht-kodierenden Sequenzbereichen mit Hilfe von Interspezies-DNA-Sequenzvergleichen

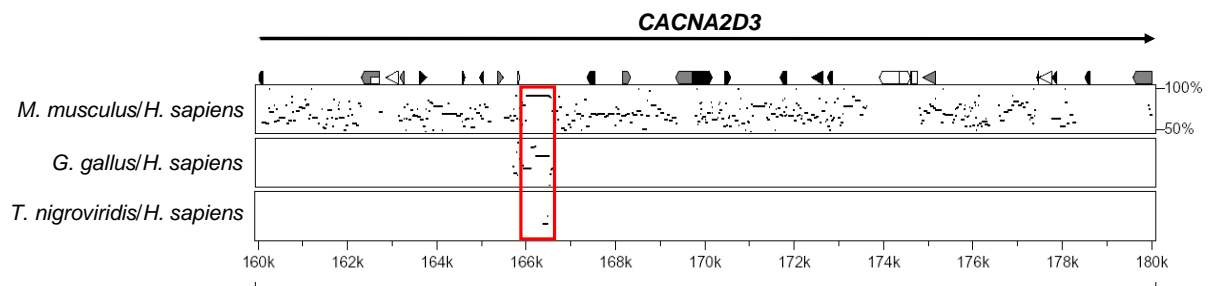
Die Identifizierung von CNGs in einem 1,4 Mb umfassenden Abschnitt in der Region 3p21.1-p14.3 gelang Herrn Dr. M. Niedermaier (MPI für molekulare Genetik, Berlin) im Rahmen einer wissenschaftlichen Kollaboration, unter Verwendung der Software „PipMaker“ („Percent identity plot Maker“) (Schwartz *et al.*, 2000). Es handelt sich hierbei um einen Homologievergleich zwischen der genomischen humanen Sequenz und den jeweils homologen genomischen Sequenzen der vier Organismen Maus (*Mus musculus*), Huhn (*Gallus gallus*), Krallenfrosch (*Xenopus tropicalis*) und Kugelfisch (*Tetraodon nigroviridis*) (Abb. 39).



**Abb. 39: Übersicht der „PipMaker“-Ergebnisse eines 1,4 Mb Bereichs aus der Region 3p21.1-p14.3**

Die beiden Spezies, deren DNA-Sequenzen jeweils miteinander verglichen wurden, sind links angegeben. Konservierte DNA-Sequenzelemente sind mit grünen Längsstrichen und hochkonservierte mit roten gekennzeichnet. Die relative Lage von Genen und deren 5'→3' Orientierung sind durch Pfeile oberhalb dargestellt. Der Maßstab ist in Kb unterhalb der Abb. Angegeben.

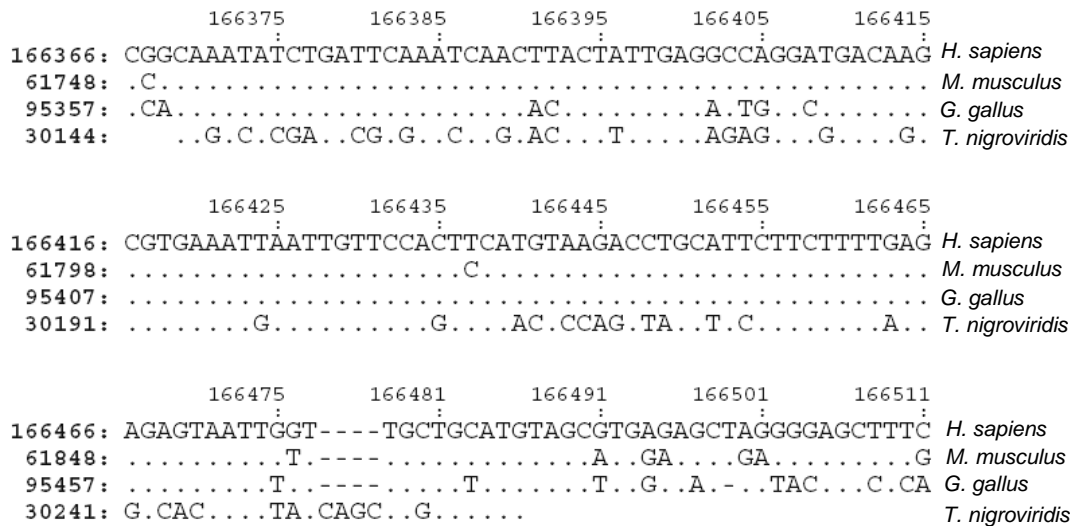
In einer Übersichtsdarstellung der „PipMaker“-Ergebnisse wurden homologe Bereiche grün und hochkonservierte Bereiche rot dargestellt (Abb. 39). Die graphische Detaildarstellung des „MultiPip“ (Abb. 40) und die des entsprechenden Sequenzhomologievergleichs (Abb. 41) der analysierten Region dienen für die Selektion von CNGs für die Mutationsanalyse.



**Abb. 40: Ausschnitt eines „MultiPip“ („multi percent identity plot“)**

Homologe Sequenzbereiche sind als horizontale Linien dargestellt, wobei die Linienhöhe in einer Zeile Auskunft über den prozentualen Grad der Homologie gibt (s. oberste Zeile rechts, 50-100%). Ein in drei Organismen zur humanen Sequenz homologer Abschnitt ist rot eingerahmt. Die Basennummerierung ist unterhalb in Kb (k) angegeben. Bekannte DNA-Sequenzelemente sind oberhalb durch folgende Symbole angegeben: Gen: →; RNA: □; LINE2 („long interspersed element 2“): ■; LTR („long terminal repeat“): ▒; andere repetitive Elemente: ►; CpG/GpC ≥ 0,6: ◄; „simple DNA repeat“: □; MIR („mammalian interspersed repeat“): ►

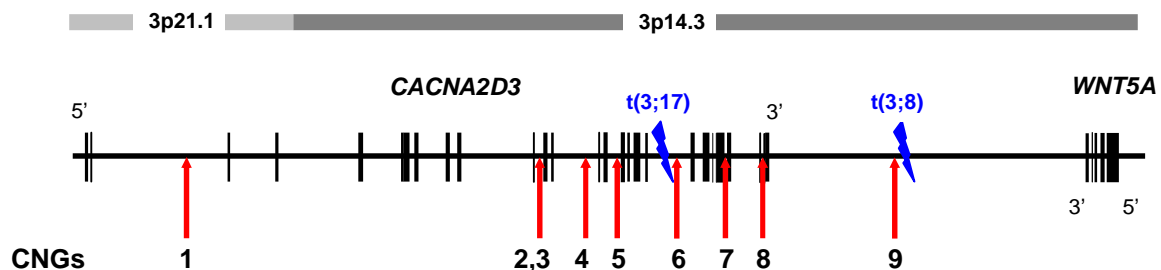




**Abb. 41: Ausgewählter Sequenzhomologievergleich nach „MultiPip“-Analyse**

Die Zugehörigkeit der jeweiligen Sequenzen ist rechts, die Nummerierung der Basen ist links und oberhalb angegeben. Zur humanen Sequenz homologe Nukleotide sind durch einen Punkt, abweichende Nukleotide in den jeweiligen Sequenzen durch die entsprechende Base und nicht vorhandene Basen durch einen horizontalen Strich dargestellt. MultiPip: „multi percent identity plot“.

Kriterium für die CNGs-Auswahl war eine mindestens 100 Bp umfassende 70%-ige, ohne Unterbrechungen vorliegende Homologie von humaner Sequenz zu Sequenzen von zwei weiteren Organismen. Zeigten Sequenzen von mehr als zwei Organismen Übereinstimmungen, favorisierte dies den entsprechenden Sequenzbereich zusätzlich für eine Mutationsanalyse. Dementsprechend wurden neun nicht-kodierende DNA-Sequenzelemente in der Region 3p21.1-3p14.3 selektiert (Abb. 42).



**Abb. 42: Lokalisation der via „PipMaker“-Analyse selektierten CNGs für eine Mutationsanalyse in einem 1,4 Mb großen Bereich in 3p21.1-p14.3**

Die Lokalisation von neun konservierten, nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen ist durch rote, nummerierte Pfeile angezeigt. Die Exons von zwei Genen (*CACNA2D3* und *WNT5A*) sind als schwarze vertikale Linien dargestellt. Die 5'→3'-Orientierung der Gene ist angegeben. Die Bruchpunkte der Translokationen sind entsprechend beschriftet und durch blaue Blitze in der genomischen Sequenz markiert. Die chromosomalen Regionen sind oben durch beschriftete graue horizontale Linien angedeutet. Pip: „percent identity plot“; CNG: „conserved nongenic sequence“.

Vier der CNGs (6-9) liegen in der Region zwischen den beiden Chromosom 3-Bruchpunkten der t(3;8)- und t(3;17)-Translokation, fünf der CNGs (1-5) sind distal beider Bruchpunkte lokalisiert (Abb. 41).

## 7.2 Mutationsanalyse von konservierten nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen bei sechzehn Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom

Die CNGs enthaltenden PCR-Produkte, mit einer Länge von 450 bis 850 Bp, wurden bei 16 ZLS-Patienten (Patient A-L, N-Q) einer Mutationsanalyse unterzogen. Dazu wurden Primerpaare abgeleitet, die eine Amplifikation der konservierten Bereiche ermöglichten. Nach Etablierung der PCR-Bedingungen an Kontroll-DNA wurden die CNGs aus genomischer DNA von ZLS-Patienten amplifiziert und nachfolgend eine Sequenzierung durchgeführt. Es konnten Mutationen in den untersuchten CNGs detektiert werden (Tab. 15).

CNG	Nukleotid-austausch in NT_022517.17	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
1	g.54231565T>C	10/32 (1) <sup>c</sup>	rs9864201
2	g.54644622G>A <sup>a</sup>	1/32	
3	g.54707499G>A	16/32 (5) <sup>c</sup>	rs11707823
6	g.54957790A>G	10/32 (2) <sup>c</sup>	rs3773582
9	g.55296766C>G	6/32 (1) <sup>c</sup>	rs1000408
9	g.55296895C>T	3/32	rs9818883
9	g.55297006G>T	8/32	rs7625746

**Tab. 15: Identifizierte Sequenzvarianten in neun untersuchten CNGs**

<sup>a</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Kontrollpersonen identifiziert; <sup>c</sup> Anzahl der homozygot vorliegenden Sequenzvariante; dbSNP: Datenbank „single nucleotide polymorphism“; rs: Referenznummer für den SNP in der NCBI-Datenbank; CNG: „conserved nongenic sequence“.

Der genomische Chromosom 3 Sequenzcontig NT\_022517.17, welcher die Sequenzen der neun untersuchten CNGs beinhaltet, diente zur positionellen Angabe der Mutationen. Eine der sieben identifizierten Mutationen, g.54644622g>a, konnte heterozygot bei Kontrollpersonen nachgewiesen und damit als nicht-pathogene Sequenzvariante eingestuft werden. Durch Datenbankrecherche konnte ermittelt werden, dass es sich bei den restlichen sechs Mutationen ebenfalls um SNPs handelt.

## 8. Mutationsanalyse von acht funktionellen Kandidatengen (ROR2, FZD2, FZD5, FZD7, DKK1, DKK2, DKK3 und DKK4)

### 8.1 Vorbemerkungen

Da keine pathogenen Mutationen bei Patienten mit ZLS im *WNT5A*-Gen identifiziert werden konnten, wurden Gene, dessen Genprodukte im Wnt5a-Signalweg impliziert sind, als Kandidatengene angenommen. Der nicht kanonische Wnt5a-Rezeptor ROR2, die Wnt5a-Rezeptoren Frizzled 2, 5 und 7 (FZD2, FZD5, FZD7) sowie vier extrazelluläre Modulatoren des kanonischen Wnt-Signalwegs, Dickkopf 1-4 (DKK1-4), wurden als funktionelle Kandidatengene ausgewählt und einer Mutationsanalyse unterzogen.

### 8.2 Mutationsanalyse der Gene ROR2, FZD2, FZD5, FZD7 und DKK1-4

Um eine Mutationsanalyse der funktionellen Kandidatengene bei 16 sporadischen Patienten mit ZLS (Patient B, C, E-H, J, K, L, N-T) durchführen zu können, wurde zunächst die Exon-Intron-Struktur der Gene mit Hilfe des BLAT-„Tools“ bestimmt und exonflankierende Primer abgeleitet. Die Etablierung optimaler PCR-Bedingungen für jedes Amplikon wurde an genomischer DNA von Kontrollpersonen durchgeführt. Anschließend wurden die Exons aus genomischer DNA der Patienten amplifiziert und die Produkte durch Agarosegelelektrophorese auf Qualität und Quantität hin überprüft. Die PCR-Produktgrößen lagen zwischen 238-650 Bp, und die Amplikons wurden direkt sequenziert. Neben den Kodierregionen wurden jeweils ~40 Bp der exonflankierenden intronischen Sequenzen einer Mutationsanalyse unterzogen.

Das *ROR2*-Gen kartiert auf dem Chromosom 9 in der Region q22 und überspannt auf genomischer DNA-Ebene einen Bereich von 387 Kb. Durch alternatives Spleißen werden acht verschiedene Transkripte gebildet, von denen jedes eine putative Isoform des Proteins kodiert. Das *FZD2*-Gen umfasst auf genomischer DNA-Ebene einen Bereich von ~4,2 Kb, kartiert auf dem Chromosom 17 in der Region q21 und weist ein Exon auf. Das *FZD5*-Gen kartiert auf dem Chromosom 2 in der Region q33-q34 und überspannt auf genomischer DNA-Ebene einen Bereich von ~7 Kb. Es weist vier Exons auf, und es wird ein Transkript, aus welchem zwei Isoformen resultieren, gebildet. Das *FZD7*-Gen überspannt auf genomischer DNA-Ebene einen Bereich von ~3,8 Kb, kartiert auf dem Chromosom 2 in der Region q33 und weist ein Exon auf. *DKK1* kartiert auf Chromosom 10 in der Region q11.2 und überspannt auf der Ebene genomischer DNA ~3,8 Kb. Das Gen weist 5 Exons auf und es

werden vier verschiedene Transkripte gebildet, die drei Proteinisoformen kodieren. Das *DKK2*-Gen umfasst auf genomischer DNA-Ebene ~362 Kb und kartiert auf dem Chromosom 4 in der Region q25. Es besteht aus vier Exons und durch alternatives Spleißen werden drei unterschiedliche Transkripte gebildet, die für putative Isoformen kodieren. *DKK3* kartiert auf Chromosom 11 in der Region p15.2 und überspannt auf Ebene der genomischen DNA ~49 Kb. Es weist acht Exons auf und durch alternatives Spleißen werden verschiedene Transkripte und neun putative Isoformen gebildet. Das *DKK4*-Gen kartiert auf dem Chromosom 8 in der Region p11.2-p11.1 und umfasst ~3 Kb auf genomischer-DNA Ebene. Es weist drei Exons auf, von welchen ein Transkript gebildet wird.

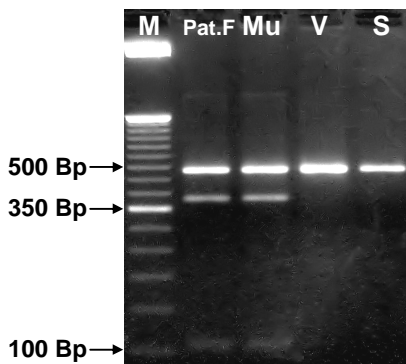
Es konnten Mutationen in den funktionellen Kandidatengen bei den untersuchten Patienten detektiert werden (Tab. 16).

Gene	Nukleotid-austausch	Aminosäure-austausch	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
<i>ROR2</i>	IVS2-15G>C		10/32 (1) <sup>c</sup>	rs7863557
	IVS4+25G>A		22/32 (8) <sup>c</sup>	rs12683181
	c.498T>C	p.D166	2/32	rs16907720
	c.733A>G	p.T245A	14/32 (5) <sup>c</sup>	rs10820900
	IVS7-33C>A		3/32 (1) <sup>c</sup>	rs10992070
	c.1710G>A <sup>b</sup>	p.P570	3/32	
	c.2088C>T	p.Y696	10/32 (3) <sup>c</sup>	rs10992063
	c.2154C>T	p.P718	2/32	rs2230577
	c.2455G>A	p.V819I	20/32 (7) <sup>c</sup>	rs10761129
	c.2613A>C <sup>a</sup>	p.T871	1/32	
<i>FZD5</i>	IVS9+16G>C		18/32 (5) <sup>c</sup>	rs2230578
	c.51A>G	p.L17	34/32 (17) <sup>c</sup>	rs4675711
	c.455G>A <sup>b</sup>	p.R152H	2/32	
	c.647C>T <sup>b</sup>	p.P216L	2/32	
<i>FZD7</i>	c.1371C>G	p.Y457	1/32	rs3731567
	c.587G>A	p.G196E	1/32	rs34908164
<i>DKK1</i>	IVS1-23C>T <sup>b</sup>		1/32	
	c.318A>G	p.A106	11/32 (2) <sup>c</sup>	rs2241529
<i>DKK2</i>	IVS2+29C>A		3/32	rs17037109
	c.286G>C <sup>a</sup>	p.G96R	1/32	
	c.437G>A	p.R146Q	4/32	rs17037102
<i>DKK3</i>	c.1003A>G	p.R335G	25/32 (8) <sup>c</sup>	rs3206824
<i>DKK4</i>	c.507C>T	p.V169	4/32	rs2073664

**Tab. 16: Identifizierte Sequenzvarianten in den funktionellen Kandidatengen *ROR2*, *FZD2*, *FZD5*, *FZD7*, *DKK1*, *DKK2*, *DKK3* und *DKK4***

<sup>a</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Kontrollpersonen identifiziert; <sup>b</sup> Sequenzvariante wurde bei gesunden Familienangehörigen des Patienten identifiziert; <sup>c</sup> Anzahl der homozygot vorliegenden Sequenzvariante; dbSNP: Datenbank „single nucleotide polymorphism“; rs: Referenznummer für den SNP in der NCBI-Datenbank.

Es wurde stets die Kodierregion der längsten Isoform, durch welche alle weiteren Isoformen repräsentiert waren, analysiert. Im *FZD5*-Gen wurden vier Mutationen in der Kodierregion detektiert, von denen zwei Missense-Mutationen (c.455G>A bei den Patienten I und J sowie c.647C>T bei den Patienten F und R) nicht in Datenbanken annotiert waren. Durch die Mutation c.647C>T im Exon 2 des *FZD5*-Gens entsteht eine *Bsi*HKAI-Schnittstelle an Position 99 im PCR-Fragment. Nach dem Verdau mit *Bsi*HKAI liegen bei Anwesenheit der heterozygoten Mutation zwei DNA-Fragmente mit einer Länge von 99 und 370 Bp vor. Im Agarosegel ist die heterozygote Mutation also durch drei Banden erkennbar. Die Bande von 469 Bp stellt die des Wildtypallels, die Banden von 370 Bp und 99 Bp die des restringierten mutierten Allels dar. Das 99 Bp-Fragment ist nur sehr schwach im Agarosegel sichtbar. Durch die Restriktionsanalyse konnte die heterozygote Mutation bei der Patientin und ihrer gesunden Mutter nachgewiesen und als nicht-pathogen eingestuft werden (Abb. 43).



**Abb. 43: Agarosefoto der Exon 2 DNA-Fragmente des *FZD5*-Gens nach einer Restriktionsverdau-Analyse**

Die bei Patientin F (Pat. F) durch Sequenzierung identifizierte heterozygote Mutation c.647C>T im *FZD5*-Gen im 469 Bp Fragment des Exons 2 konnte durch einen *Bsi*HKAI-Verdau spezifisch nachgewiesen werden. Die DNA der Mutter (Mu), nicht jedoch des Vaters (V) oder der Schwester (S) der Patientin, zeigt ebenfalls die Mutation, welche anhand von zwei zusätzlichen Fragmenten von 370 Bp und 99 Bp nachgewiesen werden konnte. Die Größen von drei Banden des Markers sind angegeben. M: 50 Bp DNA-Marker.

