

Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie  
Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin  
Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf  
Direktor Prof. Dr. Schneppenheim

**Molekulargenetische Analyse und  
klinische Präsentation  
von 4 Patienten mit  
Chédiak-Higashi Syndrom**

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin,  
der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg vorgelegt von

**Elisabeth Scherber**

aus Hamburg

Hamburg 2010

Angenommen von der Medizinischen Fakultät

der Universität Hamburg am: 05.07.2010

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen

Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss: die Vorsitzende: Prof. Dr. Gritta Janka

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Prof. Dr. R. Ganschow

Prüfungsausschuss: 3. Gutachter: PD Dr. S. Kindler

*Meiner Mutter*

## Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>6</b>
1.1 Hämophagozytische Syndrome.....	6
1.2 Das Chédiak-Higashi Syndrom (CHS) .....	9
1.2.1 Pathophysiologische Grundlagen.....	9
1.2.2 Klinische Charakteristika.....	11
1.2.3 Molekularbiologische Grundlagen.....	16
1.3 Fragestellung.....	22
<b>2. Patienten, Material und Methoden.....</b>	<b>24</b>
2.1 Patienten und DNA.....	24
2.2 Material.....	25
2.2.1 Geräte.....	25
2.2.2 Chemikalien.....	25
2.2.3 Oligonukleotide ( <i>Primer</i> ).....	26
2.3 Methoden.....	29
2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	29
2.3.2 Agarosegelelektrophorese.....	30
2.3.3 DNA-Sequenzierung.....	31
<b>3. Ergebnisse.....</b>	<b>35</b>
3.1 Krankengeschichten der 4 Patienten.....	35
3.1.1 Patient 1.....	35
3.1.2 Patient 2.....	37
3.1.3 Patient 3.....	39
3.1.4 Patient 4.....	41

3.2 Klinische Präsentation von Patienten mit CHS in der Literatur.....	44
3.3 Mutationsanalyse.....	46
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>54</b>
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>58</b>
<b>6. Literaturverzeichnis.....</b>	<b>60</b>
<b>7. Anhang.....</b>	<b>69</b>
7.1 Abkürzungen.....	69
7.2 Abbildungen.....	71
7.3 Danksagung.....	72
7.4 Lebenslauf.....	73
7.5 Eidesstattliche Erklärung.....	75

## 1. Einleitung

### 1.1 Hämophagozytische Syndrome

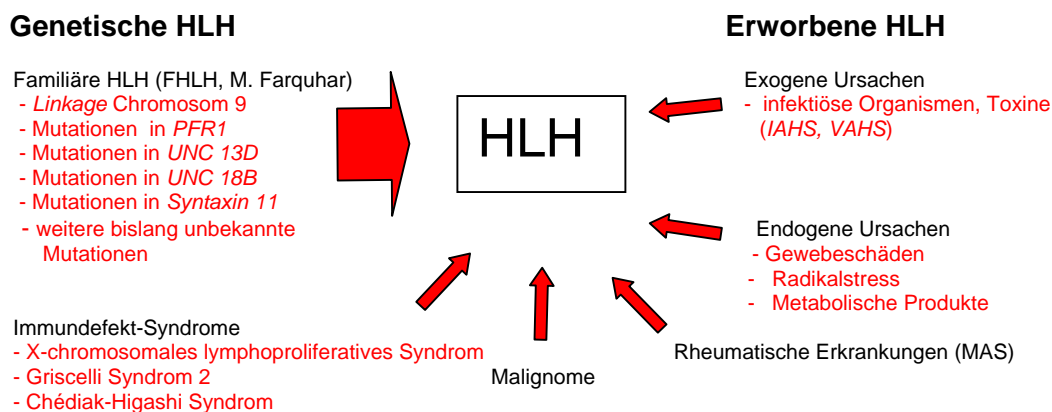
Die heterogene Gruppe der hämophagozytischen Syndrome, auch hämophagozytische Lymphohistiozytose (HLH) genannt, ist durch eine überschießende jedoch ineffektive Immunantwort charakterisiert. Dieser liegt ein angeborener oder erworbener Immundefekt zugrunde. Das klinische Bild der hämophagozytischen Syndrome ist mit anhaltendem Fieber, Panzytopenie und Hepatosplenomegalie eher unspezifisch. Seltener treten auch eine Gerinnungsstörung, ein Ikterus, eine Lymphadenopathie, ein Exanthem, Ödeme und neurologische Auffälligkeiten auf (Diagnosekriterien gemäß der Publikation der *Histiocyte Society*, Henter *et al.*, 2007). Die Inflammation kann aufgrund des Immundefektes nicht selbstständig beendet werden, charakteristisch sind hohe Konzentrationen inflammatorischer Zytokine. Die Hämophagozytose von Erythrozyten, Thrombozyten und Leukozyten durch Makrophagen hat der Krankheit ihren Namen gegeben. Die überschießende Immunantwort mit Organinfiltration (vor allem der Leber, der Milz, der Lymphknoten und des Knochenmarks) durch aktivierte Histiocyten und Lymphozyten führt häufig zum Tod (Janka, 2007).

Die HLH tritt in allen Altersgruppen auf. Sie wird grob in zwei Untergruppen unterteilt: die erworbene Form und die genetischen/familiären Formen der HLH (siehe **Abb. 1.1**). Der erworbenen HLH liegt kein genetischer Defekt zugrunde. Sie kann durch eine Vielfalt von infektiösen Erregern, insbesondere durch Viren, aber auch durch Bakterien, Protozoen und Pilze hervorgerufen werden (VAHS = virusassoziiertes hämophagozytisches Syndrom / IAHS = infektassoziiertes

hämophagozytisches Syndrom). Auch bei onkologischen Erkrankungen, insbesondere bei Lymphomen, kann sich eine HLH entwickeln. Dies ist im Kindesalter jedoch eher selten. Ebenfalls wurde die HLH bei rheumatologischen Erkrankungen (MAS = Makrophagenaktivierungssyndrom), Stoffwechselerkrankungen und nach Gewebsschädigungen beobachtet (Janka, 2007; Janka, 2009).

## HÄMOPHAGOZYTISCHE LYMPHOHISTIOZYTOSE

Klassifikation und zugrundeliegende Ursachen



**Abb. 1.1:** Klassifikation der hämophagozytischen Syndrome mit zugrundeliegenden Ursachen (modifiziert nach Janka, 2007)

Die genetischen Formen der HLH werden autosomal-rezessiv oder x-chromosomal vererbt. Sie werden unterteilt in die Familiäre HLH (FHLH, M. Farquhar, MIM 267700) und die Immundefekt-Syndrome: das Chédiak-Higashi Syndrom (CHS, MIM 214500), das Griscelli Syndrom Typ II (GS II, MIM 607624) und das x-chromosomale lymphoproliferative Syndrom (XLP, MIM 308240) (siehe **Tabelle 1.2**). Als Ursache für die Familiäre HLH wurden Mutationen in vier Genen (*Perforin*, *UNC13D*, *Syntaxin 11*, *UNC18B*) identifiziert (Feldmann *et al.*, 2003; Stepp *et al.* 1999; Zur Stadt *et al.*, 2005; Zur Stadt *et al.*, 2006; Zur

Stadt et al., 2009). Die FHLH ist eine genetisch heterogene Erkrankung. Bislang konnte nicht bei allen Patienten eine Mutation in einem der vier Gene nachgewiesen werden, sodass Mutationen in weiteren derzeit unbekanntem Genen als Ursache für die FHLH vermutet werden. Beim Griscelli Syndrom Typ II liegen Mutationen im *RAB27A*-Gen (Ménasché et al., 2000), beim x-chromosomalen lymphoproliferativen Syndrom im *SH2D1A*-Gen (Coffey et al., 1998) und *BIRC4*-Gen (Rigaud et al., 2006) und beim Chédiak-Higashi Syndrom im *CHS1*-Gen (Nagle et al., 1996) vor. Allen Erkrankungen, die zum Bild der HLH führen, ist ein Defekt der Aktivierung oder Funktion von Effektorzellen des Immunsystems gemeinsam, sodass die Immunantwort zwar überschießend, aber ineffektiv ist.