Die heterozygote c.455G>A-Mutation konnte durch den auf Sequenzebene erbrachten Nachweis bei der gesunden Mutter von Patient I als nicht krankheitsrelevante Sequenzvariante klassifiziert werden. Die zwei bisher nicht beschriebenen Missense-Mutationen des *FZD5*-Gens konnten somit durch den Nachweis bei einem gesunden Elternteil der Patienten als SNPs klassifiziert werden.

Es wurden 23 Mutationen bei den 16 untersuchten Patienten detektiert. Fünf der 17 identifizierten Mutationen in den Kodierregionen wurden durch den Nachweis bei einem nicht erkrankten Elternteil oder bei einer Kontrollperson als nicht-pathogene Sequenzvarianten verifiziert. Eine der sechs identifizierten Mutationen in intronischen Sequenzbereichen, konnte durch den Nachweis bei einem gesunden Elternteil des Patienten als SNP eingestuft werden. 17 Mutationen konnten durch Datenbankrecherche als bekannte SNPs verifiziert werden. Im *FZD2*-Gen wurden keine Mutationen detektiert. Insgesamt zeigte sich, dass die 23 identifizierten Sequenzvarianten bei 16 sporadischen ZLS-Patienten in acht untersuchten funktionellen Kandidatengenen nicht mit dem ZLS assoziiert sind.

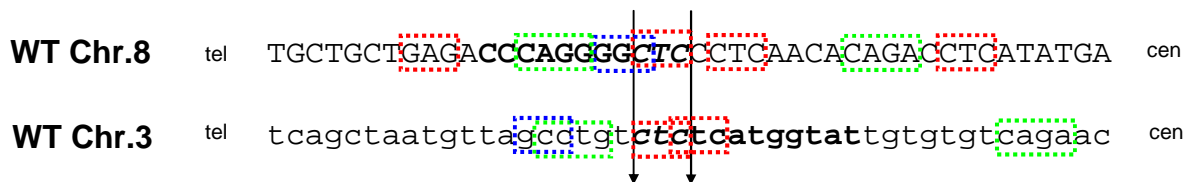
## V. Diskussion

### 1. Nicht-homologe nicht-alleleische Rekombination als molekularer Mechanismus der 3;8-Translokation

DNA-Doppelstrangbrüche entstehen durch exogene mutagene Substanzen oder endogene Mechanismen und können die Entstehung von chromosomalen Rearrangements begünstigen (Bishop & Schiestl, 2000; van Gent *et al.*, 2001). In diesem Zusammenhang konnten, neben der homologen Rekombination, zwei weitere Reparaturmechanismen eines DNA-Doppelstrangbruchs beobachtet werden: Das „non-homologous end-joining“ (NHEJ) und die nicht-alleleische homologe Rekombination (NAHR) (Brugmans *et al.*, 2007; Cahill *et al.*, 2006; Richardson & Jasin, 2000; Stankiewicz & Lupski, 2002). Krankheitsassoziierte genomische Rearrangements werden primär durch NAHR vermittelt, bei der die Bruchpunkte gehäuft in „low copy repeats“ (LCRs) liegen (Inoue & Lupski, 2002). DNA-Doppelstrangbrüche führen auch durch NHEJ zu derartigen Rearrangements, wobei die Bruchereignisse oft in repetitiven DNA-Elementen liegen (Shaw & Lupski, 2004). Es wird somit deutlich, dass DNA-Doppelstrangbrüche nicht zufällig über das humane Genom verteilt sind, sondern dass diese in engem Zusammenhang mit der Nukleotidkomposition der bruchpunktflankierenden Regionen stehen (Deininger & Batzer, 1999; Mitelman, 2000). Die in dieser Arbeit analysierte 3;8-Translokation weist unmittelbar in den Bruchpunktregionen keine repetitiven DNA-Elemente oder LCRs auf. Distal des Chromosom 8- und proximal des Chromosom 3-Bruchpunktes konnte jedoch jeweils ein repetitives *Alu*-Element identifiziert werden. Es wird vermutet, dass *Alu*-Elemente (~10% des humanen Genoms) genomdestabilisierende Eigenschaften bergen, und es konnte gezeigt werden, dass chromosomale Rearrangements vielfach durch *Alu*-Elemente begünstigt wurden (Jeffs *et al.*, 1998; Kolomietz *et al.*, 2002; Onno *et al.*, 1992; Stenger *et al.*, 2001). Daher kann angenommen werden, dass die in der 3;8-Bruchpunktregion lokalisierten *Alu*-Elemente das Translokationsereignis begünstigt haben. Beide *Alu*-Elemente weisen neben ihrer Sequenzübereinstimmung von 84% auch Homologien zu einer 26 Bp Sequenz auf, die möglicherweise Rekombinationsereignisse zwischen *Alu*-Elementen fördert (Rudiger *et al.*, 1995). 16 Bp des *Alu*-Elements des Chromosoms 3 sowie zweimal 7 Bp des *Alu*-Elements des Chromosoms 8 sind zu dieser Sequenz identisch. Obwohl seltener im Zusammenhang mit konstitutionellen chromosomalen Rearrangements beobachtet, erhärten die genannten Charakteristika die Annahme, dass die repetitiven Sequenzelemente ein NHEJ, welches sehr wahrscheinlich zu der 3;8-Translokation führte, gefördert haben (Inoue & Lupski, 2002;

Stankiewicz *et al.*, 2003). Die bruchpunktflankierenden Bereiche zeigen distal des Chromosom 3- und proximal des Chromosom 8-Bruchpunktes einen (66%-igen bzw. 64%-igen) relativ hohen GC-Gehalt. Das humane Genom weist im Durchschnitt einen GC-Gehalt von 41% auf (Lander *et al.*, 2001). Die o.g. Sequenzeigenschaften stimmen partiell mit Beobachtungen überein, bei denen GC-reiche Sequenzen (GC-Gehalt >56%) auf beiden Seiten von Translokationsbruchpunkten dokumentiert wurden (Abeysinghe *et al.*, 2003; Cohen *et al.*, 1996).

Des Weiteren konnten in den unmittelbar bruchpunktflankierenden Sequenzen Oligonukleotidabfolgen identifiziert werden, die mit Rekombinationsereignissen in Zusammenhang stehen und in 397 ausgewerteten Translokationsbruchpunktsequenzen signifikant überrepräsentiert waren (Abeysinghe *et al.*, 2003) (Abb. 44).

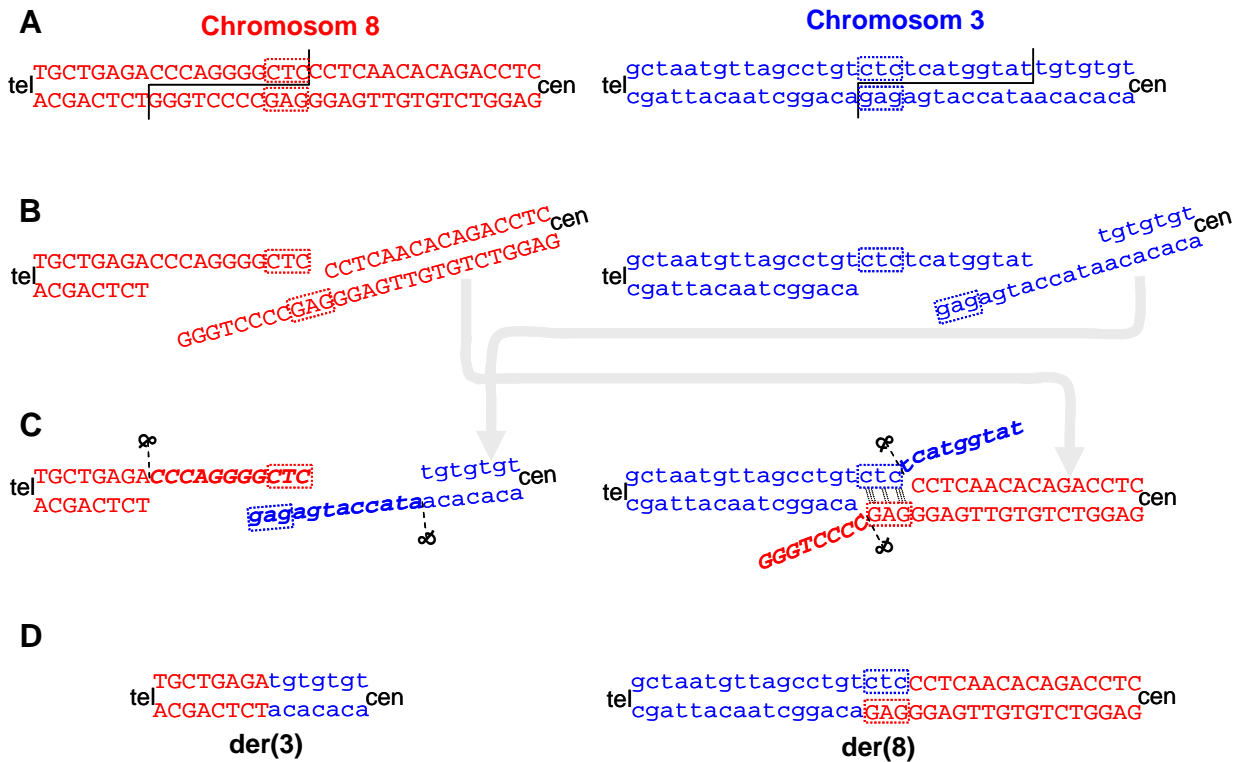


**Abb. 44: Partielle Wildtyp-Sequenzen der Chromosomen 3 und 8 aus der Bruchpunktregion**

Die in 397 Translokationsbruchpunkten überrepräsentierten Sequenzmotive sind farblich eingerahmt. Die Chromosom 8-Sequenz (WT Chr.8) ist in Großbuchstaben und die Chromosom 3-Sequenz (WT Chr.3) in kleinen Buchstaben dargestellt. Der Bruchpunkt ist durch vertikale schwarze Pfeile eingezeichnet. Die auf dem derivativen Chromosom 3 deletierten Basen sind fett gedruckt und das in beiden Sequenzen am Bruchpunkt vorliegende CTC-Motiv ist kursiv wiedergegeben. Die Telomer (tel)- und Centromer (cen)-Orientierung ist angezeigt. Bekannte Nukleotid-Motive sind farblich eingerahmt. CTC-Motive rot (Stop-Sequenz der DNA-Polymerase  $\alpha$ ), GGC-Motive blau (chromosomdestabilisierend bei Fragilem-X-Syndrom) und die CAGG/A-Motive grün (häufige Sequenz bei Deletionen des murinen *major histocompatibility complex*-Gens).

Insbesondere das bruchpunktüberspannende CTC-Motiv – eine Sequenz, an der die DNA-Polymerase  $\alpha$  pausiert – und das revers in der Chromosom 8-Sequenz vorliegende GGC-Motiv – ursächlich für die chromosomale Destabilisierung an der fragilen Stelle in Xq28 – sind an der von Abeysinghe *et al.* (2003) beschriebenen relativen Position zu den Bruchpunkten lokalisiert (Been *et al.*, 1984; Timchenko & Caskey, 1996; Weaver & DePamphilis, 1982). Vermutlich haben aber auch, obwohl in abweichender relativer Position zu den Bruchpunkten lokalisiert, die CTC-Trinukleotide, das GGC-Motiv sowie das Tetranukleotid CAGG/A die Entstehung der DNA-Doppelstrangbrüche begünstigt (Steinmetz *et al.*, 1987).

Nach der Auswertung der Bruchpunktsequenzen wurde ein Modell erstellt, nach welchem die die Deletionen, der Chromosom 3 und 8 Wildtyp-Sequenzen, erklärt werden können (Abb. 44).



**Abb. 45: Modell zur Rekonstruktion der DNA-Doppelstrangbrüche und des NHEJ der 3;8-Translokation**

Die Telomer- (tel) und Centromer- (cen) Orientierung ist jeweils neben den Sequenzausschnitten angegeben. (A) Die DNA beider Chromosomen ist unbeschädigt. (B) Es hat sich in beiden Chromosomen ein DNA-Doppelstrangbruch ereignet, bei dem kohäsive Enden entstanden sind. (C) Nach Translokation der kohäsiven DNA-Enden (graue Pfeile) findet ein NHEJ statt. Zur Ausbildung des der(3) (links), werden 11 Nukleotide des Chromosoms 8 und 12 Nukleotide des Chromosoms 3 durch Nukleasen entfernt. Es liegen dann glatte Enden vor. Die Ausbildung des der(8) (rechts) findet unter Paarung eines mikrohomologen Bereichs (ctc bzw. GAG) beider Chromosomen statt. Es werden 9 Nukleotide des Chromosoms 3 und 8 Nukleotide des Chromosoms 8 durch Nukleasen entfernt. (D) Nach der Ligation liegen die Bruchpunktsequenzen der derivativen Chromosomen so vor, wie sie bei der 3;8-Translokation nachgewiesen wurden (s. Abb. 11 und 12, Ergebnisse). Das mikrohomologe Trinukleotid ist eingerahmt. Nukleaseaktivität ist durch eine Schere (&) symbolisiert und deletierte Nukleotide sind kursiv und fett gedruckt dargestellt.

Die Sequenzen der 3;8-Translokationsbruchpunkte lassen vermuten, dass nach den DNA-Doppelstrangbrüchen beider Chromosomen kohäsive Enden entstanden waren. Die 11 Bp und die 12 Bp umfassenden Deletionen, die sich auf dem der(3) fanden, entstanden mit großer Wahrscheinlichkeit durch Nukleaseaktivität im Rahmen des NHEJ. Bei dem NHEJ findet häufig eine Basenpaarung der einzelsträngigen Bereiche, im Zuge des so genannten „microhomology usage“, statt (Roth & Wilson, 1986). Bei diesem Vorgang hat das bruchpunktüberspannende CTC-Trinukleotid anscheinend als mikrohomologe Sequenz, proximal des kurzen Arms von Chromosom 3 und distal des langen Arms von Chromosom 8, fungiert (Abb. 45). Mikrohomologe Bereiche umfassen oft nicht mehr als 1-4 Bp (Lieber, 1999). Beim NHEJ mit „microhomology usage“ werden häufig Nukleotide, die vor bzw. hinter einer mikrohomologen Sequenz liegen, durch Nukleasen entfernt (Lieber, 1999;



Weterings & van Gent, 2004). Es wird angenommen, dass 8 Nukleotide des Chromosoms 8 und 9 Nukleotide des Chromosoms 3 bei der Bildung des der(8) durch Nukleasen entfernt wurden. Es kann jedoch auch ohne eine Basenpaarung, z.B. bei zwei glatten DNA-Enden, eine effiziente Verknüpfung stattfinden (Gerstein & Lieber, 1993; Gu *et al.*, 1990). So wurde wahrscheinlich, nach Entfernung der kohäsiven Enden, der distale Teil des langen Arms von Chromosom 8 mit dem Chromosom 3, dem am kurzen Arm ein Stück verloren ging, fusioniert und das der(3) gebildet. Dabei wurden vermutlich 12 Nukleotide von Chromosom 3 und 11 Nukleotide von Chromosom 8 entfernt (Abb. 45). Zusammengenommen sprechen die aufgeführten Hinweise und die Sequenzcharakteristika der Bruchpunktsequenzen für ein NHEJ als zugrundeliegenden molekularen Mechanismus der 3;8-Translokation.

## **2. Hinweise auf eine Assoziation der Region 3p21.1-p14.3 mit dem Zimmermann-Laband-Syndrom**

Chromosomale Translokationen, die gemeinsam mit einem Krankheitsphänotyp auftreten, können zum Auffinden einer mit der Erkrankung assoziierten genomischen Region beitragen (s. 1., Einleitung). Das Vorliegen einer 3;8- und einer 3;17-Translokation bei Patienten mit dem ZLS, deren Bruchpunkte in der Region 3p14.3 in einem Abstand von ~280 Kb kartieren (s. Abb. 14, Ergebnisse), ist ein prominenter Hinweis auf eine derartige Assoziation. Da auch eine funktionelle Verbindung zwischen den klinischen Merkmalen des ZLS und den beiden unmittelbar in dieser Region kartierenden Genen, *CACNA2D3* und *WNT5A*, hergestellt werden kann, wird im Folgenden auf diese Gene eingegangen.

### **2.1 Das WNT5A-Gen**

Die Beteiligung von *WNT*-Genen an der Skelettentwicklung ist ein Indiz einer möglichen Assoziation der ZLS-spezifischen Merkmale mit dem *WNT5A*-Gen (Hartmann, 2006; Nusse, 2005; Reddy *et al.*, 2001). Insbesondere die im Verlauf der Embryonalentwicklung bei Mäusen an den terminalen Phalangen sowie im nasalen- bzw. maxillo-mandibulären Bereich nachgewiesene *Wnt5a*-Expression favorisierten dieses Gen zusätzlich als Kandidatengen für das ZLS (Yamaguchi *et al.*, 1999). Da *ROR2*-Mutationen für BDB ursächlich sind und *in vitro* eine *Wnt5a*-*Ror2*-Proteininteraktion beobachtet wurde, kann spekuliert werden, dass *WNT5A*-Mutationen zu einer veränderten *ROR2*-abhängigen Signalkaskade führen könnten, wodurch ein ähnlicher klinischer Phänotyp resultieren könnte (Mikels & Nusse, 2006; Oishi *et al.*, 2003; Oldridge *et al.*, 2000; Schwabe *et al.*, 2000). Diese Hypothese wird ferner durch

die bemerkenswert ähnlichen Phänotypen der *Wnt5a*- und *Ror2*-defizienten Mäuse, die u.a. durch verkürzte Extremitäten, Minderwuchs und kraniale Anomalien gekennzeichnet sind, gestützt (DeChiara *et al.*, 2000; Oishi *et al.*, 2003; Yamaguchi *et al.*, 1999).

Im Hinblick auf die bei einigen ZLS-Patienten beobachtete Hypertrichose konnte anhand von Mausmodellen eine Verbindung zum *Wnt5a*-Gen hergestellt werden, da gezeigt werden konnte, dass *Wnt5a* an der Morphogenese der Haarfollikel beteiligt ist (Reddy *et al.*, 2001).

Im Zusammenhang mit den Skelettfehlbildungen bei ZLS-Patienten ist anzunehmen, dass veränderte Differenzierungsprozesse des Skeletts im Zuge der Chondrogenese für diese ursächlich sind. Dies könnte durch Mutationen in regulatorischen DNA-Elementen, die beispielsweise zu einer örtlich und/oder zeitlich fehlregulierten *WNT5A*-Expression im Verlauf der Embryogenese geführt haben könnten, bedingt sein. Solche Punktmutationen wurden im Zusammenhang mit der präaxialen Polydaktylie beschrieben (Lettice & Hill, 2005).

Resümierend zeigt sich, dass dieses Kandidatengen funktionell auf besondere Weise mit den klinischen Merkmalen des ZLS in Verbindung gebracht werden kann.