	M. Farquhar	Chédiak-Higashi Syndrom	Griscelli Syndrom II	XLP
Prävalenz	1/50.0000 Geburten	200 Fälle bis 1989	~60 Fälle bekannt seit 1978	1/1.000.000 Jungen
Diagnosealter	70% <1. Lebensjahr	~30 Monate	~17,5 Monate	~2,5 Jahre
Prävalenz einer HLH	immer	häufig	häufig	häufig
Klinische Manifestation	HLH als einzige Manifestation	HLH + Albinismus Infektanfälligkeit neurologische Defekte Blutungsneigung Riesengranula in Leukozyten	HLH + Albinismus Infektanfälligkeit, Panzytopenie neurologische Defekte Hypogammaglobulinämie keine Einschlußkörperchen	HLH nach Kontakt mit EBV sekundärer Antikörpermangel maligne Lymphome
Genetischer Defekt	PRF1, UNC13D, UNC18D, STX11	CHS-1	RAB27A	SH2D1A, BIRC4

Tabelle 1.1: Charakteristika der genetischen Formen der HLH im Überblick (EBV=Epstein-Barr-Virus)

Die Abgrenzung der genetischen von den erworbenen Formen der HLH ist schwierig. Die klinische Präsentation unterscheidet sich initial nicht, beide Formen können durch den Kontakt zu infektiösen Erregern ausgelöst werden. Patienten mit der genetischen Form werden meistens schon im frühen Kindesalter symptomatisch. Eine erworbene Form kann sich jedoch in diesem Alter ebenfalls manifestieren. Die genetische Form der HLH führt unbehandelt



immer zum Tod. Bei Patienten mit der erworbenen Form der HLH liegt die Mortalität bei 50% (Janka *et al.*, 1998). Die Charakteristika der Krankheitsbilder, die den genetischen Formen der HLH zugrunde liegen, sind in **Tabelle 1.1** dargestellt. Wird anhand der klinischen Charakteristika eine Verdachtsdiagnose gestellt, so kann diese anschließend durch eine molekulargenetische Untersuchung des jeweiligen Gens bestätigt werden.

## 1.2 Das Chédiak-Higashi Syndrom (CHS)

Das Chédiak-Higashi Syndrom (CHS; MIM 214500) ist ein sehr seltenes Immundefekt-Syndrom. Da im Krankheitsverlauf des CHS häufig eine HLH auftritt, wird es zu den hämophagozytischen Syndromen gezählt. Die klinischen Charakteristika des Chédiak-Higashi Syndroms wurden erstmals 1943 von dem kubanischen Pädiater A.B. Beguez-Cesar beschrieben (Beguez-Cesar, 1943) und 1948 von A. Steinbrinck ergänzt (Steinbrinck, 1948). Die Beschreibung der pathognomonischen „Riesengranula“ in Leukozyten und deren Vorstufen in Blut und Knochenmark von Patienten mit CHS erfolgte durch Moises Chédiak und Ototoka Higashi (Chédiak, 1952; Higashi, 1954). Aktuelle Angaben zur Prävalenz des CHS liegen nicht vor. Bis 1989 wurde von weltweit 200 bekannten Fällen berichtet (Witkop *et al.*, 1989).

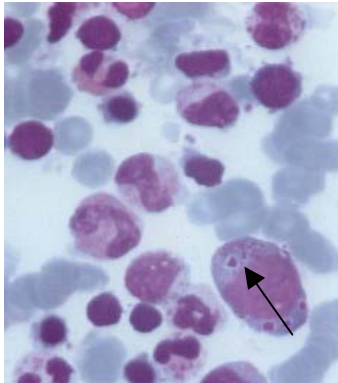
### 1.2.1 Pathophysiologische Grundlagen

Die pathophysiologische Grundlage des CHS ist der Defekt eines Proteins (LYST=*Lysosomal trafficking regulator protein*), das für den intrazellulären Transport der Zellen essentiell ist. Generell sind alle Zellen des Körpers von dieser Transportstörung betroffen. Es werden jedoch nur die Zellen stark in ihrer Funktion beeinträchtigt, deren sekretorische Leistung auf die Funktion der

lysosomalen Organellen angewiesen ist. Dies sind die Zellen des Immunsystems, die Thrombozyten, die Melanozyten und die Neurone.

In gesunden Zellen werden die sekretorischen Lysosomen am Transgolginetzwerk durch Fusion mehrerer später Endosomen gebildet. Die Lysosomen sammeln sich um das perinukleäre Mikrotubuli-Organisationszentrum (MTOC) des Mikrotubulinetzwerkes. Werden an der Zellmembran spezifische Rezeptoren aktiviert, nähert sich das MTOC inklusive der Lysosomen durch Repolarisierung des Mikrotubulinetzwerkes in die Richtung der aktivierten Rezeptoren der Zellmembran an. Die Lysosomen wandern entlang der Mikrotubuli an die Zellmembran. Durch Exozytose erfolgt die Sekretion des lysosomalen Inhaltes (Stinchcombe *et al.*, 2004).

Die Funktion des LYST im intrazellulären Transport wurde noch nicht vollständig geklärt. Als gesichert wird angesehen, dass es durch den Defekt des LYST zu einer Störung der lysosomalen Formation kommt. Die Lysosomen, die thrombozytären elektronendichten Granula, die Melanosomen und die sekretorischen Granula der Leukozyten sind vergrößert und in ihrer Anzahl verringert. Es wird angenommen, dass die vergrößerten lysosomalen Organellen, auch „Riesengranula“ genannt, das Ergebnis einer vermehrten Membranfusion oder einer verminderten Membranfission während der späten lysosomalen Biogenese sind (Perou *et al.*, 1997; Stinchcombe *et al.*, 2000; Stinchcombe *et al.*, 2004). Im Blut- und Knochenmarksausstrich der Patienten zeigen sich die „Riesengranula“ in Leukozyten und ihren Vorstufen (siehe **Abb. 1.2**). Die Granula sind Peroxidase positiv und gelten als pathognomonisch für das CHS. Sie ermöglichen die Diagnose und die Abgrenzung gegenüber dem Griscelli Syndrom Typ 2.



**Abb. 1.2:** Knochenmarksausstrich eines Patienten mit CHS (Pfeil: pathognomonische „Riesengranula“ in einem Monozyten, Färbung nach Pappenheim)

Eine zusätzliche Funktion von LYST wird in der Beeinflussung des Aufbaus und der Reparaturmechanismen der Plasmamembran, sowie der Exozytose vermutet (McVey Ward *et al.*, 2000+2003). Ebenso wird ein Einfluss von LYST auf den Austausch von Membranpartikeln zwischen Transgolginetzwerk und späten Endosomen diskutiert (Introne, *et al.*, 1999). Eine Hypothese bezüglich einer Störung des Mikrotubulinnetzwerkes, beziehungsweise dessen Interaktion mit den lysosomalen Organellen, wurde weitgehend verworfen (Perou *et al.*, 1993). Zusammenfassend werden demnach durch den Defekt von LYST die Formation und die Wanderung der Lysosomen entlang des Zytoskeletts sowie die Exozytose des Lysosomeninhaltes gestört. Damit ist die Sekretionsleistung dieser Zellen stark beeinträchtigt.

### 1.2.2 Klinische Charakteristika

Das klinische Bild des Chédiak-Higashi Syndroms ist durch Defekte des Immunsystems, der okulo-kutanen Pigmentierung, der Thrombozytenfunktion und des Nervensystems geprägt. Meist fällt schon bei der Geburt eine Hypopigmentation von Haut, Haaren und Augen (okulokutaner Albinismus) der Patienten auf. Bedingt durch den ethnischen Hintergrund der Patienten kommt

es zu einer unterschiedlichen Ausprägung der Hypopigmentation. So kann das Haar von schwarz bis kalkweiß imponieren, ist in jedem Fall aber deutlich heller als das Haar von Eltern und Geschwistern. Charakteristisch ist ein silbriger Glanz des Haares. Die Augen zeigen eine reduzierte Pigmentierung von Retina, Iris, Choroidea und Ziliarepithel. Die Iris kann grau, blau aber auch braun imponieren. Rötlich erscheinende Augen sind eher die Ausnahme. Die meisten Kinder leiden an Photophobie und einer reduzierten Sehleistung. Auch Papillenödem, Nystagmus und Refraktionsfehler kommen vor (Introne *et al.*, 1999).

Ursache der Hypopigmentation ist eine Störung des Melanosomentransportes. In gesunden Zellen wird das Melanin in Melanosomen an die Oberfläche der Melanozyten transportiert und dort an benachbarte Keratinozyten abgegeben. Dadurch entsteht die Pigmentierung von Haut, Haaren und Augen. Infolge der intrazellulären Transportstörung und der Störung der Melanosomenformation bei Patienten mit CHS lagern sich vergrößerte wenig pigmentierte Melanosomen in den Melanozyten perinukleär ab. Der intrazelluläre Transport zur Zellmembran, die Abgabe des Melanins an die Keratinozyten und damit die Pigmentierung unterbleibt (Wolf *et al.*, 2006).