## 2.2 Das *CACNA2D3*-Gen

Spannungsabhängige Kalziumkanäle, die zur Superfamilie der spannungsabhängigen Ionenkanäle gehören, werden in endokrinen, Nerven- und Muskelzellen exprimiert (Catterall, 2000). Durch vielfältige physiologische Prozesse, die zu einer Depolarisierung von Zellen führen, wird ein  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx vermittelt und Vorgänge wie Kontraktion, Sekretion, Neurotransmission und Genexpression werden induziert (Catterall, 2000; Catterall *et al.*, 2005). Kalziumkanäle sind multimere Moleküle, die in der Regel aus einer porenbildenden  $\alpha_1$ - und vier zusätzlichen  $\beta$ -,  $\alpha_2\delta$ - und  $\gamma$ -Untereinheiten aufgebaut sind (Catterall, 2000). Die biophysikalischen Eigenschaften eines Kalziumkanals werden primär durch die  $\alpha_1$ -Untereinheit bestimmt; zehn verschiedene humane Gene einer  $\alpha_1$ -Untereinheit und vier murine als auch humane Gene, die für  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten kodieren, konnten beschrieben werden (Catterall, 2000; Gao *et al.*, 2000; Hofmann *et al.*, 1994; Klugbauer *et al.*, 1999; Qin *et al.*, 2002). Das in der ZLS-Kandidatengenregion 3p14.3 kartierende *CACNA2D3*-Gen kodiert für das  $\alpha_2\delta_3$ -Polypeptid eines Kalziumkanals. Eine *CACNA2D3*-Expression konnte beim Menschen primär im Gehirn, im Herz und den Skelettmuskeln nachgewiesen werden (Gong *et al.*, 2001a). *Cacna2d3*-defiziente Mäuse zeigen einen neurologischen Phänotyp, der durch erhöhte Aggression, Hyperaktivität und eine verminderte Schreckhaftigkeit im

Zusammenhang mit akustischen Reizen gekennzeichnet ist (Deltagene Inc., 2005). Skelettale und/oder gingivale Merkmale konnten nicht beobachtet werden. Heterozygote *Cacna2d3*-„knockout“-Mäuse sind phänotypisch unauffällig.

Im Hinblick auf die bei einigen ZLS-Patienten vorliegende Epilepsie kann in Anlehnung an ein anderes Mausmodell eine diesbezügliche Assoziation mit der Kalziumkanal  $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit vermutet werden (Gohlich-Ratmann *et al.*, 2000; Pfeiffer *et al.*, 1992; Van Buggenhout *et al.*, 1995). So berichteten Brodbeck *et al.* (2002), dass eine homozygote Nonsense-Mutation im *Cacna2d2*-Gen der Maus einen Phänotyp verursacht, der u.a. durch Absenzen charakterisiert ist. Gleichwohl ist dies ein weiterer Beleg dafür, dass Mutationen in  $\alpha_2\delta$ -Untereinheiten von Kalziumkanälen neuropathologische Auswirkungen haben können. Zusammenfassend kann gesagt werden, dass die Defizienz des *Cacna2d3*-Gens und eine homozygote Nonsense-Mutation des *Cacna2d2*-Gens bei der Maus mit neurologischen Phänotypen, welche sich z.T. auch bei Patienten mit dem ZLS wiederfinden, assoziiert sind.

### 2.3 Gingivafibromatose als Arzneimittelnebenwirkung

Interessanterweise treten bei drei Medikamentengruppen – Kalziumantagonisten, Antikonvulsiva und Immunsuppressiva – u.a. Nebenwirkungen auf, die sich in Gingivafibromatose oder Schwellungen der perioralen Weichgewebe und/oder Lippenhypertrophie äußern (Abdollahi & Radfar, 2003; Cansick & Hulton, 2003; Fu *et al.*, 1998; Marshall & Bartold, 1998; Reznik *et al.*, 1987; Samarasinghe *et al.*, 2004). Neben Gingivafibromatose, einem Leitsymptom des ZLS, ist auch die Hypertrophie der perioralen Weichgewebe ein häufig mit dem ZLS assoziiertes Merkmal. Das Verständnis der zugrunde liegenden pharmakologischen Mechanismen, die diese Symptome hervorrufen, ist von besonderem Interesse, da auf diese Weise mögliche Rückschlüsse auf beteiligte Signalwege und somit ggf. auf ZLS-Kandidatengene gezogen werden könnten.

Durch die beobachtete Gingivafibromatose als Folge einer Kalziumkanalblocker-Medikation, die primär zur Behandlung von Herzerkrankungen und Hypertonie erfolgt, kann vermutet werden, dass eine verringerte intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration zu dieser unerwünschten Arzneimittelwirkung führt (Fleckenstein, 1983; Fu *et al.*, 1998). Da das CACNA2D3-Genprodukt vermutlich für die Funktionalität von zwei der vier durch Hypertonika inhibierten Kalziumkanäle des L-Typs notwendig ist, kann spekuliert werden, dass eine durch pathogene Mutationen bedingte Fehlfunktion der  $\alpha_2\delta_3$ -Untereinheit einen Einfluss auf den  $\text{Ca}^{2+}$ -Influx und somit die intrazelluläre  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration haben könnte (Catterall *et al.*, 2005).

Insbesondere der ausgeprägte gingivale Phänotyp des 3;17-Translokationspatienten mit dem ZLS, der sehr wahrscheinlich nur eine funktionelle Kopie des *CACNA2D3*-Gens aufweist, könnte so erklärt werden (Kim *et al.*, 2006). Demgemäß könnte ein ähnlicher Pathomechanismus Gingivafibromatose bei ZLS-Patienten und bei Patienten mit Kalziumantagonisten-Medikation auslösen.

Die Komplexität der im Detail noch nicht verstandenen molekularen Mechanismen, die zur Gingivafibromatose führen können, stellt sich in der Literatur durch widersprüchliche experimentelle Ergebnisse und eine Assoziation mit einer Vielzahl von Syndromen dar (s. 6.2) (Winter, R., Baraister, 2003). Es wird vermutet, dass eine übermäßige Expression von Molekülen der extrazellulären Matrix mit Gingivafibromatose in Zusammenhang steht. Nachdem humane Fibroblasten der Gingiva Kalziumantagonisten, Antikonvulsiva bzw. Immunsuppressiva ausgesetzt wurden, konnten einerseits stimulierende Effekte, andererseits inhibierende Auswirkungen dieser Pharmaka auf die Bildung extrazellulärer Matrixmoleküle beobachtet werden (James *et al.*, 1998; Newell & Irwin, 1997; Schincaglia *et al.*, 1992; Tipton & Dabbous, 1998). Andere Autoren konnten *in vivo* keine Veränderungen der extrazellulären Matrixmoleküle feststellen (Martins *et al.*, 2003; Rocha *et al.*, 2000; Romanos *et al.*, 1992). Es wurden auch widersprüchliche Beobachtungen in Bezug auf die Zellproliferation gemacht (James *et al.*, 1995; Nishikawa *et al.*, 1991; Salo *et al.*, 1990; Willershausen-Zonnchen *et al.*, 1992). Resümierend kann postuliert werden, dass ein direkter regulatorischer Einfluss auf den Metabolismus der extrazellulären Matrixmoleküle und die Zellproliferation von Gingivafibroblasten wahrscheinlich nicht durch einen zugrunde liegenden gemeinsamen Mechanismus der o.g. Arzneimittel bedingt ist (Kataoka *et al.*, 2005; Trackman & Kantarci, 2004).

Trotz der unstimulierenden Beobachtungen bei Gingivaveränderungen durch Hypertonika kann festgehalten werden, dass durch eine pharmakologische Inhibierung von Kalziumkanälen, für deren Funktion das *CACNA2D3*-Genprodukt notwendig ist, Gingivahyperplasie bzw. Gingivafibromatose hervorgerufen wird.

### **3. Mit Hilfe von DNA-Sequenzanalysen konnten keine pathogenen Mutationen bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom identifiziert werden**

#### **3.1 Keine pathogenen Punktmutationen in Genen aus der Region 3p21.1-p14.3**

Durch die im Rahmen dieser Arbeit erfolgte Mutationsanalyse von 10 Genen aus der Region 3p21.1-p14.3 wurden 60 in Datenbanken bekannte Sequenzvarianten identifiziert. Die 24 Mutationen, die nicht bekannt waren, konnten durch einen Nachweis bei den gesunden Eltern der Patienten und/oder Kontrollpersonen als nicht-pathogene Mutationen bestätigt werden. Da bekannt ist, dass Mutationen in den UTRs und der Promotorregion eines Gens pathogene Folgen haben können (Cazzola & Skoda, 2000; Cullen *et al.*, 2003), wurden auch diese Bereiche des besonders vielversprechenden Kandidatengens *WNT5A* (s. 2.1.) untersucht. Für ein derartiges Vorgehen sprach auch die Beschreibung eines Translations-Regulationsmechanismus durch Proteininteraktion mit der *WNT5A* 3'-UTR (Leandersson *et al.*, 2006). Es konnten jedoch keine pathogenen Mutationen in den UTRs und der putativen Promotorregion des *WNT5A*-Gens identifiziert werden. Eine Assoziation der insgesamt 84 Sequenzvariationen mit dem ZLS konnte somit zunächst ausgeschlossen werden.

#### **3.2 Keine pathogenen Punktmutationen in Genen, deren Genprodukte in den WNT-abhängigen Signalweg involviert sind**

Da eine Assoziation des ZLS, insbesondere die skelettalen Dysmorphien, mit einer Fehlfunktion des *WNT5A*-abhängigen Signalwegs in Zusammenhang gebracht werden kann (s. 2.1), wurden auch Gene, dessen Genprodukte in diesen Signalweg involviert sind, einer Mutationsanalyse unterzogen. Als Hinweise dienten beobachtete Interaktionen von *Wnt5a*-Proteinen mit *Ror2*-, *Fzd2*-, *Fzd4*-, *FZD5*- und *Fzd7*-Rezeptoren (Chen *et al.*, 2003; He *et al.*, 1997; Mikels & Nusse, 2006; Oishi *et al.*, 2003; Sen *et al.*, 2001; Slusarski *et al.*, 1997; Umbhauer *et al.*, 2000). Die humanen Gene *ROR2*, *FZD2*, *FZD5* und *FZD7* wurden daher als funktionelle Kandidatengene eingestuft. Da Mutationen des *FZD4*-Gens mit der familiären, exsudativen Vitreoretinopathie (MIM 133780) assoziiert sind und bei ZLS-Patienten keine entsprechenden Augenveränderungen beobachtet wurden, erfolgte keine Mutationsanalyse dieses Gens. Im Hinblick auf die Skelettfehlbildungen kann zudem spekuliert werden, dass möglicherweise eine Assoziation des ZLS mit Veränderungen in Proteinen, die den *WNT*-abhängigen Signalweg modulieren, bestehen könnte. Zu diesen zählen u.a. die am besten

charakterisierten Wnt-Antagonisten der DKK-Proteinfamilie, die beim Menschen von vier Mitgliedern (DKK1-4) repräsentiert wird (Kawano & Kypta, 2003; Krupnik *et al.*, 1999). Durch Expressionsanalysen und anhand eines Mausmodells konnte gezeigt werden, dass insbesondere *Dkk1* ein potenter Inhibitor der Wnt-abhängigen Signalkaskade und für die Entwicklung der Extremitäten von großer Bedeutung ist (Grotewold *et al.*, 1999; Monaghan *et al.*, 1999; Mukhopadhyay *et al.*, 2001). Da sich zudem gezeigt hat, dass sowohl Wnt-Antagonisten der Dkk-Familie als auch Fzd-Rezeptor-Moleküle maßgeblich an der Morphogenese der Haarfollikel beteiligt sind, kann die bei einigen ZLS-Patienten beschriebene Hypertrichose ebenfalls in den Kontext der Wnt-abhängigen Signalkaskade und somit dieser Moleküle gebracht werden (Andl *et al.*, 2002; Reddy *et al.*, 2004).

Obwohl keine pathogenen Mutationen in den Genen *DKK1-4*, *FZD2*, *FZD5* und *FZD7* identifiziert werden konnten, kann nicht ausgeschlossen werden, dass Mutationen in deren Promotorregionen, UTRs oder intronischen Bereichen sowie heterozygote Deletionen in diesen Genen mit dem ZLS assoziiert sind.

### **3.3 Keine pathogenen Mutationen in konservierten, nicht-kodierenden DNA-Sequenzelementen in 3p21.1-p14.3**

Die Beschreibung von Deletionen und Punktmutationen in „long-range regulatory elements“, die in einer Entfernung von 250 Kb bis 1 Mb zum Krankheitsgen liegen und einen regulatorischen Einfluss ausüben, sind wegweisend für die Identifizierung neuer Krankheitsgene bzw. Pathomechanismen (Beysen *et al.*, 2005; Lettice *et al.*, 2003). Die neun im Rahmen der vorliegenden Arbeit selektierten und auf Punktmutationen untersuchten CNGs zeigten bei 16 Patienten mit dem ZLS bzw. ähnlichen Phänotypen keine pathogenen Mutationen. Es kann z.Zt. nicht ausgeschlossen werden, dass Deletionen, Insertionen oder Inversionen im Bereich der untersuchten CNGs oder Punktmutationen, Deletionen, Insertionen oder Inversionen in anderen, nicht analysierten CNGs in der Region 3p21.1-p14.3 – die putative *cis*-regulatorische Elemente repräsentieren – mit dem ZLS assoziiert sind.

### 3.4 Kritische Betrachtung der PCR-basierten Mutationsanalyse im Hinblick auf die Identifizierung von Punktmutationen

Im Zuge einer DNA-Sequenzanalyse können technische Fehler nicht ausgeschlossen werden. Im Rahmen der Mutationsanalysen wurde zunächst eine Amplifikation des zu untersuchenden DNA-Bereichs durchgeführt. Beim Ableiten der dafür verwendeten Primer wurde darauf geachtet, dass diese keine SNPs in ihrer Sequenz aufwiesen, um eine Amplifikation beider Allele zu ermöglichen. SNPs kommen im humanen Genom mit einer Frequenz von etwa 1/250 Bp vor und schätzungsweise wurde etwa erst die Hälfte aller humanen Sequenzvarianten identifiziert (Reich *et al.*, 2003; Stephens *et al.*, 2001; Venter *et al.*, 2001). Es muss daher in Betracht gezogen werden, dass sich in den ausgewählten Primersequenzen SNPs oder Deletions-Insertionspolymorphismen (DIP) befinden, die noch nicht in den Datenbanken annotiert sind. In einem solchen Fall kann eine Sequenzvariante das Primer-Hybridisierungsverhalten in der PCR beeinflussen und es kann zu einer selektiven Amplifikation eines Allels kommen. Insbesondere SNPs oder DIPs, die an den letzten Positionen im 3'-Bereich eines Primers liegen, können zu einer solchen monoallelischen Amplifikation führen. Läge in der DNA eines Patienten eine derartige Variation in der Primerbindesequenz und eine pathogene Mutation auf dem selben Allel vor, so würde dieses Allel im Verlauf der PCR möglicherweise unterrepräsentiert bzw. garnicht amplifiziert werden – ein als „allelic drop out“ bezeichneter Vorgang (Heinrich *et al.*, 2004; Zajickova *et al.*, 2003). In der nachfolgenden Sequenzierungsreaktion könnte das mutierte Allel somit nicht detektiert werden (Ward *et al.*, 2006). Um diese Problematik bei dem Kandidatengen *WNT5A* zu umgehen, wurde die Mutationsanalyse mit neu abgeleiteten Primerpaaren wiederholt; auch hierbei wurden keine pathogenen Mutationen detektiert (M. Roes, unveröffentlichte Daten). Grundsätzlich kann bei Amplikons, die nach Sequenzierung eine Heterozygotie aufweisen, ein „allelic drop out“ ausgeschlossen werden.

Von einigen Patienten, die im Rahmen der Arbeit untersucht wurden, lagen keine Zelllinien vor. Da die genomische DNA somit limitiert war, wurde eine „whole genome amplification“ (WGA) dieser DNA-Proben durchgeführt. Untersuchungen ergaben, dass die so generierte DNA eine nahezu gleichwertige Qualität zum Ausgangsmaterial aufweist und ein durch WGA bedingter „allelic drop out“ somit als unwahrscheinlich postuliert wird (Holbrook *et al.*, 2005; Lovmar *et al.*, 2003).

Aufgrund der positionellen und auch möglichen funktionellen Zusammenhänge (s. 2.) der Genen *CACNA2D3* bzw. *WNT5A* und den ZLS-spezifischen Merkmalen, wurden FISH- und SNP-Analysen in der Region 3p14.3 zur Aufdeckung möglicher Deletionen bei Patienten mit ZLS durchgeführt.

#### 4. Es liegen keine größeren Deletionen im Bereich des *WNT5A*-Gens bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom vor

Neben pathogenen Punktmutationen in der Transkriptionseinheit eines Gens sind in den letzten Jahren mit zunehmender Tendenz Deletionen, Inversionen oder Duplikationen, u.a. in einer beachtlichen Entfernung zum Krankheitsgen, dokumentiert worden (Kleinjan & van Heyningen, 1998; Lee & Lupski, 2006). Eine durch Deletion oder Duplikation veränderte Kopienanzahl bestimmter Bereiche des Genoms wird „copy number variation“ (CNV) genannt und kann zu einer Trennung von regulatorischen Elementen und deren Transkriptionseinheiten mit der Folge einer fehlregulierten Genexpression führen (Beysen *et al.*, 2005). Bei den durchgeführten FISH-Analysen mit Sonden aus der Region 3p14.3 wurden bei sporadischen ZLS-Patienten jeweils zwei Signale mit gleicher Intensität auf den Metaphasechromosomen lymphoblastoider Zellen dokumentiert. Somit konnte eine CNV von mindestens 40 Kb in der genomischen *WNT5A*-Region sowie in einer Entfernung von ~500 Kb zum 3'-Bereich dieses Gens und im 3'-Bereich des *CACNA2D3*-Gens zunächst ausgeschlossen werden (s. Abb. 20 und Tab. 13, Ergebnisse). Zudem bestätigten die durchgeführten SNP-Analysen das diploide Vorliegen der *WNT5A*-Region bei sieben sporadischen ZLS-Patienten (s. Tab. 10, Ergebnisse). Diese im Rahmen der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen konnten durch experimentelle Ergebnisse einer kooperierenden Arbeitsgruppe gestützt werden. So wurden „Southern Blot“-Analysen durchgeführt, bei denen vier DNA-Sonden eingesetzt wurden, die die ~22 Kb große genomische *WNT5A*-Genregion abdecken. Die DNAs von drei ZLS-Patienten zeigten im Vergleich zu Kontrollpersonen keine aberranten Fragmente (H.-G. Kim und J. Gusella, persönliche Mitteilung). Um auszuschließen, dass Deletionen oder Duplikationen einzelner Exons des Kandidatengens *CACNA2D3* bzw. *WNT5A* zur Ausprägung des ZLS führen, wurden „multiplex-ligation dependent probe amplification“ (MLPA)-Analysen durchgeführt (Schouten *et al.*, 2002). Es konnten keine Unterschiede in der Kopienanzahl von zwölf ausgewählten Exons des *CACNA2D3*-Gens bei neun sporadischen ZLS-Patienten sowie bei den fünf kodierenden Exons des *WNT5A*-Gens bei 14 sporadischen ZLS-Patienten im Vergleich zu Kontrollpersonen festgestellt werden (H.-G. Kim und J. Gusella, persönliche Mitteilung). Anhand dieser Daten kann zunächst davon ausgegangen werden, dass heterozygote Deletionen im *WNT5A*-Gen sowie 5' oder 3' davon nicht mit dem ZLS assoziiert sind. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass CNVs in anderen Bereichen der 3p21.1-p14.3 Region mit dem ZLS assoziiert sind.