Die leicht erhöhte Blutungsneigung der CHS-Patienten äußert sich vornehmlich in einer Neigung zu Hämatomen, Petechien, Epistaxis und Schleimhautblutungen (Introne *et al.*, 1999). Die Blutungsneigung entsteht durch eine Störung der Formation und des Transportes der elektronendichten Granula in Thrombozyten. Physiologischerweise erfolgt bei Endothelverletzungen initial eine Thrombozytenaggregation. Im Anschluss sezernieren die Thrombozyten mit Hilfe der elektronendichten Granula Serotonin, ADP, ATP, Kalzium und Pyrophosphat und lösen damit die weitere Plättchenaggregation aus. Beim CHS ist die Konzentration dieser Metabolite in den Granula vermindert. Zudem bleibt

ihre Ausschüttung durch die intrazelluläre Transportstörung weitgehend aus, sodass die zweite Welle der Plättchenaggregation gestört ist. Die Thrombozytenzahl ist dabei nicht vermindert und die Gerinnungskaskade ist ungestört (Wolf *et al.*, 2006).

Störungen des neurologischen Funktionsbereiches bei Patienten mit CHS wurden erstmals 1957 beschrieben (Donahue, Bain, 1957). Sie treten zumeist erst nach langjährigem Verlauf der Erkrankung bei milden Formen des CHS oder nach erfolgreicher Knochenmarkstransplantation auf (Tardieu *et al.*, 2005). Bei der Mehrheit der Patienten mit CHS besteht eine globale oder partielle Entwicklungsretardierung meist mit intellektuellen Defiziten. Diese könnte eventuell auch multifaktoriell bedingt sein, da viele Eltern von CHS-Patienten konsanguin sind und zusätzliche genetische Defekte eine Rolle spielen könnten. Auch ein pathologisch verlangsamtes Elektroenzephalogramm (EEG) ist bei vielen Patienten beobachtet worden. Seltener und bislang nur in wenigen Fällen beschrieben sind kortikale Hirnatrophie, Parkinson-Syndrom (L-Dopa-responsiv), zerebelläre Ataxie, senso-motorische Polyneuropathien, verminderte Nervenleitgeschwindigkeit, Pyramidenbahnstörungen, Dystonie, epileptische Anfälle, Hirnnervenstörungen (vorwiegend N. facialis), Nystagmus, Verlust der tiefen Sehnenreflexe, Tremor, Atrophie des Rückenmarkes und retinale Pigmentdegeneration (Silveira-Moriyama *et al.*, 2004).

Es ist bislang nicht geklärt wie die intrazelluläre Transportstörung Neurone und Gliazellen in ihrer Funktion beeinträchtigt. Ebenso unklar bleibt die Ursache für dieses heterogenes Bild an neurologischen Krankheiten, die durch den Defekt des LYST ausgelöst werden. Es wird derzeit diskutiert, ob eine Schädigung der Neurone durch eine lymphohistiozytäre Infiltration ins Zentrale Nervensystem (ZNS) im Rahmen der HLH als einzige Ursache der neurologischen Defekte

möglich ist. Gegen diese Hypothese spricht das Auftreten neurologischer Defekte bei Patienten mit milderer Erkrankung ohne das Auftreten einer HLH. Wahrscheinlich erscheint eine bislang ungeklärte Funktionsstörung der Neurone und Gliazellen mit zusätzlicher neuronaler Schädigung in der akzelerierten Phase (Wolf *et al.*, 2006).

Der Krankheitsverlauf des Chédiak-Higashi Syndroms wird durch einen meist schweren Immundefekt bestimmt. Schon in früher Kindheit neigen die Kinder zu rezidivierenden beziehungsweise chronischen Infektionen, vor allem der Haut und der oberen Atemwege. Typische Erreger sind dabei *Staphylococcus aureus*,  $\beta$ -hämolyisierende Streptokokken, *Candida albicans*, *Aspergillus fumigatus* und diverse Viren (insbesondere der Herpesgruppe). Auf Antibiotika sprechen die Patienten oft verzögert oder gar nicht an (Introne *et al.*, 1999).