## 5. Variable Expression der Gene *WNT5A*, *ROR2* und *WNT10B* in humanen lymphoblastoiden Zellen

Um eine bei Patienten mit ZLS vorliegende Fehlregulation von Genen der Region 3p14.3 zu untersuchen, wurden Expressionsanalysen durchgeführt. Eine veränderte Genexpression, bedingt durch einen Positionseffekt bzw. durch CNV, ist in mehreren Fällen als ursächlich für humane Erkrankungen beschrieben worden (Kleinjan & van Heyningen, 1998; Semenza, 1994). Um zu untersuchen, ob die *WNT5A*-Expression bei Patienten mit ZLS verändert ist, wurden entsprechende Analysen durchgeführt, wobei die lymphoblastoiden Zellen von acht Patienten mit dem ZLS z.T. sehr uneinheitliche Expressionslevel aufwiesen. Eine interindividuell variable Genexpression wird durch ein komplexes Zusammenspiel von genetischen Polymorphismen, physiologischen Bedingungen sowie äußeren Faktoren bedingt (Hamilton, 2002). Für die physiologische Gleichstellung der untersuchten Zelllinien erfolgte eine Synchronisation, und durch eine gleichartige Kultivierung und Behandlung wurde der Einfluss von äußeren Faktoren minimiert. Somit sind die unterschiedlichen Expressionsstärken vermutlich auf genetische Faktoren zurückzuführen. Insbesondere für das Kandidatengen *WNT5A* zeigten sich starke Expressionsunterschiede. Auch das *WNT10B*-Gen, das im sich differenzierenden Haarfollikel exprimiert wird und im Hinblick auf die bei einigen ZLS-Patienten beschriebene Hypertrichose untersucht wurde, zeigte sehr variable Expressionslevel (Reddy *et al.*, 2001). Ein methodischer Fehler bei der Ermittlung dieser Werte konnte so gut wie ausgeschlossen werden, da die Berechnungsgrundlagen nahezu optimal waren (Tab. 14, Ergebnisse) und eine einheitliche Tendenz der *WNT5A*-Expressionswerte einzelner Zelllinien durch die semiquantitative RT-PCR als auch durch die qRT-PCR dokumentiert werden konnte (Abb. 27 und 35, Ergebnisse). Die in dieser Arbeit ermittelten Expressionsprofile der im Zusammenhang mit WNT-abhängigen Signalwegen stehenden Gene *WNT5A*, *ROR2* und *WNT10B* zeigten starke interindividuelle Schwankungen. Diese variable Genexpression einzelner Patienten-Zelllinien steht im Einklang mit den Untersuchungen von Cheung *et al.* (2003), die zeigten, dass lymphoblastoide Zelllinien stark abweichende interindividuelle Expressionsprofile von Genen, deren Produkte an Signaltransduktion beteiligt sind, aufweisen können. Die einheitliche *HPRT*-Expression der untersuchten lymphoblastoiden Zelllinien spiegelt die Erkenntnisse wider, nach denen „housekeeping genes“ eine überwiegend homogene Expression aufweisen (Cheung *et al.*, 2003). Die Ursachen für die beobachteten interindividuellen Expressionsunterschiede sind u.a. möglicherweise durch SNPs bedingt, die gegebenenfalls die Funktion von *cis*- bzw. *trans*-Regulatoren beeinflussen (Morley *et al.*, 2004). Die Annahme, dass die Genexpression über derartige Mechanismen gesteuert wird und

somit vom genetischen Hintergrund eines Individuums abhängig ist, konnte durch diesbezügliche Analysen bei Angehörigen einer Familie, monozygoten Zwillingen und nicht verwandten Personen belegt werden (Cheung *et al.*, 2003; Sharma *et al.*, 2005). Da die Individuen des in dieser Arbeit untersuchten Patientenkollektivs aus unterschiedlichsten Teilen der Welt stammen und daher vermutlich einen heterogenen genetischen Hintergrund aufweisen, könnte dies die o.g. Beobachtungen bestätigen. Es kann daher einstweilen angenommen werden, dass der genetische Hintergrund eines Individuums einen Einfluss auf die Genexpression haben kann und dass ein daraus resultierendes, individuelles Expressionsprofil nicht zwangsläufig mit einer genetischen Erkrankung assoziiert ist. Es kann somit keine Aussage über eine mögliche Assoziation des *WNT5A*-Gens bzw. der *WNT5A*-Expression mit dem ZLS getroffen werden.

Ein Aspekt, der von den Autoren der o.g. Studien nicht diskutiert wurde, jedoch bei der Verwendung von lymphoblastoiden Zellen berücksichtigt werden sollte, ist ein möglicher Einfluss der Immortalisierung durch Teile des Epstein-Barr-Virus (EBV)-Genoms auf die Genexpression (Kempkes *et al.*, 1995a). Dabei hat sich gezeigt, dass sechs der 84 EBV-Gene für die Immortalisierung essenziell sind (Farrell, 1995). Es wurde beobachtet, dass eine Integration des gesamten EBV-Genoms in die DNA einer Wirtszelle, u.a. in Burkitt-Lymphomzellen, mit einer Instabilisierung von Chromosomen einhergeht und dass humane Epithelzellen disruptierte Mikrotubuli und Aneuploidien als Folge einer EBV-Infektion aufweisen können (Jox *et al.*, 1997; Man *et al.*, 2006). Weitere signifikante genetische Veränderungen konnten im Rahmen zytogenetischer Untersuchungen von 373 humanen lymphoblastoiden Zelllinien dokumentiert werden, bei denen sowohl strukturelle als auch numerische chromosomale Aberrationen nachgewiesen wurden (Leonard, 2006). Es zeigte sich bei 75 (20,1 %) der 373 untersuchten Zelllinien eine Chromosomenstörung. Das Vorhandensein einer Chromosomenstörung nahm mit zunehmendem Alter der Zelldonatoren zu (Leonard, 2006). Chromosomenanomalien können zu einer aberranten Expression eines oder mehrerer Gene führen. In Anbetracht der Tatsache, dass das durchschnittliche Alter der ZLS-Patienten, von denen lymphoblastoide Zellen für diese Arbeit zur Verfügung standen, 20 Jahre beträgt, erscheint das Vorliegen einer Chromosomenstörung eher unwahrscheinlich.

Zusammengenommen zeigen die genannten Beobachtungen, dass lymphoblastoide Zellen per se Faktoren bergen, die variable Genexpressionsprofile bedingen können. Resümierend kann aus diesen Erkenntnissen abgeleitet werden, dass die Bewertung von Aussagen, die auf Expressionsanalysen gestützt sind, unter Beachtung des Analysematerials der jeweiligen experimentellen Prozedur sowie der genetischen Merkmale des Probenmaterials getroffen werden sollten.

## 6. Der Phänotyp des Zimmermann-Laband-Syndroms

Das im Rahmen dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv umfasst Individuen, die teilweise Leitsymptome und/oder Überschneidungen mit den Merkmalen des ZLS aufweisen (s. Tab. 4-6, Material). Eine Reihe von monosymptomatischen und syndromalen Erkrankungen mit skelettalen und kraniofazialen Merkmalen zeigen phänotypische Überlappungen mit dem ZLS. Bei der Mehrzahl dieser Erkrankungen ist die genetische Ursache nicht bekannt (Tab. 17 und 18).

### 6.1 Erkrankungen, die vorwiegend Überschneidungen mit dem skelettalen Phänotyp des Zimmermann-Laband-Syndroms aufweisen

Die im Folgenden aufgeführten Erkrankungen zeigen das Skelett bzw. die Nägel betreffend phänotypische Überschneidungen mit dem ZLS. Insbesondere die Brachydaktylie Typ B (BDB) (MIM 113000), (Houlston & Temple, 1994; MacKinder, 1857), die Onychodystrophie in Kombination mit Anonychie und Brachydaktylie (MIM 106990) (Kumar & Levick, 1986), das Anonychie-Onychodystrophie- oder auch Cooks-Syndrom (MIM 106995) (Cooks *et al.*, 1985), die Anonychie-Onychodystrophie (MIM 107000) (Timerman *et al.*, 1969), die Anonychie und Ektrodaktylie (MIM 106900) (Lees *et al.*, 1957), die isolierte Anonychie (MIM 206800) (Hopsu-Havu & Jansen, 1973; Mahloudji & Amidi, 1971; Timmer & Wildervanck, 1969), das Witkop-Syndrom (MIM 189500) (Hudson & Witkop, 1975; Witkop, 1965) und das Taubheit-Onycho-Osteodystrophie- und mentale Retardierungs-Syndrom (DOOR) (MIM 124480 und MIM 220500) (Feinmesser & Zelig, 1961; Goodman *et al.*, 1969) zeigen Überlappungen der klinischen Merkmale mit dem ZLS.

Von drei der acht beschriebenen Erkrankungen – BDB, isolierte Anonychie und Witkop-Syndrom – sind die genetischen Ursachen bekannt. Die wie das ZLS einen skelettalen, onychalen und z.T. fazialen Phänotyp aufweisenden Erkrankungen sind mit den zugrundeliegenden Vererbungsmodi in Tabelle 17 zusammengefasst.

MIM	Syndrom	Klinische Merkmale	Gen	Vererbungsmodus
113000	Brachydaktylie Typ B	hypoplastische/aplastische terminale Phalangen und Onychen, selten prominente Nase	<i>ROR2</i>	autosomal-dominant
106900	Anonychie-Ektrodaktylie	Anonychie, Brachymetakarpie, Ektrodaktylie	unbekannt	autosomal-dominant
106990	Onychodystrophie, Anonychie, Brachydaktylie, Ektrodaktylie	Onychodystrophie, Anonychie, Brachydaktylie, Ektrodaktylie	unbekannt	autosomal-dominant
106995	Cooks-Syndrom	Anonychie, Onychodystrophie, Aplasie/ Dysplasie der distalen Phalangen	unbekannt	autosomal-dominant
220500 124480	DOOR-Syndrom	Taubheit, Onycho-Osteodystrophie, mentale Retardierung	unbekannt	autosomal-rezessiv autosomal-dominant
107000	Anonychie-Onychodystrophie	Anonychie, Onychodystrophie, kongenitale Hüftfehlstellungen	unbekannt	autosomal-dominant
189500	Witkop-Syndrom	Onychodysplasie, Hypodontie	<i>MSX1</i>	autosomal-dominant
206800	Anonychie	Anonychie	<i>RSPO4</i>	autosomal-rezessiv autosomal-dominant

**Tab. 17: Klinische Merkmale ausgewählter Syndrome, die u.a. den skelettalen, onychalen und z.T. den fazialen Phänotyp betreffend Überschneidungen mit dem ZLS zeigen**

Datenbankeinträge einiger humaner Erkrankungen mit Mendel'scher Vererbung. MIM: „Mendelian inheritance in men“.

Die bekannten Krankheitsgene *ROR2*, *MSX1* und *RSPO4* stellen somit putative Kandidatengene für das ZLS dar. Eine im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Mutationsanalyse des *ROR2*-Gens bei ZLS-Patienten und Individuen mit überlappenden klinischen Merkmalen konnte keine pathogenen Mutationen aufdecken (s. Tab. 16, Ergebnisse). Auch im *RSPO4*-Gen konnten keine mit dem ZLS assoziierten Mutationen detektiert werden (M. Roes, unveröffentlichte Daten). Das ZLS-Patientenkollektiv ist noch keinem *MSX1*-Screening unterzogen worden, so dass abzuwarten bleibt, ob Mutationen in diesem Gen mit dem ZLS assoziiert sind.

## 6.2 Erkrankungen, die vorwiegend Überschneidungen mit dem gingivalen Phänotyp des Zimmermann-Laband-Syndroms aufweisen

Die isolierten hereditären Gingivafibromatosen Typ1 (HGF1; MIM 135300) (Emerson, 1965) und Typ 2 (HGF2; MIM 605544) (Xiao *et al.*, 2001) sind monosymptomatisch und weisen eine Übereinstimmung mit einem ZLS-Leitsymptom auf. Des Weiteren sind 62 Erkrankungen beschrieben worden, die mit Gingivafibromatose assoziiert sind (Winter und Baraister, 2003), von denen im Folgenden eine Auswahl vorgestellt wird, die mehr als eine phänotypische Überschneidung mit dem ZLS aufweisen.

Zu nennen ist die Gingivafibromatose in Kombination mit Hypertrichose (MIM 135400), auch „Gingivafibromatose-Dias“ genannt, die Gingivafibromatose, mentale Retardierung und Hypertrichose (MIM 605400), auch „Gingivafibromatose-Trias“ genannt, die juvenile hyaline Fibromatose (JHF), (MIM 228600), auch Murray-Puretic-Drescher-Syndrom genannt, (Drescher et al., 1967; Murray, 1873; Puretic *et al.*, 1962), das Rutherford-Syndrom (MIM 180900) (Rutherford, 1931; Houston & Shotts 1966), das okulozerebrale Syndrom mit Hyperpigmentierung, auch Cross- bzw. Kramer-Syndrom (MIM 257800) (Cross *et al.*, 1967; Passarge & Fuchs-Mecke, 1975) und das Ramon-Syndrom (MIM 266270) (Ramon *et al.*, 1967).

In Tabelle 18 sind die klinischen Merkmale und die Vererbungsmodi der genannten Erkrankungen zusammenfassend dargestellt. Mit Ausnahme der HGF1 und des Murray-Puretic-Drescher-Syndroms sind die genetischen Ursachen der beschriebenen Erkrankungen nicht bekannt.

MIM	Syndrom	Klinische Merkmale	Gen	Vererbungsmodus
135300	Hereditäre Gingivafibromatose Typ 1	isolierte Gingivafibromatose	<i>SOS1</i>	autosomal-dominant
605544	Hereditäre Gingivafibromatose Typ 2	Gingivafibromatose	unbekannt	autosomal-dominant
135400	„Gingivafibromatose Dias“	Gingivafibromatose, Hypertrichose	unbekannt	autosomal-dominant
605400	„Gingivafibromatose Trias“	Gingivafibromatose, Hypertrichose, mentale Retardierung und vereinzelt Epilepsie, Brachymetacarpie, prominente Nase u. Ohren	unbekannt	autosomal-dominant autosomal-rezessiv
135550	Jones-Hartsfield-Syndrom	Gingivafibromatose, progressiver sensineuraler Hörverlust	unbekannt	autosomal-rezessiv autosomal-dominant
228600	Murray-Puretic-Drescher-Syndrom	multiple subkutane Tumore, Gingivafibromatose, Osteolyse der Phalangen, Gelenkkontrakturen	<i>ANTXR2</i>	autosomal-dominant
257800	Cross-Syndrom	okulare Anomalien, Spastik, geistige Behinderung, Gingivafibromatose, Hyperpigmentierung der Haut	unbekannt	autosomal-rezessiv
266270	Ramon-Syndrom	Cherubismus, Gingivafibromatose, geistige Behinderung, Epilepsie, Hypertrichose, Wachstumsstörungen, juvenile rheumatoide Arthritis	unbekannt	autosomal-dominant

**Tab. 18: Klinische Merkmale ausgewählter Syndrome, die u.a. den gingivalen Phänotyp betreffend Überschneidungen mit dem ZLS zeigen**

Datenbankeinträge einiger humaner Erkrankungen mit Mendel'scher Vererbung. MIM: „Mendelian inheritance in men“.

Im Zuge einer Mutationsanalyse des *SOS1*-Gens bei zwölf ZLS-Patienten mit starker Gingivafibromatose konnten keine pathogenen Mutationen detektiert werden (M. Roes, unveröffentlichte Daten). Da keine Mutationsanalyse des *ANTXR2*-Gens durchgeführt wurde, bleibt abzuwarten, ob das ZLS mit diesem Gen assoziiert ist.

Im Folgenden werden mögliche Ursachen erörtert, die auf einen gemeinsamen genetischen Defekt beim ZLS und Erkrankungen mit zu diesem Syndrom überlappenden Phänotypen zurück zuführen sein könnten.

### 6.3 Betrachtung des ZLS-Patientenkollektivs

Die aufgeführten phänotypischen Überlappungen geben Anlass, drei Arten von Heterogenität genetisch bedingter humaner Erkrankungen, die möglicherweise die beobachtete Variabilität des ZLS bedingen, zu erörtern. Erstens die Locus Heterogenität (s. 7.), zweitens die allelische Heterogenität und drittens die klinische Heterogenität (Strachan & Read, 2005).

Das in dieser Arbeit untersuchte Patientenkollektiv bestand aus sporadischen ZLS-Patienten bzw. sporadischen Patienten mit phänotypischen Merkmalsüberschneidungen zum ZLS. Diese Personen entstammen, mit der Ausnahme von Patientin N, aus nicht konsanguinen Partnerschaften. Da die Anamnese der in dieser Arbeit untersuchten Patienten keine Hinweise auf eine familiäre Häufung des ZLS in zwei oder mehreren Generationen ergab, wurde von einem autosomal-dominanten Erbgang mit *de novo* Mutation ausgegangen. Es konnten jedoch in keinem der hier untersuchten Gene pathogenen Mutationen identifiziert werden. Es kann daher angenommen werden, dass im untersuchten Patientenkollektiv Veränderungen in anderen Genen zu finden sind. Möglicherweise sind zwar die Phänotypen der 3;8- und 3;17-Translokationspatienten durch die Bruchereignisse in 3p14.3 bedingt, die sporadischen Patienten weisen jedoch keine genetischen Defekte in dieser Region auf.

Bei der allelischen Heterogenität, können bei verschiedenen Patienten mit einer bestimmten genetischen Erkrankung zahlreiche unterschiedliche Mutationen desselben Gens vorliegen (Strachan & Read, 2005). Bei dem untersuchten Patientenkollektiv fällt auf, dass die Merkmale des ZLS variabel ausgeprägt sind (Tab. 4-6, Material). Sollte das ZLS eine monogene Erkrankung sein, wovon zunächst ausgegangen wurde, so ist das Auftreten variabler Phänotypen jedoch keine Besonderheit, da bei Betroffenen monogener Erkrankungen häufig eine unterschiedlich starke Merkmalsausprägung zu beobachten ist. Eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation anhand des Mutationsspektrums eines Gens ist oft nicht möglich. Es zeigen sich starke Unterschiede in den Phänotypen bzw. bei der Schwere der

Erkrankung (Beutler, 2001; Dean & Santis, 1994; Smith *et al.*, 1999). Die phänotypischen Unterschiede des ZLS-Patientenkollektivs und die Erkrankungen mit zum ZLS überlappenden Phänotypen (s. Tab 17 und 18) könnten demnach sehr wohl durch Mutationen eines Gens verursacht werden. Auch identische pathogene Mutation in einem Gen bei Patienten mit einer bestimmten monogenen Erkrankung können zu variablen Phänotypen führen (Wolf, 1997).

Unter klinischer Heterogenität versteht man das Auftreten von zwei oder mehreren verschiedenen Erkrankungen, die durch Mutationen desselben Gens verursacht werden. Im Hinblick auf die überlappenden Phänotypen des ZLS mit anderen Erkrankungen, deren genetische Ursachen nicht bekannt sind (s. 6.1 und 6.2) kann nur spekuliert werden, dass klinische Heterogenität zu derart verschiedenen Merkmalsausprägungen geführt hat.

Weitere Faktoren, die zum Auftreten sporadischer ZLS-Patienten führen könnten, sind unvollständige Penetranz und variable Expressivität (Strachan & Read, 2005). Die vorliegenden Daten sprechen am ehesten für eine vollständige Penetranz des ZLS (s. 3.2, Einleitung). Das Phänomen der variablen Expressivität, das häufig bei dominanten Erkrankungen beobachtet wird, bei dem ebenso wie bei der unvollständigen Penetranz, andere Gene oder äußere Faktoren die Ausprägung der Symptome beeinflussen, kann zu der Verschiedenartigkeit der Merkmale bei Patienten des untersuchten Kollektivs beigetragen haben (Strachan & Read, 2005).

## **7. Sind die Ursachen des Zimmermann-Laband-Syndroms durch Locus Heterogenität oder komplexe genetische Defekte bedingt?**

Neben den pathogenen Mutationen eines Krankheitsgens können auch andere komplexe genetische Mechanismen wie Oligo- bzw. Polygenie, Haplotypen, Imprinting sowie äußere Faktoren den Phänotyp beeinflussen (Dean, 2003). Es hat sich gezeigt, dass eine strikte Einteilung in „dominante“ oder „rezessive“ Erkrankungen häufig nicht möglich ist, sondern dass auch Zwischenformen dieser Vererbungsmodi vorkommen (Badano & Katsanis, 2002). Auch für das ZLS kommen derartige Formen der Vererbung in Frage. Im Folgenden werden einige der genannten Vererbungsmodi erörtert.

Bei der Suche nach ursächlichen genetischen Defekten in der für das ZLS angenommenen kritischen Region 3p21.1-14.3 konnte bisher keine Assoziation des Syndroms mit dieser Region festgestellt werden. Es kann daher in Erwägung gezogen werden, dass der Phänotyp des ZLS durch Mutationen verschiedener Gene bei den Patienten verursacht wird, ein als Locus Heterogenität bezeichneter Sachverhalt (Strachan & Read, 2005). Es wurde beschrieben, dass dasselbe klinische Erscheinungsbild auf Mutationen an einem von mehreren

Loci zurückzuführen ist (Strachan & Read, 2005). Durch Kopplungsanalysen konnten derartige Beobachtungen im Zusammenhang mit anderen Erkrankungen gemacht werden. Mit diesem Verfahren kann bei familiär gehäuftem Auftreten einer Erkrankung die Segregation eines genomischen Abschnitts, der mit einer Erkrankung gekoppelt ist, festgestellt werden. So wurden z.B. für die autosomal-dominant vererbte Form der Retinitis Pigmentosa, 14 ursächliche Gene beschrieben (<http://www.sph.uth.tmc.edu/Retnet/sum-dis.htm>). Diese Erkenntnisse zeigen beispielhaft, dass Mutationen unterschiedlicher Gene bei verschiedenen Individuen ähnliche Phänotypen zur Folge haben können.

Komplexe genetische Defekte, zeichnen sich durch das gleichzeitige Vorliegen von Mutationen in mehreren Genen aus. Es konnte für die als monogene Augenerkrankung beschriebene Retinitis Pigmentosa (MIM 180721), das Vorliegen von zwei heterozygoten Mutationen in den voneinander unabhängigen Genen „Rod photoreceptor outer segment protein 1“ (*ROM1*) und Peripherin 2 (*PRPH2*) beschrieben werden (Kajiwara *et al.*, 1994). Dies zeigt beispielhaft, dass eine als monogen beschriebene Erkrankung in Ausnahmefällen durch Mutationen in zwei Genen bedingt sein kann (Dryja *et al.*, 1997). Bisher wurden 30 oligo- bzw. polygene humane Erkrankungen beschrieben (Badano & Katsanis, 2002).

Es kann spekuliert werden, dass eine oligo- oder polygene Vererbung für die Merkmalsausprägung bei Patienten mit dem ZLS für die Erkrankung ursächlich ist.

Die als Einheit vererbte allelische Zusammensetzung eines Chromosoms wird als Haplotyp bezeichnet (Crawford & Nickerson, 2005). Es konnte gezeigt werden, dass Haplotypen mit Erkrankungen assoziiert sind. So wurde eine Assoziation von bestimmten Haplotypen in Bereichen des  $\mu$ -Opioidrezeptorgens mit Stoffgebundenen Abhängigkeiten festgestellt (Hoehe *et al.*, 2000). Im Rahmen anderer Studien, konnten Haplotypenanalysen dieses Gens, für die durch Absenzen gekennzeichnete idiopathische Epilepsie, zur Identifizierung eines mit der Erkrankung assoziierten Haplotyps führen (Sander *et al.*, 2000). Das Verständnis der komplexen krankheitsrelevanten Auswirkungen von Haplotypen ist ein zukunftsweisendes Feld der Humangenetik, da so Einblicke in die genetischen Details hereditärer und idiopathischer Erkrankungen erlangt werden können (Davidson, 2000).

Skelettale Fehlbildungen konnten bisher jedoch nicht mit Haplotypen in Zusammenhang gebracht werden, so dass eine derartige Assoziation bei Patienten mit ZLS hypothetisch ist, jedoch nicht ausgeschlossen werden kann.

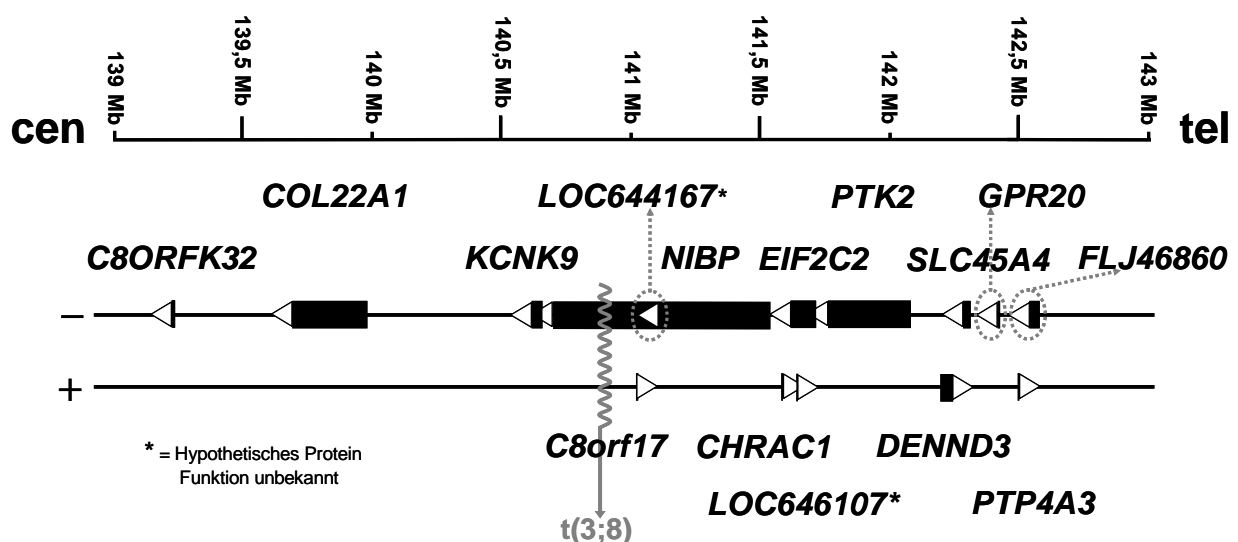
Die diversen genetischen Ursachen, die im Zusammenhang mit humanen Erkrankungen beobachtet wurden, und von denen einige exemplarisch erörtert wurden, lassen letztlich eine Vorhersage über den Vererbungsmodus nicht aufgeklärter Syndrome nur mit



Einschränkungen zu. Es kann daher vermutet werden, dass das ZLS u.U. durch eine komplexe genetische Vererbung bedingt ist.

## 10. Ausblick

Hinsichtlich des Auffindens von neuen ZLS-Kandidatengen könnte ein kürzlich beschriebener Patient mit ZLS und einem chromosomalen Rearrangement Hinweise geben. Dieser 14-jährige Patient zeigt u.a. die ZLS-Leitsymptome Gingivahypertrophie, Onychodystrophie, eine große weiche Nase und prominente Lippen (Hoogendijk *et al.*, 2006). Zytogenetisch wurde eine Chromosom 12-Insertion [ins(12;8)(p11.2;q11.22q24.3)] festgestellt. Hierbei wurde Material vom langen Arm des Chromosoms 8 (q11.22-q24.3) in den kurzen Arm vom Chromosom 12 (p11.2) inseriert. Die Feinkartierung der Bruchpunkte ist nicht beschrieben. Wie bei der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten 3;8-Translokation befindet sich ein Bruchpunkt in 8q24.3 (Hoogendijk *et al.*, 2006). Somit sind z.Zt. drei Patienten mit ZLS und chromosomalen Rearrangements bekannt, von denen jeweils zwei Bruchereignisse in 3p14.3 bzw. 8q24.3 zeigen. Nachdem eine Assoziation der Region 3p14.3 mit dem ZLS nicht nachgewiesen werden konnte, kann anhand der o.g. Hinweise in Betracht gezogen werden, dass genetische Defekte in 8q24.3 bei Patienten mit dem ZLS möglicherweise krankheitsverursachend sein könnten. Als Ausgangspunkt für neue Mutationsanalysen könnte die feinkartierte 8q24.3-Bruchpunktregion der 3;8-Translokation dienen (Abb. 46).



**Abb. 46:** Schematische Darstellung der physikalischen Bruchpunktregion in 8q24.3 der 3;8-Translokation

Gene sind durch schwarze Balken dargestellt und bezeichnet; ihre 5'→3'-Orientierung ist durch eine Pfeilspitze wiedergegeben. Die Orientierung von Telomer (tel) nach Centromer (cen) ist angegeben. Oberhalb der Gene ist der Maßstab in Megabasen (Mb) angezeigt. Der Translokationsbruchpunkt ist durch eine graue gewellte Linie, die in einen Pfeil mündet, symbolisiert und bezeichnet.

Da neben der DNA der 3;8-Translokationspatienten kein weiteres genetisches Material von in einer Familie gehäuft vorkommenden Patienten mit ZLS verfügbar war, wurden keine Kopplungsanalysen zum Eingrenzen der mit dem Syndrom assoziierten genomischen Region/en durchgeführt. Sollte von einem familiär gehäuftem Auftreten des ZLS in Zukunft berichtet werden, so könnten Kopplungsanalysen Aufschluss darüber geben, ob eine der Bruchpunktregionen bei den vier bisher beschriebenen Patienten mit chromosomalen Rearrangements mit dem Syndrom assoziiert ist.

Neben pathogenen Punktmutationen, die mit dem ZLS assoziiert sein könnten, muss in Betracht gezogen werden, dass submikroskopische und/oder größere CNVs als krankheitsverursachend infrage kommen. Diese Annahme wird durch das Fehlen pathogener Mutationen in den Kodierregionen von zehn Genen aus der Region 3p21.1-p14.3 gestützt (s. 3.1). Um potenzielle, krankheitsverursachende CNVs in der Region 3p21.1-p14.3 bzw. 8q24.3 zu identifizieren, könnte in einem neuen experimentellen Ansatz an die Verwendung von „array comparative genomic hybridisation“ (aCGH) gedacht werden. Bei dieser Methode werden DNA-Oligonukleotide, abgeleitet aus der zu analysierenden genomischen Region, auf einen Glasobjektträger („array“) gespottet. Nach einer differenziellen Fluoreszenzmarkierung (Cy 3 bzw. Cy 5) der DNA eines Patienten und einer Kontrollperson erfolgt die Hybridisierung dieser Proben auf den „array“ der Wahl. Durch eine Analyse der Fluoreszenzsignale und somit einem quantitativen Vergleich der Hybridisierung können CNVs identifiziert werden (Barrett *et al.*, 2004; Solinas-Toldo *et al.*, 1997).

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit legen somit nahe, dass der genetische Defekt, der zur Ausprägung des ZLS führt, möglicherweise nicht durch Punktmutationen in der Kodierregion von Genen aus der Region 3p21.1-p14.3 bzw. funktioneller Kandidatengenen bedingt ist. Es kann daher in Betracht gezogen werden, dass das ZLS durch CNVs oder durch Mutationen von „cis-regulatory elements“ der Region 3p21.1-p14.3 verursacht wird. Zudem kann nicht ausgeschlossen werden, dass Mutationen in Genen, die in der Region 8q24.3 kartieren, mit dem ZLS assoziiert sind.

Auch pathogene Mutationen in anderen funktionellen ZLS-Kandidatengenen, wie z.B. *RSPO1-3*, *ROR1*, *FGF8*, *SP8-9*, *FZD1*, 3, 6, 8-10 oder *LRP5-6*, deren Genprodukte an der Entwicklung der Nägel und/oder den terminalen Phalangen bzw. am WNT-abhängigen Signalweg beteiligt sind, können nicht ausgeschlossen werden (Al-Shawi *et al.*, 2001; Bodine & Komm, 2006; Kawakami *et al.*, 2004; Nam *et al.*, 2006a; Sanz-Ezquerro & Tickle, 2003a; Sanz-Ezquerro & Tickle, 2003b).

Weitere Experimente werden in der Zukunft zum Auffinden der genetischen Ursache des ZLS beitragen können.

## VI. Literaturverzeichnis

- Abdollahi, M. & Radfar, M. (2003).** A review of drug-induced oral reactions. *The journal of contemporary dental practice [electronic resource]* **4**, 10-31.
- Aberle, H., Bauer, A., Stappert, J., Kispert, A. & Kemler, R. (1997).** beta-catenin is a target for the ubiquitin-proteasome pathway. *The EMBO journal* **16**, 3797-3804.
- Abeyasinghe, S. S., Chuzhanova, N., Krawczak, M., Ball, E. V. & Cooper, D. N. (2003).** Translocation and gross deletion breakpoints in human inherited disease and cancer I: Nucleotide composition and recombination-associated motifs. *Human mutation* **22**, 229-244.
- Afzal, A. R., Rajab, A., Fenske, C. D. & other authors (2000).** Recessive Robinow syndrome, allelic todominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2. *Nature genetics* **25**, 419-422.
- Al-Shawi, R., Ashton, S. V., Underwood, C. & Simons, J. P. (2001).** Expression of the Ror1 and Ror2 receptor tyrosine kinase genes during mouse development. *Development genes and evolution* **211**, 161-171.
- Alavandar, G. (1965).** Elephantiasis gingivae. Report of an affected family with associated hepatomegaly, soft tissue & skeletal abnormalities. *The Journal of the All India Dental Association* **37**, 349-353.
- Andl, T., Reddy, S. T., Gaddapara, T. & Millar, S. E. (2002).** WNT signals are required for the initiation of hair follicle development. *Developmental cell* **2**, 643-653.
- Atabek, M. E., Pirgon, O., Sert, A. & Toy, H. (2005).** Zimmermann-Laband syndrome in an infant with an atypical histologic finding. *Pediatr Dev Pathol* **8**, 654-657.
- Atanasov, D., Kavlakov, P. & Penev, P. (1979).** [Congenital idiopathic gingival fibromatosis, combined with anychia]. *Stomatologija* **61**, 29-33.
- Badano, J. L. & Katsanis, N. (2002).** Beyond Mendel: an evolving view of human genetic disease transmission. *Nature reviews* **3**, 779-789.
- Bakaeen, G. & Scully, C. (1991).** Hereditary gingival fibromatosis in a family with the Zimmermann-Laband syndrome. *J Oral Pathol Med* **20**, 457-459.
- Barrett, M. T., Scheffer, A., Ben-Dor, A. & other authors (2004).** Comparative genomic hybridization using oligonucleotide microarrays and total genomic DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **101**, 17765-17770.
- Basaran, S., Yuksel, A., Ermis, H., Kuseyri, F., Agan, M. & Yuksel-Apak, M. (1994).** Tetra-amelia, lung hypo-/aplasia, cleft lip-palate, and heart defect: a new syndrome? *Am J Med Genet* **51**, 77-80.
- Bazopoulou-Kyrkanidou, E., Papagianoulis, L., Papanicolaou, S. & Mavrou, A. (1990).** Laband syndrome: a case report. *J Oral Pathol Med* **19**, 385-387.
- Beemer, F. A. (1988).** "New syndromes," Part II: "European" syndromes. *Am J Med Genet Suppl* **4**, 71-84.
- Been, M. D., Burgess, R. R. & Champoux, J. J. (1984).** Nucleotide sequence preference at rat liver and wheat germ type 1 DNA topoisomerase breakage sites in duplex SV40 DNA. *Nucleic acids research* **12**, 3097-3114.
- Bergmann, C., Senderek, J., Anhof, D. & other authors (2006).** Mutations in the gene encoding the Wnt-signaling component R-spondin 4 (RSPO4) cause autosomal recessive anonychia. *American journal of human genetics* **79**, 1105-1109.
- Berman, J. J., Tong, C. & Williams, G. M. (1978).** Enhancement of mutagenesis during cell replication of cultured liver epithelial cells. *Cancer letters* **4**, 277-283.
- Beutler, E. (2001).** Discrepancies between genotype and phenotype in hematology: an important frontier. *Blood* **98**, 2597-2602.
- Beysen, D., Raes, J., Leroy, B. P. & other authors (2005).** Deletions involving long-range conserved nongenic sequences upstream and downstream of FOXL2 as a novel disease-causing mechanism in blepharophimosis syndrome. *American journal of human genetics* **77**, 205-218.
- Bhanot, P., Brink, M., Samos, C. H., Hsieh, J. C., Wang, Y., Macke, J. P., Andrew, D., Nathans, J. & Nusse, R. (1996).** A new member of the frizzled family from Drosophila functions as a Wingless receptor. *Nature* **382**, 225-230.
- Billiard, J., Way, D. S., Seestaller-Wehr, L. M., Moran, R. A., Mangine, A. & Bodine, P. V. (2005).** The orphan receptor tyrosine kinase Ror2 modulates canonical Wnt signaling in osteoblastic cells. *Molecular endocrinology (Baltimore, Md)* **19**, 90-101.

- Bishop, A. J. & Schiestl, R. H. (2000).** Homologous recombination as a mechanism for genome rearrangements: environmental and genetic effects. *Human molecular genetics* **9**, 2427-2334.
- Blaydon, D. C., Ishii, Y., O'Toole E, A. & other authors (2006).** The gene encoding R-spondin 4 (RSPO4), a secreted protein implicated in Wnt signaling, is mutated in inherited anonychia. *Nature genetics* **38**, 1245-1247.
- Bodine, P. V. & Komm, B. S. (2006).** Wnt signaling and osteoblastogenesis. *Rev Endocr Metab Disord* **7**, 33-39.
- Brannon, M., Gomperts, M., Sumoy, L., Moon, R. T. & Kimelman, D. (1997).** A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes & development* **11**, 2359-2370.
- Brodbeck, J., Davies, A., Courtney, J. M. & other authors (2002).** The ducky mutation in *Cacna2d2* results in altered Purkinje cell morphology and is associated with the expression of a truncated alpha 2 delta-2 protein with abnormal function. *The Journal of biological chemistry* **277**, 7684-7693.
- Brown, A., McKie, M., van Heyningen, V. & Prosser, J. (1998).** The Human PAX6 Mutation Database. *Nucleic acids research* **26**, 259-264.
- Brugmans, L., Kanaar, R. & Essers, J. (2007).** Analysis of DNA double-strand break repair pathways in mice. *Mutation research* **614**, 95-108.
- Burmeister, M. & Lehrach, H. (1986).** Long-range restriction map around the Duchenne muscular dystrophy gene. *Nature* **324**, 582-585.
- Cahill, D., Connor, B. & Carney, J. P. (2006).** Mechanisms of eukaryotic DNA double strand break repair. *Front Biosci* **11**, 1958-1976.
- Cansick, J. C. & Hulton, S. A. (2003).** Lip hypertrophy secondary to cyclosporin treatment. *Pediatric nephrology (Berlin, Germany)* **18**, 710-711.
- Canun, S., Guevara-Sangines, E. G., Elvira-Morales, A., Sierra-Romero Mdel, C. & Rodriguez-Asbun, H. (2003).** Hypertrichosis terminalis, gingival hyperplasia, and a characteristic face: a new distinct entity. *American journal of medical genetics* **116**, 278-283.
- Catterall, W. A. (2000).** Structure and regulation of voltage-gated Ca<sup>2+</sup> channels. *Annual review of cell and developmental biology* **16**, 521-555.
- Catterall, W. A., Perez-Reyes, E., Snutch, T. P. & Striessnig, J. (2005).** International Union of Pharmacology. XLVIII. Nomenclature and structure-function relationships of voltage-gated calcium channels. *Pharmacological reviews* **57**, 411-425.
- Cavallo, R. A., Cox, R. T., Moline, M. M., Roose, J., Polevoy, G. A., Clevers, H., Peifer, M. & Bejsovec, A. (1998).** *Drosophila* Tcf and Groucho interact to repress Wingless signalling activity. *Nature* **395**, 604-608.
- Cazzola, M. & Skoda, R. C. (2000).** Translational pathophysiology: a novel molecular mechanism of human disease. *Blood* **95**, 3280-3288.
- Chadwick, B., Hunter, B., Hunter, L., Aldred, M. & Wilkie, A. (1994).** Laband syndrome. Report of two cases, review of the literature, and identification of additional manifestations. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* **78**, 57-63.
- Chen, W., ten Berge, D., Brown, J. & other authors (2003).** Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science* **301**, 1391-1394.
- Cheung, V. G., Conlin, L. K., Weber, T. M., Arcaro, M., Jen, K. Y., Morley, M. & Spielman, R. S. (2003).** Natural variation in human gene expression assessed in lymphoblastoid cells. *Nature genetics* **33**, 422-425.
- Chiurazzi, P., Pomponi, M. G., Willemsen, R., Oostra, B. A. & Neri, G. (1998).** In vitro reactivation of the FMR1 gene involved in fragile X syndrome. *Human molecular genetics* **7**, 109-113.
- Chodirker, B. N., Chudley, A. E., Toffler, M. A. & Reed, M. H. (1986).** Zimmerman-Laband syndrome and profound mental retardation. *Am J Med Genet* **25**, 543-547.
- Ciani, L. & Salinas, P. C. (2005).** WNTs in the vertebrate nervous system: from patterning to neuronal connectivity. *Nat Rev Neurosci* **6**, 351-362.
- Cohen, M. M., Jr. (2006).** The new bone biology: pathologic, molecular, and clinical correlates. *American journal of medical genetics* **140**, 2646-2706.
- Cohen, O., Cans, C., Cuillel, M., Gilardi, J. L., Roth, H., Mermet, M. A., Jalbert, P. & Demongeot, J. (1996).** Cartographic study: breakpoints in 1574 families carrying human reciprocal translocations. *Human genetics* **97**, 659-667.