Bei Patienten mit dem CHS ist primär die spezifische zelluläre Immunantwort gestört. Physiologischerweise erfolgt die zytotoxische Elimination von infektiösen Erregern durch zytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und natürliche Killerzellen (NK-Zellen). Die lytischen Granula von CTL und NK-Zellen, die Perforin und Serinproteasen enthalten, werden nach Kontakt mit einer antigenpräsentierenden Zelle entlang des Zytoskeletts zur Zellmembran transportiert und an die Zielzelle abgegeben. Durch die Transportstörung und lysosomale Formationsstörung bei Patienten mit CHS erfolgt keine Ausschüttung von Perforin und demzufolge keine ausreichende zelluläre Immunantwort (Stinchcombe *et al.*, 2000; Barrat *et al.*, 1999). Auch die unspezifische zelluläre Immunität von Makrophagen und Granulozyten ist beim CHS beeinträchtigt. Sie weisen eine verminderte Chemotaxis auf und zeigen eine verzögerte Fusion von Phagosomen mit Lysosomen zu Phagolysosomen. Dies führt zu einer intrazellulären Persistenz von Bakterien und begünstigt

chronische Infekte. Zusätzlich wird eine Funktionsstörung der Antigenpräsentation der B-Lymphozyten vermutet (Wolf J *et al.*, 2006).

Bei fehlender perforinvermittelter Zytotoxizität kann es vor allem im Rahmen antiviraler Immunantworten zu einer unkontrollierten Aktivierung und Proliferation von zytotoxischen T-Lymphozyten kommen. Daraus resultiert eine überschüssige Zytokinfreisetzung und Makrophagenaktivierung, die zum Bild der hämophagozytischen Lymphohistiozytose führt. Patienten mit CHS erleben häufig mehrere Episoden der HLH, die als akzelerierte Phasen bezeichnet werden (Janka, 2007).

Antibiotika, Antimykotika und Virustatika werden zur Behandlung der Infektionen eingesetzt. Diese können Erreger aber häufig nur eindämmen, jedoch nicht eliminieren. Beim Auftreten einer akzelerierten Phase ist die Gabe von Immunsuppressiva sinnvoll, die diese mildern oder sogar eine temporäre Remission erreichen können. Das erneute Auftreten einer akzelerierten Phase verhindern sie meist nicht. Die bisher einzige kurative Therapie des Chédiak-Higashi Syndroms besteht in einer allogenen Knochenmarkstransplantation (KMT; Haddad *et al.*, 1995). Nach erfolgreicher KMT treten keine schweren Infektionen und Blutungen mehr auf. Die Entwicklung neurologischer Störungen beeinflusst die KMT jedoch nicht (Tardieu *et al.*, 2005).

Das Krankheitsbild des CHS kann anhand seiner unterschiedlichen klinischen Ausprägung in drei Formen unterteilt werden: die *childhood form*, die *adolescent form* und die *adult form*. Die *childhood form* ist mit ca. 85% der Fälle die häufigste Form des CHS. Sie ist durch schwere Infektionen im frühen Kindesalter und eine oder mehrere akzelerierte Phasen charakterisiert. Kinder mit der *childhood form* versterben meist in der ersten Lebensdekade im Rahmen

einer akzelerierten Phase und/oder einer schweren Infektion. Bei Patienten mit der *adult form* des CHS, ca. 10-15% der Fälle, beobachtet man eine deutlich mildere Ausprägung der Erkrankung. Sie entwickeln keine schweren Infektionen in der Kindheit und keine akzelerierte Phase. Die Patienten überleben bis ins Erwachsenenalter. Die Diagnose des CHS wird meist erst nach dem Auftreten ungeklärter progressiver neurologischer Störungen gestellt. Sehr selten sind Patienten mit der *adolescent form* des CHS. Trotz schwerer Infektionen in der Kindheit kommt es bei ihnen nicht zu einer akzelerierten Phase. Die Patienten überleben bis ins Erwachsenenalter. Auch bei ihnen stehen neurologische Störungen im Vordergrund (Karim *et al.*, 2002).