- Cooks, R. G., Hertz, M., Katznelson, M. B. & Goodman, R. M. (1985).** A new nail dysplasia syndrome with onychonychia and absence and/or hypoplasia of distal phalanges. *Clinical genetics* **27**, 85-91.
- Crawford, D. C. & Nickerson, D. A. (2005).** Definition and clinical importance of haplotypes. *Annual review of medicine* **56**, 303-320.
- Cremers, F. P. & Cremers, C. W. (2004).** POU3F4 and mixed deafness with temporal bone defects (DFN3). In: Epstein CJ, Erickson RP, Wynshaw-Boris A (eds) *Inborn errors of development: the molecular basis of clinical disorders of morphogenesis*. Oxford University Press, New York
- Crolla, J. A. & van Heyningen, V. (2002).** Frequent chromosome aberrations revealed by molecular cytogenetic studies in patients with aniridia. *American journal of human genetics* **71**, 1138-1149.
- Cross, H. E., McKusick, V. A. & Breen, W. (1967).** A new oculocerebral syndrome with hypopigmentation. *The Journal of pediatrics* **70**, 398-406.
- Cullen, L. M., Prat, L. & Cox, D. W. (2003).** Genetic variation in the promoter and 5' UTR of the copper transporter, ATP7B, in patients with Wilson disease. *Clinical genetics* **64**, 429-432.
- Dabdoub, A., Donohue, M. J., Brennan, A. & other authors (2003).** Wnt signaling mediates reorientation of outer hair cell stereociliary bundles in the mammalian cochlea. *Development (Cambridge, England)* **130**, 2375-2384.
- Davalos, I. P., Garcia-Cruz, D., Garcia-Cruz, M. O., Ramirez-Duenas, M. L., Solis-Camara, P., Correa-Cerro, L. S., Perez-Rulfo, D. & Sanchez-Corona, J. (2005).** Zimmermann-Laband syndrome: further clinical delineation. *Genetic counseling (Geneva, Switzerland)* **16**, 283-290.
- Davidson, S. (2000).** Research suggests importance of haplotypes over SNPs. *Nature biotechnology* **18**, 1134-1135.
- de Kok, Y. J., Merckx, G. F., van der Maarel, S. M., Huber, I., Malcolm, S., Ropers, H. H. & Cremers, F. P. (1995).** A duplication/paracentric inversion associated with familial X-linked deafness (DFN3) suggests the presence of a regulatory element more than 400 kb upstream of the POU3F4 gene. *Human molecular genetics* **4**, 2145-2150.
- de Kok, Y. J., Vossenaar, E. R., Cremers, C. W. & other authors (1996).** Identification of a hot spot for microdeletions in patients with X-linked deafness type 3 (DFN3) 900 kb proximal to the DFN3 gene POU3F4. *Human molecular genetics* **5**, 1229-1235.
- Deltagene Inc. (2005).** NIH initiative supporting placement of Deltagen, Inc. mice into public.
- de Pina Neto, J. M., Soares, L. R., Souza, A. H., Petean, E. B., Velludo, M. A., de Freitas, A. C. & Ribas, J. P. (1988).** A new case of Zimmermann-Laband syndrome with mild mental retardation, asymmetry of limbs, and hypertrichosis. *Am J Med Genet* **31**, 691-695.
- Dean, F. B., Nelson, J. R., Giesler, T. L. & Lasken, R. S. (2001).** Rapid amplification of plasmid and phage DNA using Phi 29 DNA polymerase and multiply-primed rolling circle amplification. *Genome research* **11**, 1095-1099.
- Dean, M. & Santis, G. (1994).** Heterogeneity in the severity of cystic fibrosis and the role of CFTR gene mutations. *Human genetics* **93**, 364-368.
- Dean, M. (2003).** Approaches to identify genes for complex human diseases: lessons from Mendelian disorders. *Human mutation* **22**, 261-274.
- DeChiara, T. M., Kimble, R. B., Poueymirou, W. T., Rojas, J., Masiakowski, P., Valenzuela, D. M. & Yancopoulos, G. D. (2000).** Ror2, encoding a receptor-like tyrosine kinase, is required for cartilage and growth plate development. *Nature genetics* **24**, 271-274.
- Deininger, P. L. & Batzer, M. A. (1999).** Alu repeats and human disease. *Molecular genetics and metabolism* **67**, 183-193.
- den Dunnen, J. T. & Antonarakis, S. E. (2000).** Mutation nomenclature extensions and suggestions to describe complex mutations: a discussion. *Human mutation* **15**, 7-12.
- Dermitzakis, E. T., Reymond, A. & Antonarakis, S. E. (2005).** Conserved non-genic sequences - an unexpected feature of mammalian genomes. *Nature reviews* **6**, 151-157.
- Drescher, E., Woyke, S., Markiewicz, C., Tegi, S. (1967).** Juvenile fibromatosis in siblings (fibromatosis hyalinica multiplex juvenilis). *J. Pediat. Surg.* **2**: 427-430.
- Dryja, T. P., Hahn, L. B., Kajiwara, K. & Berson, E. L. (1997).** Dominant and digenic mutations in the peripherin/RDS and ROM1 genes in retinitis pigmentosa. *Investigative ophthalmology & visual science* **38**, 1972-1982.

- Du, S. J., Purcell, S. M., Christian, J. L., McGrew, L. L. & Moon, R. T. (1995). Identification of distinct classes and functional domains of Wnts through expression of wild-type and chimeric proteins in *Xenopus* embryos. *Molecular and cellular biology* **15**, 2625-2634.
- Dumic, M., Crawford, C., Ivkovic, I., Cvitanovic, M. & Batinica, S. (1999). Zimmerman-Laband syndrome: An unusually early presentation in a newborn girl. *Croatian medical journal* **40**, 102-103.
- Duret, L., Dorkeld, F. & Gautier, C. (1993). Strong conservation of non-coding sequences during vertebrates evolution: potential involvement in post-transcriptional regulation of gene expression. *Nucleic acids research* **21**, 2315-2322.
- Emerson, T. G. (1965). Hereditary Gingival Hyperplasia. a Family Pedigree of Four Generations. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* **19**, 1-9.
- Fantes, J., Redeker, B., Breen, M. & other authors (1995). Aniridia-associated cytogenetic rearrangements suggest that a position effect may cause the mutant phenotype. *Human molecular genetics* **4**, 415-422.
- Farr, G. H., 3rd, Ferkey, D. M., Yost, C., Pierce, S. B., Weaver, C. & Kimelman, D. (2000). Interaction among GSK-3, GBP, axin, and APC in *Xenopus* axis specification. *The Journal of cell biology* **148**, 691-702.
- Farrell, P. J. (1995). Epstein-Barr virus immortalizing genes. *Trends in microbiology* **3**, 105-109.
- Fedi, P., Bafico, A., Nieto Soria, A., Burgess, W. H., Miki, T., Bottaro, D. P., Kraus, M. H. & Aaronson, S. A. (1999). Isolation and biochemical characterization of the human Dkk-1 homologue, a novel inhibitor of mammalian Wnt signaling. *The Journal of biological chemistry* **274**, 19465-19472.
- Feinberg, A. P. & Vogelstein, B. (1984). "A technique for radiolabeling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity". Addendum. *Analytical biochemistry* **137**, 266-267.
- Feinmesser, M. & Zelig, S. (1961). Congenital deafness associated with onychodystrophy. *Arch Otolaryngol* **74**, 507-508.
- Fleckenstein, A. (1983). History of calcium antagonists. *Circulation research* **52**, I3-16.
- Fu, E., Nieh, S., Hsiao, C. T., Hsieh, Y. D., Wikesjo, U. M. & Shen, E. C. (1998). Nifedipine-induced gingival overgrowth in rats: brief review and experimental study. *Journal of periodontology* **69**, 765-771.
- Gao, B., Sekido, Y., Maximov, A. & other authors (2000). Functional properties of a new voltage-dependent calcium channel alpha(2)delta auxiliary subunit gene (CACNA2D2). *The Journal of biological chemistry* **275**, 12237-12242.
- Gerber, P., Whang-Peng, J. & Monroe, J. H. (1970). Lymphoproliferative effect of Epstein-Barr virus on normal human lymphocytes in cultures. *Bibliotheca haematologica*, 739-750.
- Gershoni-Baruch, R., Drugan, A., Bronshtein, M. & Zimmer, E. Z. (1990). Roberts syndrome or "X-linked amelia"? *Am J Med Genet* **37**, 569-572.
- Gerstein, R. M. & Lieber, M. R. (1993). Coding end sequence can markedly affect the initiation of V(D)J recombination. *Genes & development* **7**, 1459-1469.
- Gohlich-Ratmann, G., Lackner, A., Schaper, J., Voit, T. & Gillessen-Kaesbach, G. (2000). Syndrome of gingival hypertrophy, hirsutism, mental retardation and brachymetacarpia in two sisters: specific entity or variant of a described condition? *Am J Med Genet* **95**, 241-246.
- Gong, H. C., Hang, J., Kohler, W., Li, L. & Su, T. Z. (2001a). Tissue-specific expression and gabapentin-binding properties of calcium channel alpha2delta subunit subtypes. *The Journal of membrane biology* **184**, 35-43.
- Gong, Y., Slee, R. B., Fukai, N. & other authors (2001b). LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell* **107**, 513-523.
- Goodman, R. M., Lockareff, S. & Gwinup, G. (1969). Hereditary congenital deafness with onychodystrophy. *Arch Otolaryngol* **90**, 474-477.
- Gordon, M. D. & Nusse, R. (2006). Wnt signaling: multiple pathways, multiple receptors, and multiple transcription factors. *The Journal of biological chemistry* **281**, 22429-22433.
- Griffin, C., Kleinjan, D. A., Doe, B. & van Heyningen, V. (2002). New 3' elements control Pax6 expression in the developing pretectum, neural retina and olfactory region. *Mechanisms of development* **112**, 89-100.
- Gross, E., Arnold, N., Goette, J., Schwarz-Boeger, U. & Kiechle, M. (1999). A comparison of BRCA1 mutation analysis by direct sequencing, SSCP and DHPLC. *Human genetics* **105**, 72-78.

- Grotewold, L., Theil, T. & Ruther, U. (1999).** Expression pattern of Dkk-1 during mouse limb development. *Mechanisms of development* **89**, 151-153.
- Gu, H., Forster, I. & Rajewsky, K. (1990).** Sequence homologies, N sequence insertion and JH gene utilization in VHDJH joining: implications for the joining mechanism and the ontogenetic timing of Lyl B cell and B-CLL progenitor generation. *The EMBO journal* **9**, 2133-2140.
- Habas, R. & Dawid, I. B. (2005).** Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *Journal of biology* **4**, 2.
- Hamilton, B. A. (2002).** Variations in abundance: genome-wide responses to genetic variation and vice versa. *Genome biology* **3**, reviews1029.
- Hanahan, D. (1983).** Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *Journal of molecular biology* **166**, 557-580.
- Handbuch, RotorGene 2000/3000 (2004).** RealTime, Amplifikation version 4.6, *Corbett-Research/LTF-Labortechnik*.
- Hartmann, C. (2006).** A Wnt canon orchestrating osteoblastogenesis. *Trends in cell biology* **16**, 151-158.
- Haymerle, H., Herz, J., Bressan, G. M., Frank, R. & Stanley, K. K. (1986).** Efficient construction of cDNA libraries in plasmid expression vectors using an adaptor strategy. *Nucleic acids research* **14**, 8615-8624.
- He, X., Saint-Jeannet, J. P., Wang, Y., Nathans, J., Dawid, I. & Varmus, H. (1997).** A member of the Frizzled protein family mediating axis induction by Wnt-5A. *Science* **275**, 1652-1654.
- Heinrich, M., Muller, M., Rand, S., Brinkmann, B. & Hohoff, C. (2004).** Allelic drop-out in the STR system ACTBP2 (SE33) as a result of mutations in the primer binding region. *International journal of legal medicine* **118**, 361-363.
- Heydemann, A., Nguyen, L. C. & Crenshaw, E. B., 3rd (2001).** Regulatory regions from the Brn4 promoter direct LACZ expression to the developing forebrain and neural tube. *Brain research* **128**, 83-90.
- Hoehe, M. R., Kopke, K., Wendel, B., Rohde, K., Flachmeier, C., Kidd, K. K., Berrettini, W. H. & Church, G. M. (2000).** Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence. *Human molecular genetics* **9**, 2895-2908.
- Hofmann, F., Biel, M. & Flockerzi, V. (1994).** Molecular basis for Ca<sup>2+</sup> channel diversity. *Annual review of neuroscience* **17**, 399-418.
- Holbrook, J. F., Stabley, D. & Sol-Church, K. (2005).** Exploring whole genome amplification as a DNA recovery tool for molecular genetic studies. *J Biomol Tech* **16**, 125-133.
- Holzhausen, M., Goncalves, D., Correa Fde, O., Spolidorio, L. C., Rodrigues, V. C. & Orrico, S. R. (2003).** A case of Zimmermann-Laband syndrome with supernumerary teeth. *Journal of periodontology* **74**, 1225-1230.
- Hoogendijk, C. F., Marx, J., Honey, E. M., Pretorius, E. & Christianson, A. L. (2006).** Ultrastructural investigation of Zimmermann-Laband syndrome. *Ultrastructural pathology* **30**, 423-426.
- Hopsu-Havu, V. K. & Jansen, C. T. (1973).** Anonychia congenita. *Archives of dermatology* **107**, 752-753.
- Houston, I. B. & Shotts, N. (1966).** Rutherford's syndrome. A familial oculo-dental disorder. A clinical and electrophysiologic study. *Acta Paediat. Scand.* **55**, 233-238.
- Houlston, R. S. & Temple, I. K. (1994).** Characteristic facies in type B brachydactyly? *Clinical dysmorphology* **3**, 224-227.
- Hudson, C. D. & Witkop, C. J. (1975).** Autosomal dominant hypodontia with nail dysgenesis. Report of twenty-nine cases in six families. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* **39**, 409-423.
- Huelsken, J. & Behrens, J. (2002).** The Wnt signalling pathway. *Journal of cell science* **115**, 3977-3978.
- Il'ina, E. G., Lur'e, I. V. & Vasiliausken, I. P. (1988).** [Analysis of phenotypic variability of Zimmermann-Laband syndrome]. *Pediatrics*, 86-88.
- Inoue, K. & Lupski, J. R. (2002).** Molecular mechanisms for genomic disorders. *Annual review of genomics and human genetics* **3**, 199-242.
- Jacobs, P. A. (1977).** Structural rearrangements of the chromosomes in man. In: Hook EB, Porter IH, eds. *Population cytogenetics*. New York: Academic Press, :81-97.
- James, J. A., Irwin, C. R. & Linden, G. J. (1995).** The effects of culture environment on the response of human gingival fibroblasts to cyclosporin A. *Journal of periodontology* **66**, 339-344.

- James, J. A., Irwin, C. R. & Linden, G. J. (1998).** Gingival fibroblast response to cyclosporin A and transforming growth factor beta 1. *Journal of periodontal research* **33**, 40-48.
- Jeffs, A. R., Benjes, S. M., Smith, T. L., Sowerby, S. J. & Morris, C. M. (1998).** The BCR gene recombines preferentially with Alu elements in complex BCR-ABL translocations of chronic myeloid leukaemia. *Human molecular genetics* **7**, 767-776.
- Jox, A., Rohen, C., Belge, G., Bartnitzke, S., Pawlita, M., Diehl, V., Bullerdiek, J. & Wolf, J. (1997).** Integration of Epstein-Barr virus in Burkitt's lymphoma cells leads to a region of enhanced chromosome instability. *Ann Oncol* **8 Suppl 2**, 131-135.
- Kajiwar, K., Berson, E. L. & Dryja, T. P. (1994).** Digenic retinitis pigmentosa due to mutations at the unlinked peripherin/RDS and ROM1 loci. *Science* **264**, 1604-1608.
- Kataoka, M., Kido, J., Shinohara, Y. & Nagata, T. (2005).** Drug-induced gingival overgrowth--a review. *Biological & pharmaceutical bulletin* **28**, 1817-1821.
- Kawakami, Y., Wada, N., Nishimatsu, S. I., Ishikawa, T., Noji, S. & Nohno, T. (1999).** Involvement of Wnt-5a in chondrogenic pattern formation in the chick limb bud. *Development, growth & differentiation* **41**, 29-40.
- Kawakami, Y., Esteban, C. R., Matsui, T., Rodriguez-Leon, J., Kato, S. & Belmonte, J. C. (2004).** Sp8 and Sp9, two closely related buttonhead-like transcription factors, regulate Fgf8 expression and limb outgrowth in vertebrate embryos. *Development (Cambridge, England)* **131**, 4763-4774.
- Kawano, Y. & Kypta, R. (2003).** Secreted antagonists of the Wnt signalling pathway. *Journal of cell science* **116**, 2627-2634.
- Keller, R. (2002).** Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science* **298**, 1950-1954.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R. & Hammerschmidt, W. (1995a).** immortalization of human primary B lymphocytes in vitro with DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **92**, 5875-5879.
- Kempkes, B., Pich, D., Zeidler, R., Sugden, B. & Hammerschmidt, W. (1995b).** immortalization of human B lymphocytes by a plasmid containing 71 kilobase pairs of Epstein-Barr virus DNA. *Journal of virology* **69**, 231-238.
- Kim, H. G., Higgins, A. W., Herrick, S. R. & other authors (2006).** Candidate loci for Zimmermann-Laband syndrome at 3p14.3. *American journal of medical genetics*.
- Kioussis, D., Vanin, E., deLange, T., Flavell, R. A. & Grosveld, F. G. (1983).** Beta-globin gene inactivation by DNA translocation in gamma beta-thalassaemia. *Nature* **306**, 662-666.
- Kissi, L., Benyahya, I. & Rifki, A. (2006).** [Syndromic gingival fibromatosis.]. *Revue de stomatologie et de chirurgie maxillo-faciale* **107**, 477-480.
- Kleinjan, D. A., Seawright, A., Schedl, A., Quinlan, R. A., Danes, S. & van Heyningen, V. (2001).** Aniridia-associated translocations, DNase hypersensitivity, sequence comparison and transgenic analysis redefine the functional domain of PAX6. *Human molecular genetics* **10**, 2049-2059.
- Kleinjan, D. J. & van Heyningen, V. (1998).** Position effect in human genetic disease. *Human molecular genetics* **7**, 1611-1618.
- Klugbauer, N., Lacinova, L., Marais, E., Hobom, M. & Hofmann, F. (1999).** Molecular diversity of the calcium channel alpha2delta subunit. *J Neurosci* **19**, 684-691.
- Koch, P., Wettstein, A., Knauber, J. & Zaun, H. (1992).** A new case of Zimmermann-Laband syndrome with atypical retinitis pigmentosa. *Acta dermato-venereologica* **72**, 376-379.
- Kolomietz, E., Meyn, M. S., Pandita, A. & Squire, J. A. (2002).** The role of Alu repeat clusters as mediators of recurrent chromosomal aberrations in tumors. *Genes, chromosomes & cancer* **35**, 97-112.
- Krupnik, V. E., Sharp, J. D., Jiang, C. & other authors (1999).** Functional and structural diversity of the human Dickkopf gene family. *Gene* **238**, 301-313.
- Kuhl, M., Sheldahl, L. C., Park, M., Miller, J. R. & Moon, R. T. (2000).** The Wnt/Ca<sup>2+</sup> pathway: a new vertebrate Wnt signaling pathway takes shape. *Trends Genet* **16**, 279-283.
- Kumar, D. & Levick, R. K. (1986).** Autosomal dominant onychodystrophy and onychia with type B brachydactyly and ectrodactyly. *Clinical genetics* **30**, 219-225.



- Kutsche, K., Yntema, H., Brandt, A. & other authors (2000).** Mutations in ARHGEF6, encoding a guanine nucleotide exchange factor for Rho GTPases, in patients with X-linked mental retardation. *Nature genetics* **26**, 247-250.
- Laband, P. F., Habib, G. & Humphreys, G. S. (1964).** Hereditary Gingival Fibromatosis. Report of an Affected Family with Associated Splenomegaly and Skeletal and Soft-Tissue Abnormalities. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* **17**, 339-351.
- Lacombe, D., Bioulac-Sage, P., Sibout, M., Daussac, E., Lesure, F., Manchart, J. P. & Battin, J. (1994).** Congenital marked hypertrichosis and Laband syndrome in a child: overlap between the gingival fibromatosis-hypertrichosis and Laband syndromes. *Genetic counseling (Geneva, Switzerland)* **5**, 251-256.
- Lander, E. S., Linton, L. M., Birren, B. & other authors (2001).** Initial sequencing and analysis of the human genome. *Nature* **409**, 860-921.
- Lasken, R. S. & Egholm, M. (2003).** Whole genome amplification: abundant supplies of DNA from precious samples or clinical specimens. *Trends in biotechnology* **21**, 531-535.
- Lauderdale, J. D., Wilensky, J. S., Oliver, E. R., Walton, D. S. & Glaser, T. (2000).** 3' deletions cause aniridia by preventing PAX6 gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **97**, 13755-13759.
- Leandersson, K., Riesbeck, K. & Andersson, T. (2006).** Wnt-5a mRNA translation is suppressed by the Elav-like protein HuR in human breast epithelial cells. *Nucleic acids research* **34**, 3988-3999.
- Lee, J. A. & Lupski, J. R. (2006).** Genomic rearrangements and gene copy-number alterations as a cause of nervous system disorders. *Neuron* **52**, 103-121.
- Lees, D. H., Lawler, S. D., Renwick, J. H. & Thoday, J. M. (1957).** Anonychia with ectrodactyly: clinical and linkage data. *Annals of human genetics* **22**, 69-79.
- Leonard, J. C. (2006).** Karyotype stability of lymphoblastoid cell lines. *Cell Collections*, a publication of the Coriell cell repositories, 6-9.
- Lettice, L. A., Heaney, S. J., Purdie, L. A. & other authors (2003).** A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Human molecular genetics* **12**, 1725-1735.
- Lettice, L. A. & Hill, R. E. (2005).** Preaxial polydactyly: a model for defective long-range regulation in congenital abnormalities. *Current opinion in genetics & development* **15**, 294-300.
- Lieber, M. R. (1999).** The biochemistry and biological significance of nonhomologous DNA end joining: an essential repair process in multicellular eukaryotes. *Genes Cells* **4**, 77-85.
- Livak, K. J. & Schmittgen, T. D. (2001).** Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods (San Diego, Calif)* **25**, 402-408.
- Lovmar, L., Fredriksson, M., Liljedahl, U., Sigurdsson, S. & Syvanen, A. C. (2003).** Quantitative evaluation by minisequencing and microarrays reveals accurate multiplexed SNP genotyping of whole genome amplified DNA. *Nucleic acids research* **31**, e129.
- MacKinder, D. (1857).** Deficiency of fingers transmitted through six generations. *Brit. Med. J.* **1**: 845-846,.
- Mahloudji, M. & Amidi, M. (1971).** Simple anonychia. Further evidence for autosomal recessive inheritance. *Journal of medical genetics* **8**, 478-480.
- Malbon, C. C. & Wang, H. Y. (2006).** Dishevelled: a mobile scaffold catalyzing development. *Current topics in developmental biology* **72**, 153-166.
- Man, C., Rosa, J., Lee, L. T. & other authors (2006).** Latent membrane protein 1 suppresses RASSF1A expression, disrupts microtubule structures and induces chromosomal aberrations in human epithelial cells. *Oncogene*.
- Mao, B., Wu, W., Li, Y., Hoppe, D., Stannek, P., Glinka, A. & Niehrs, C. (2001a).** LDL-receptor-related protein 6 is a receptor for Dickkopf proteins. *Nature* **411**, 321-325.
- Mao, B., Wu, W., Davidson, G. & other authors (2002).** Kremen proteins are Dickkopf receptors that regulate Wnt/beta-catenin signalling. *Nature* **417**, 664-667.
- Mao, J., Wang, J., Liu, B. & other authors (2001b).** Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Molecular cell* **7**, 801-809.
- Marshall, R. I. & Bartold, P. M. (1998).** Medication induced gingival overgrowth. *Oral diseases* **4**, 130-151.

- Martins, R. C., Werneck, C. C., Rocha, L. A., Feres-Filho, E. J. & Silva, L. C. (2003).** Molecular size distribution analysis of human gingival glycosaminoglycans in cyclosporin- and nifedipine-induced overgrowths. *Journal of periodontal research* **38**, 182-189.
- Merrill, G. F. (1998).** Cell Synchronization, *Methods Cell Biol.*, **57**, 229-49
- Mikels, A. J. & Nusse, R. (2006).** Purified Wnt5a protein activates or inhibits beta-catenin-TCF signaling depending on receptor context. *PLoS biology* **4**, e115.
- Miller, G., Lisco, H., Kohn, H. I., Stitt, D. & Enders, J. F. (1971).** Establishment of cell lines from normal adult human blood leukocytes by exposure to Epstein-Barr virus and neutralization by human sera with Epstein-Barr virus antibody. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine Society for Experimental Biology and Medicine (New York, NY)* **137**, 1459-1465.
- Miller, J. R. (2002).** The Wnts. *Genome biology* **3**, REVIEWS3001.
- Mitelman, F. (2000).** Recurrent chromosome aberrations in cancer. *Mutation research* **462**, 247-253.
- Monaghan, A. P., Kioschis, P., Wu, W., Zuniga, A., Bock, D., Poustka, A., Delius, H. & Niehrs, C. (1999).** Dickkopf genes are co-ordinately expressed in mesodermal lineages. *Mechanisms of development* **87**, 45-56.
- Morley, M., Molony, C. M., Weber, T. M., Devlin, J. L., Ewens, K. G., Spielman, R. S. & Cheung, V. G. (2004).** Genetic analysis of genome-wide variation in human gene expression. *Nature* **430**, 743-747.
- Morrison, T. B., Weis, J. J. & Wittwer, C. T. (1998).** Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *BioTechniques* **24**, 954-958, 960, 962.
- Mukhopadhyay, M., Shtrom, S., Rodriguez-Esteban, C. & other authors (2001).** Dickkopf1 is required for embryonic head induction and limb morphogenesis in the mouse. *Developmental cell* **1**, 423-434.
- Mullis, K. B. & Faloona, F. A. (1987).** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods in enzymology* **155**, 335-350.
- Murray, J. (1873).** On three peculiar cases of molluscum fibrosum in one family. *Med. Chir. Trans. London* **56**, 235-238.
- Nam, J. S., Turcotte, T. J., Smith, P. F., Choi, S. & Yoon, J. K. (2006a).** Mouse cristin/R-spondin family proteins are novel ligands for the Frizzled 8 and LRP6 receptors and activate beta-catenin-dependent gene expression. *The Journal of biological chemistry* **281**, 13247-13257.
- Nam, J. S., Turcotte, T. J. & Yoon, J. K. (2006b).** Dynamic expression of R-spondin family genes in mouse development. *Gene Expr Patterns*.
- Newell, J. & Irwin, C. R. (1997).** Comparative effects of cyclosporin on glycosaminoglycan synthesis by gingival fibroblasts. *Journal of periodontology* **68**, 443-447.
- Niemann, S., Zhao, C., Pascu, F., Stahl, U., Aulepp, U., Niswander, L., Weber, J. L. & Muller, U. (2004).** Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *American journal of human genetics* **74**, 558-563.
- Nishikawa, S., Tada, H., Hamasaki, A., Kasahara, S., Kido, J., Nagata, T., Ishida, H. & Wakano, Y. (1991).** Nifedipine-induced gingival hyperplasia: a clinical and in vitro study. *Journal of periodontology* **62**, 30-35.
- Nishita, M., Yoo, S. K., Nomachi, A., Kani, S., Sougawa, N., Ohta, Y., Takada, S., Kikuchi, A. & Minami, Y. (2006).** Filopodia formation mediated by receptor tyrosine kinase Ror2 is required for Wnt5a-induced cell migration. *The Journal of cell biology* **175**, 555-562.
- Nomi, M., Oishi, I., Kani, S. & other authors (2001).** Loss of mRor1 enhances the heart and skeletal abnormalities in mRor2-deficient mice: redundant and pleiotropic functions of mRor1 and mRor2 receptor tyrosine kinases. *Molecular and cellular biology* **21**, 8329-8335.
- Nusse, R. (1999).** WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet* **15**, 1-3.
- Nusse, R. (2001).** An ancient cluster of Wnt paralogues. *Trends Genet* **17**, 443.
- Nusse, R. (2005).** Wnt signaling in disease and in development. *Cell research* **15**, 28-32.
- Oikawa, K., Cavaglia, A. M. & Lu, D. (1979).** Laband syndrome: report of case. *J Oral Surg* **37**, 120-122.
- Oishi, I., Suzuki, H., Onishi, N. & other authors (2003).** The receptor tyrosine kinase Ror2 is involved in non-canonical Wnt5a/JNK signalling pathway. *Genes Cells* **8**, 645-654.
- Oldridge, M., Fortuna, A. M., Maringa, M. & other authors (2000).** Dominant mutations in ROR2, encoding an orphan receptor tyrosine kinase, cause brachydactyly type B. *Nature genetics* **24**, 275-278.

- Olson, D. J. & Papkoff, J. (1994).** Regulated expression of Wnt family members during proliferation of C57mg mammary cells. *Cell Growth Differ* **5**, 197-206.
- Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM (TM).** McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). World Wide Web URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/>
- Onno, M., Nakamura, T., Hilova, J. & Hill, M. (1992).** Rearrangement of the human tre oncogene by homologous recombination between Alu repeats of nucleotide sequences from two different chromosomes. *Oncogene* **7**, 2519-2523.
- Orita, M., Iwahana, H., Kanazawa, H., Hayashi, K. & Sekiya, T. (1989).** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 2766-2770.
- Passarge, E. & Fuchs-Mecke, S. (1975).** Oculocerebral syndrome with hypopigmentation. *Birth defects original article series* **11**, 466-467.
- Pfeiffer, R. A., Seemanova, E., Suss, J., Mussig, D. & Tietze, H. U. (1992).** The Zimmermann-Laband syndrome]. *Klinische Padiatrie* **204**, 1-5.
- Phippard, D., Boyd, Y., Reed, V., Fisher, G., Masson, W. K., Evans, E. P., Saunders, J. C. & Crenshaw, E. B., 3rd (2000).** The sex-linked fidget mutation abolishes Brn4/Pou3f4 gene expression in the embryonic inner ear. *Human molecular genetics* **9**, 79-85.
- Prosser, J. & van Heyningen, V. (1998).** PAX6 mutations reviewed. *Human mutation* **11**, 93-108.
- Puretic, S., Puretic, B., Fiser-Herman, M. & Adamcic, M. (1962).** A unique form of mesenchymal dysplasia. *The British journal of dermatology* **74**, 8-19.
- Qin, N., Yagel, S., Momplaisir, M. L., Codd, E. E. & D'Andrea, M. R. (2002).** Molecular cloning and characterization of the human voltage-gated calcium channel alpha(2)delta-4 subunit. *Molecular pharmacology* **62**, 485-496.
- Radonic, A., Thulke, S., Mackay, I. M., Landt, O., Siegert, W. & Nitsche, A. (2004).** Guideline to reference gene selection for quantitative real-time PCR. *Biochemical and biophysical research communications* **313**, 856-862.
- Ramon, Y., Berman, W. & Bubis, J. J. (1967).** Gingival fibromatosis combined with cherubism. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology* **24**, 435-448.
- Ramos-Galvan, R. (1975).** [Pediatric somatometry. Semilongitudinal study of children in Mexico City]. *Archivos de investigacion medica* **6 Suppl 1**, 83-396.
- Rasmussen, R. (2001).** Quantification on the LightCycler, In Meuer, S., Wittner, C., Nakagawara, K. (eds), *Rapid Cycle Real-Time PCR, Methods and Applications*. Springer Presse, Heidelberg, pp. 21-34.
- Ravnik-Glavac, M., Glavac, D. & Dean, M. (1994).** Sensitivity of single-strand conformation polymorphism and heteroduplex method for mutation detection in the cystic fibrosis gene. *Human molecular genetics* **3**, 801-807.
- Reddy, S., Andl, T., Bagasra, A., Lu, M. M., Epstein, D. J., Morrisey, E. E. & Millar, S. E. (2001).** Characterization of Wnt gene expression in developing and postnatal hair follicles and identification of Wnt5a as a target of Sonic hedgehog in hair follicle morphogenesis. *Mechanisms of development* **107**, 69-82.
- Reddy, S. T., Andl, T., Lu, M. M., Morrisey, E. E. & Millar, S. E. (2004).** Expression of Frizzled genes in developing and postnatal hair follicles. *The Journal of investigative dermatology* **123**, 275-282.
- Reich, D. E., Gabriel, S. B. & Altshuler, D. (2003).** Quality and completeness of SNP databases. *Nature genetics* **33**, 457-458.
- Reznik, V. M., Jones, K. L., Durham, B. L. & Mendoza, S. A. (1987).** Changes in facial appearance during cyclosporin treatment. *Lancet* **1**, 1405-1407.
- Richardson, C. & Jasin, M. (2000).** Coupled homologous and nonhomologous repair of a double-strand break preserves genomic integrity in mammalian cells. *Molecular and cellular biology* **20**, 9068-9075.
- Rijsewijk, F., Schuermann, M., Wagenaar, E., Parren, P., Weigel, D. & Nusse, R. (1987).** The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell* **50**, 649-657.
- Robertson, S. P., Lipp, H. & Bankier, A. (1998).** Zimmermann-Laband syndrome in an adult. Long-term follow-up of a patient with vascular and cardiac complications. *Am J Med Genet* **78**, 160-164.

- Robinow, M., Silverman, F. N. & Smith, H. D. (1969).** A newly recognized dwarfing syndrome. *American journal of diseases of children (1960)* **117**, 645-651.
- Rocha, L. A., Martins, R. C., Werneck, C. C., Feres-Filho, E. J. & Silva, L. C. (2000).** Human gingival glycosaminoglycans in cyclosporin-induced overgrowth. *Journal of periodontal research* **35**, 158-164.
- Romanos, G. E., Schroter-Kermani, C., Hinz, N. & Bernimoulin, J. P. (1992).** Distribution of fibronectin in healthy, inflamed and drug-induced gingival hyperplasia. *J Oral Pathol Med* **21**, 256-260.
- Rosenak, D., Ariel, I., Arnon, J. & other authors (1991).** Recurrent tetraamelia and pulmonary hypoplasia with multiple malformations in sibs. *Am J Med Genet* **38**, 25-28.
- Roth, D. B. & Wilson, J. H. (1986).** Nonhomologous recombination in mammalian cells: role for short sequence homologies in the joining reaction. *Molecular and cellular biology* **6**, 4295-4304.
- Royer-Pokora, B., Kunkel, L. M., Monaco, A. P., Goff, S. C., Newburger, P. E., Baehner, R. L., Cole, F. S., Curnutte, J. T. & Orkin, S. H. (1986).** Cloning the gene for an inherited human disorder--chronic granulomatous disease--on the basis of its chromosomal location. *Nature* **322**, 32-38.
- Rudiger, N. S., Gregersen, N. & Kielland-Brandt, M. C. (1995).** One short well conserved region of Alu-sequences is involved in human gene rearrangements and has homology with prokaryotic chi. *Nucleic acids research* **23**, 256-260.
- Rutherford, M. E. (1931).** Three generations of inherited dental defect. *Brit. Med. J.* **2**, 9-11.
- Sagai, T., Masuya, H., Tamura, M., Shimizu, K., Yada, Y., Wakana, S., Gondo, Y., Noda, T. & Shiroishi, T. (2004).** Phylogenetic conservation of a limb-specific, cis-acting regulator of Sonic hedgehog ( Shh). *Mamm Genome* **15**, 23-34.
- Salic, A., Lee, E., Mayer, L. & Kirschner, M. W. (2000).** Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in Xenopus egg extracts. *Molecular cell* **5**, 523-532.
- Salo, T., Oikarinen, K. S. & Oikarinen, A. I. (1990).** Effect of phenytoin and nifedipine on collagen gene expression in human gingival fibroblasts. *J Oral Pathol Med* **19**, 404-407.
- Samarasinghe, Y. P., Cox, A. & Feher, M. D. (2004).** Calcium channel blocker induced gum hypertrophy: no class distinction. *Heart (British Cardiac Society)* **90**, 16.
- Sander, T., Berlin, W., Gscheidel, N., Wendel, B., Janz, D. & Hoehe, M. R. (2000).** Genetic variation of the human mu-opioid receptor and susceptibility to idiopathic absence epilepsy. *Epilepsy research* **39**, 57-61.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A. R. (1977).** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **74**, 5463-5467.
- Sanz-Ezquerro, J. J. & Tickle, C. (2003a).** Fgf signaling controls the number of phalanges and tip formation in developing digits. *Curr Biol* **13**, 1830-1836.
- Sanz-Ezquerro, J. J. & Tickle, C. (2003b).** Digital development and morphogenesis. *Journal of anatomy* **202**, 51-58.
- Sarkar, G., Yoon, H. S. & Sommer, S. S. (1992).** Screening for mutations by RNA single-strand conformation polymorphism (rSSCP): comparison with DNA-SSCP. *Nucleic acids research* **20**, 871-878.
- Schincaglia, G. P., Forniti, F., Cavallini, R., Piva, R., Calura, G. & del Senno, L. (1992).** Cyclosporin-A increases type I procollagen production and mRNA level in human gingival fibroblasts in vitro. *J Oral Pathol Med* **21**, 181-185.
- Schouten, J. P., McElgunn, C. J., Waaijer, R., Zwijnenburg, D., Diepvens, F. & Pals, G. (2002).** Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. *Nucleic acids research* **30**, e57.
- Schwabe, G. C., Tinschert, S., Buschow, C. & other authors (2000).** Distinct mutations in the receptor tyrosine kinase gene ROR2 cause brachydactyly type B. *American journal of human genetics* **67**, 822-831.
- Schwabe, G. C. & Mundlos, S. (2004).** Genetics of congenital hand anomalies. *Handchir Mikrochir Plast Chir* **36**, 85-97.
- Schwartz, S., Zhang, Z., Frazer, K. A., Smit, A., Riemer, C., Bouck, J., Gibbs, R., Hardison, R. & Miller, W. (2000).** PipMaker--a web server for aligning two genomic DNA sequences. *Genome research* **10**, 577-586.
- Semenza, G. L. (1994).** Transcriptional regulation of gene expression: mechanisms and pathophysiology. *Human mutation* **3**, 180-199.

- Sen, M., Chamorro, M., Reifert, J., Corr, M. & Carson, D. A. (2001).** Blockade of Wnt-5A/frizzled 5 signaling inhibits rheumatoid synoviocyte activation. *Arthritis and rheumatism* **44**, 772-781.
- Shah, N., Gupta, Y. K. & Ghose, S. (2004).** Zimmermann-Laband syndrome with bilateral developmental cataract - a new association? *International journal of paediatric dentistry / the British Paedodontic Society [and] the International Association of Dentistry for Children* **14**, 78-85.
- Sharma, A., Sharma, V. K., Horn-Saban, S., Lancet, D., Ramachandran, S. & Brahmachari, S. K. (2005).** Assessing natural variations in gene expression in humans by comparing with monozygotic twins using microarrays. *Physiological genomics* **21**, 117-123.
- Shaw, C. J. & Lupski, J. R. (2004).** Implications of human genome architecture for rearrangement-based disorders: the genomic basis of disease. *Human molecular genetics* **13 Spec No 1**, R57-64.
- Sheldahl, L. C., Slusarski, D. C., Pandur, P., Miller, J. R., Kuhl, M. & Moon, R. T. (2003).** Dishevelled activates Ca<sup>2+</sup> flux, PKC, and CamKII in vertebrate embryos. *The Journal of cell biology* **161**, 769-777.
- Shimizu, H., Julius, M. A., Giarre, M., Zheng, Z., Brown, A. M. & Kitajewski, J. (1997).** Transformation by Wnt family proteins correlates with regulation of beta-catenin. *Cell Growth Differ* **8**, 1349-1358.
- Sleiman, R. J. & Stewart, B. W. (2000).** Early caspase activation in leukemic cells subject to etoposide-induced G2-M arrest: evidence of commitment to apoptosis rather than mitotic cell death. *Clin Cancer Res* **6**, 3756-3765.
- Slusarski, D. C., Corces, V. G. & Moon, R. T. (1997).** Interaction of Wnt and a Frizzled homologue triggers G-protein-linked phosphatidylinositol signalling. *Nature* **390**, 410-413.
- Smith, H. O. & Birnstiel, M. L. (1976).** A simple method for DNA restriction site mapping. *Nucleic acids research* **3**, 2387-2398.
- Smith, K. D., Kemp, S., Braiterman, L. T. & other authors (1999).** X-linked adrenoleukodystrophy: genes, mutations, and phenotypes. *Neurochemical research* **24**, 521-535.
- Solinas-Toldo, S., Lampel, S., Stilgenbauer, S., Nickolenko, J., Benner, A., Dohner, H., Cremer, T. & Lichter, P. (1997).** Matrix-based comparative genomic hybridization: biochips to screen for genomic imbalances. *Genes, chromosomes & cancer* **20**, 399-407.
- Stankiewicz, P. & Lupski, J. R. (2002).** Molecular-evolutionary mechanisms for genomic disorders. *Current opinion in genetics & development* **12**, 312-319.
- Stankiewicz, P., Shaw, C. J., Dapper, J. D., Wakui, K., Shaffer, L. G., Withers, M., Elizondo, L., Park, S. S. & Lupski, J. R. (2003).** Genome architecture catalyzes nonrecurrent chromosomal rearrangements. *American journal of human genetics* **72**, 1101-1116.
- Stefanova, M., Atanassov, D., Krastev, T., Fuchs, S. & Kutsche, K. (2003).** Zimmermann-Laband syndrome associated with a balanced reciprocal translocation t(3;8)(p21.2;q24.3) in mother and daughter: molecular cytogenetic characterization of the breakpoint regions. *American journal of medical genetics* **117**, 289-294.
- Steiner, C. E. & Marques, A. P. (2000).** Growth deficiency, mental retardation and unusual facies. *Clinical dysmorphology* **9**, 155-156.
- Steinmetz, M., Uematsu, Y., Lindahl K. (1987).** Hotspots of homologous recombination in mammalian genomes. *Trends Genet.*, **3**, 7-10
- Stenger, J. E., Lobachev, K. S., Gordenin, D., Darden, T. A., Jurka, J. & Resnick, M. A. (2001).** Biased distribution of inverted and direct Alus in the human genome: implications for insertion, exclusion, and genome stability. *Genome research* **11**, 12-27.
- Stephens, J. C., Schneider, J. A., Tanguay, D. A. & other authors (2001).** Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science* **293**, 489-493.
- Stewart, H., Kerr, B., Tomlin, P., Stacey, D. & Super, M. (2000).** Sibs with developmental delay, hirsutism and nail hypoplasia: a new syndrome. *Clinical dysmorphology* **9**, 241-246.
- Strachan, T. & Read, A. P. (1999).** Human Molecular Genetics, 2nd Edition, New York and London, *Garland Science*, Chapter 15.
- Strachan, T. & Read, A. R. (2005).** Molekulare Humangenetik. 3. Auflage, *Spektrum Akademischer Verlag, Elsevier*. 118-140.
- Takeuchi, A., Shimizu, M., Nishina, M., Shirasuna, K., Miura, A., Nakajima, T. & Oda, K. (1999).** Enhancer and silencer binding proteins involved in the rat cdc2 promoter activation at the G1/S boundary. *Genes Cells* **4**, 229-242.

- Tamai, K., Semenov, M., Kato, Y., Spokony, R., Liu, C., Katsuyama, Y., Hess, F., Saint-Jeannet, J. P. & He, X. (2000). LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* **407**, 530-535.
- Timchenko, L. T. & Caskey, C. T. (1996). Trinucleotide repeat disorders in humans: discussions of mechanisms and medical issues. *Faseb J* **10**, 1589-1597.
- Timerman, I., Museteanu, C. & Simionescu, N. N. (1969). Dominant anonychia and onychodystrophy. *Journal of medical genetics* **6**, 105-106.
- Timmer, J. & Wildervanck, L. S. (1969). [Congenital complete anonychia of fingers and toes]. *Nederlands tijdschrift voor geneeskunde* **113**, 395-397.
- Tipton, D. A. & Dabbous, M. K. (1998). Autocrine transforming growth factor beta stimulation of extracellular matrix production by fibroblasts from fibrotic human gingiva. *Journal of periodontology* **69**, 609-619.
- Tolwinski, N. S. & Wieschaus, E. (2004). A nuclear function for armadillo/beta-catenin. *PLoS biology* **2**, E95.
- Trackman, P. C. & Kantarci, A. (2004). Connective tissue metabolism and gingival overgrowth. *Crit Rev Oral Biol Med* **15**, 165-175.
- Umbhauer, M., Djiane, A., Goisset, C., Penzo-Mendez, A., Riou, J. F., Boucaut, J. C. & Shi, D. L. (2000). The C-terminal cytoplasmic Lys-thr-X-X-X-Trp motif in frizzled receptors mediates Wnt/beta-catenin signalling. *The EMBO journal* **19**, 4944-4954.
- Vallee, L., Van Nerom, P. Y., Ferraz, F. G., Delecour, M., Maroteaux, P., Farriaux, J. P. & Fontaine, G. (1982). [Robinow's syndrome with dominant transmission]. *Archives francaises de pediatrie* **39**, 447-448.
- Van Buggenhout, G. J., Brunner, H. G., Trommelen, J. C. & Hamel, B. C. (1995). Zimmermann-Laband syndrome in a patient with severe mental retardation. *Genetic counseling (Geneva, Switzerland)* **6**, 321-327.
- Van der Ploeg, L. H., Konings, A., Oort, M., Roos, D., Bernini, L. & Flavell, R. A. (1980). gamma-beta-Thalassaemia studies showing that deletion of the gamma- and delta-genes influences beta-globin gene expression in man. *Nature* **283**, 637-642.
- van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H. & Kanaar, R. (2001). Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nature reviews* **2**, 196-206.
- van Ommen, G. J., Verkerk, J. M., Hofker, M. H. & other authors (1986). A physical map of 4 million bp around the Duchenne muscular dystrophy gene on the human X-chromosome. *Cell* **47**, 499-504.
- Vanin, E. F., Henthorn, P. S., Kioussis, D., Grosveld, F. & Smithies, O. (1983). Unexpected relationships between four large deletions in the human beta-globin gene cluster. *Cell* **35**, 701-709.
- Veeman, M. T., Slusarski, D. C., Kaykas, A., Louie, S. H. & Moon, R. T. (2003). Zebrafish prickle, a modulator of noncanonical Wnt/Fz signaling, regulates gastrulation movements. *Curr Biol* **13**, 680-685.
- Venter, J. C., Adams, M. D., Myers, E. W. & other authors (2001). The sequence of the human genome. *Science* **291**, 1304-1351.
- Wallingford, J. B., Fraser, S. E. & Harland, R. M. (2002). Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Developmental cell* **2**, 695-706.
- Wallingford, J. B. & Habas, R. (2005). The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development (Cambridge, England)* **132**, 4421-4436.
- Warburton, D. (1991). De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *American journal of human genetics* **49**, 995-1013.
- Ward, K. J., Ellard, S., Yajnik, C. S., Frayling, T. M., Hattersley, A. T., Venigalla, P. N. & Chandak, G. R. (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 in health and disease* **5**, 11.
- Weaver, D. T. & DePamphilis, M. L. (1982). Specific sequences in native DNA that arrest synthesis by DNA polymerase alpha. *The Journal of biological chemistry* **257**, 2075-2086.
- West, A. G. & Fraser, P. (2005). Remote control of gene transcription. *Human molecular genetics* **14 Spec No 1**, R101-111.
- Weterings, E. & van Gent, D. C. (2004). The mechanism of non-homologous end-joining: a synopsis of synapsis. *DNA repair* **3**, 1425-1435.
- Willershausen-Zonnchen, B., Lemmen, C. & Schumacher, U. (1992). Influence of cyclosporine A on growth and extracellular matrix synthesis of human fibroblasts. *Journal of cellular physiology* **152**, 397-402.
- Winter, R., Baraister, M. (2003). London Medical Databasis, Version 1.0.1, Oxford University Press.

- Witkop, C. J., Jr. (1965).** Genetic disease of the oral cavity. In: Tiecke, R. W. : Oral Pathology. New York: McGraw-Hill (pub.). Pp. 810-814.
- Wolf, U. (1997).** Identical mutations and phenotypic variation. *Human genetics* **100**, 305-321.
- Wong, G. T., Gavin, B. J. & McMahon, A. P. (1994).** Differential transformation of mammary epithelial cells by Wnt genes. *Molecular and cellular biology* **14**, 6278-6286.
- Woods, C. G., Stricker, S., Seemann, P. & other authors (2006).** Mutations in WNT7A cause a range of limb malformations, including Fuhrmann syndrome and Al-Awadi/Raas-Rothschild/Schinzel phocomelia syndrome. *American journal of human genetics* **79**, 402-408.
- Xiao, S., Bu, L., Zhu, L. & other authors (2001).** A new locus for hereditary gingival fibromatosis (GINGF2) maps to 5q13-q22. *Genomics* **74**, 180-185.
- Yamaguchi, T. P., Bradley, A., McMahon, A. P. & Jones, S. (1999).** A Wnt5a pathway underlies outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development (Cambridge, England)* **126**, 1211-1223.
- Yanagawa, S., Matsuda, Y., Lee, J. S., Matsubayashi, H., Sese, S., Kadowaki, T. & Ishimoto, A. (2002).** Casein kinase I phosphorylates the Armadillo protein and induces its degradation in *Drosophila*. *The EMBO journal* **21**, 1733-1742.
- Yang, Y., Topol, L., Lee, H. & Wu, J. (2003).** Wnt5a and Wnt5b exhibit distinct activities in coordinating chondrocyte proliferation and differentiation. *Development (Cambridge, England)* **130**, 1003-1015.
- Yoshikawa, S., McKinnon, R. D., Kokel, M. & Thomas, J. B. (2003).** Wnt-mediated axon guidance via the *Drosophila* Derailed receptor. *Nature* **422**, 583-588.
- Zajickova, K., Krepelova, A. & Zofkova, I. (2003).** A single nucleotide polymorphism under the reverse primer binding site may lead to BsmI mis-genotyping in the vitamin D receptor gene. *J Bone Miner Res* **18**, 1754-1757.
- Zemni, R., Bienvenu, T., Vinet, M. C. & other authors (2000).** A new gene involved in X-linked mental retardation identified by analysis of an X;2 balanced translocation. *Nature genetics* **24**, 167-170.
- Zimmer, E. Z., Taub, E., Sova, Y., Divon, M. Y., Pery, M. & Peretz, B. A. (1985).** Tetra-amelia with multiple malformations in six male fetuses of one kindred. *European journal of pediatrics* **144**, 412-414.
- Zimmermann, K. W. (1928).** Über Anomalien des Ektoderms. *Vjschr Zahnheilk* **44**, 419-434.
- Zlotogora, J., Sagi, M., Shabany, Y. O. & Jarallah, R. Y. (1993).** Syndrome of tetraamelia with pulmonary hypoplasia. *Am J Med Genet* **47**, 570-571.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden vom *American Journal of Medical Genetics* angenommen und befinden sich im Druck:

**Abo-Dalo, B.**, Kim, H-G., Roes, M., Stefanova, M., Higgins, A., Shen, Y., Mundlos, S., Quade, B., J., Gusella, J., F. and Kutsche, K. Extensive molecular genetic analysis of the 3p14.3 region in patients with Zimmermann-Laband syndrome.

Vorträge mit Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

**Abo-Dalo, B.**, Stefanova, M., Gal, A., Kutsche, K. (2004).

Identifizierung und funktionelle Charakterisierung des ursächlichen Gens für das Zimmermann-Laband-Syndrom. Tagung der Norddeutschen Humangenetiker, September 2004, Hamburg.

Poster mit Ergebnissen aus der vorliegenden Arbeit wurden auf folgenden Kongressen präsentiert:

**Abo-Dalo, B.**, Stefanova, M., Kim, H.G., Gusella, J. and Kutsche, K. (2005).

The gene causative for Zimmermann-Laband syndrome is located in 3p14.3.

16. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik vom 9.-12. März 2005, Halle/Saale.

**Abo-Dalo, B.**, Stefanova, M., Kim, H.G., Niedermaier, M., Mundlos, M., Gusella, J. and Kutsche, K. (2006).

Is the gene responsible for Zimmermann-Laband syndrome in 3p14.3?

17. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik vom 8.-11. März 2006, Heidelberg.

Roes, M., **Abo-Dalo, B.**, Kim, H-G., Stefanova, M., Gusella, J., and Kutsche, K. (2007)

Is the gene causative for Zimmermann-Laband syndrome located in 8q24.3?

18. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik vom 7.-10. März 2007, Bonn.



## **Eidesstattliche Erklärung**

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, anderen Werken wörtliche oder inhaltlich entnommene Stellen als solche kenntlich gemacht und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Ferner versichere ich, dass ich mich zu keiner Zeit anderweitig um Erlangung des Doktorgrades beworben habe.

Hamburg, den 08. März 2007

.....  
Benjamin Abo-Dalo

# LEBENS LAUF

## Persönliche Daten

Name	Benjamin Abo-Dalo
Geburtsdatum	25.03.1973
Geburtsort	Hamburg
Familienstand	verheiratet, eine Tochter

## Schul Ausbildung

Sept. 1979 - Juli 1991	Rudolf-Steiner-Schule Hamburg Farmsen
Jan. 1988 - Juli 1988	Hawthorne Valley Highschool, Albany, New York
Sept. 1991 - Juli 1994	Emil-Krause-Gymnasium, Hamburg
Juli 1994	Allgemeine Hochschulreife

## Studium

Okt. 1996 - Okt. 2001	Studium der Biologie an der Universität Hamburg
Dez. 2001 - Okt. 2002	Diplomarbeit am Bernhard-Nocht-Institut für Tropenmedizin in der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Rolf-Dieter Walter  Thema: „Molekularbiologische und biochemische Charakterisierung eines Spermidin/Spermin- <i>N</i> -Acetyltransferase-Homologons mit geändertem Substratspektrum aus <i>Caenorhabditis elegans</i> (Maupas, 1900)“
Juli 2003 - Apr. 2007	Doktorarbeit am Institut für Humangenetik, Universitäts-Klinikum Hamburg-Eppendorf in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche  Thema: „Molekulargenetische Analyse positioneller und funktioneller Kandidatengene bei Patienten mit Zimmermann-Laband-Syndrom“  1. Betreuer: Prof. Dr. Andreas Gal 2. Betreuer: Prof. Dr. Susanne Dobler

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. Kerstin Kutsche für die engagierte und umfassende Betreuung dieser Arbeit, die Anregungen, die Diskussionen, das stets offene Ohr und vor allem auch für die konstruktive Korrektur des Manuskripts.

Prof. Dr. Andreas Gal danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes, die vielfältige Unterstützung während der Arbeit, die Anregungen und Diskussionen und für die Begutachtung der Dissertationsschrift.

Prof. Dr. Susanne Dobler danke ich für die Übernahme des Zweitgutachtens dieser Arbeit.

Prof. Dr. Hans-Joachim Seitz danke ich für die freundliche Aufnahme in das Graduiertenkolleg 336 „Molekulare Endokrinologie – Molekularer Stoffwechsel“ und die damit einhergehende Förderung dieser Arbeit.

Inka Jantke danke ich besonders für die unkomplizierte und tatkräftige Unterstützung bei den vielen PCRs und Sequenzierungen. Mais oui, ça marche.

Dr. Georg Rosenberger danke ich für die Beantwortung vieler Fragen und die produktive Arbeitsatmosphäre im gemeinsamen Büro.

Für die selbstlose Bereitstellung von Lymphozyten bedanke ich mich bei Prof. Dr. Kerstin Kutsche, Dr. Sigrid Fuchs, Isabella Wimplinger, Verena Hertweck, Dr. Ingo Kurth, Dr. Moritz Hentschke und Alexandra Kougioumtzes.

Ich danke auch Barbara Schröder für die Hilfe bei den FISH-Experimenten.

Ferner danke ich Melanie Roes für die Unterstützung bei den Mutationsanalysen.

Den Kollegen der Arbeitsgruppe möchte für eine angenehme Atmosphäre, die Unterstützung und die Hilfsbereitschaft meinen Dank aussprechen.

Für die gute Zusammenarbeit bedanke ich mich bei allen Mitarbeitern/innen des Instituts für Humangenetik.

Von Herzen danke ich meiner Frau Birte für die intensive Unterstützung und die Aufmunterungen, insbesondere während anstrengender Phasen der Arbeit. Meiner Tochter Helene danke ich für das Licht und die Freude, die sie in mein Leben gebracht hat.

Meinen Eltern möchte ich für den Rückhalt und die Unterstützung meines Studiums danken.