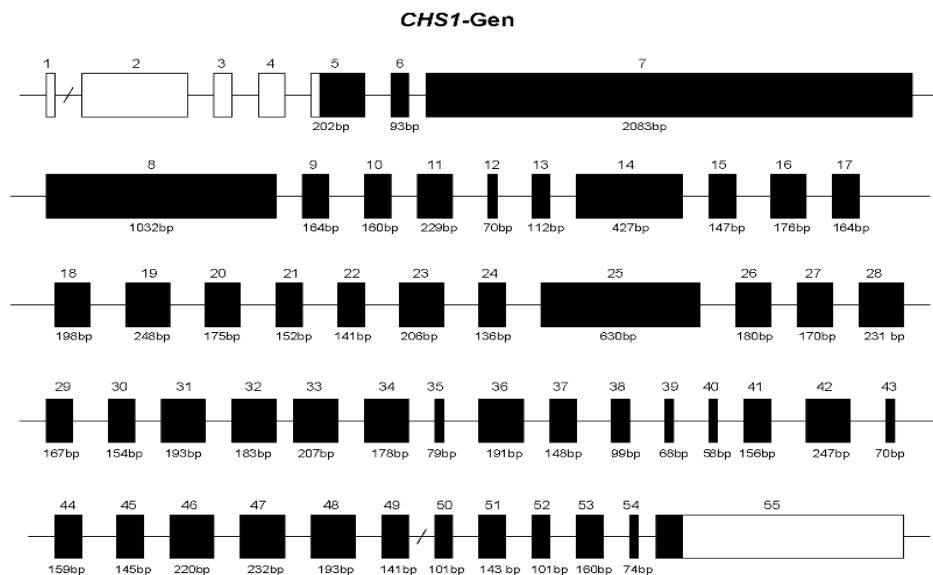
### 1.2.3 Molekularbiologische Grundlagen

Zur Klärung der Ursache des CHS war die Beobachtung von Erkrankungen mit denselben pathophysiologischen und phänotypischen Charakteristika bei Mäusen, Rindern, Ratten, Katzen, Killerwalen und Nerzen wegweisend (Perou *et al.*, 1997). Das am besten untersuchte Tiermodell ist die *beige mouse*. Bei der genetischen Analyse des Genoms dieser Maus konnten Mutationen im sogenannten *Lyst*-Gen (*Lyst=Lysosomal Trafficking Regulator Gene*) auf Chromosom 13 für die Entstehung des charakteristischen Phänotyps verantwortlich gemacht werden. Diese Entdeckung diente als Anlass für die Suche nach dem defekten Gen des Menschen. Das menschliche äquivalente Gen, das *CHS1*-Gen (auch *LYST* genannt), wurde 1996 erstmals beschrieben (Barrat *et al.*, 1996; Barbosa *et al.*, 1996; Barbosa *et al.*, 1997; Nagle *et al.*, 1996; Karim *et al.*, 1997). Es zeigt einen ähnlichen strukturellen Aufbau wie das *Lyst*-Gen. Auch mehrere andere Spezies (unter anderem die Drosophila Fliege und diverse Hefen) zeigen einen Genabschnitt mit ähnlicher Struktur. Es besteht



daher die Annahme, dass das Gen evolutionsbiologisch sehr alt ist (Wang *et al.*, 2000).

Das *CHS1*-Gen ist auf dem langen Arm des Chromosoms 1 lokalisiert (1q42.1-42.2) und besteht aus 51 kodierenden Exons mit insgesamt 11.403 Basenpaaren (siehe **Abb. 1.3**). Das erste kodierende Exon ist Exon 5 (Karim *et al.*, 2002). Die Exons sind von sehr unterschiedlicher Größe. Die beiden größten Exons sind Exon 7 (2082 Basenpaare) und Exon 8 (1032 Basenpaare). Das kleinste Exon ist Exon 40 (58 Basenpaare). Das Gen hat eine sehr AT-reiche Sequenz. Sein Genprodukt ist ein aus 3.801 Aminosäuren bestehendes Protein mit einer Molekularmasse von 429 kDa (Karim *et al.*, 1997).



**Abb. 1.3:** Exon-Intron-Struktur des *CHS1*-Gens (nach Karim *et al.*, 2002). Schwarze Rechtecke = kodierende Exons, weiße Rechtecke = nicht-kodierende Exons, / = lange Intronsequenz zwischen den Exons, bp = Basenpaare.

Seit der Entdeckung des *CHS1*-Gens und seiner Exon-Intron-Struktur wurden Analysen mittels Einzelstrangkonnformationsanalyse (SSCP), *Protein Truncation Test* (PTT) und DNA-Sequenzanalyse zum Nachweis von Mutationen dieses Gens bei Patienten mit CHS durchgeführt.

Bei der SSCP wird die Tatsache ausgenutzt, dass die Konformation einzelsträngiger DNA-Fragmente wesentlich durch die Basensequenz bestimmt wird. Durch Erhitzen und direkt darauf folgende Abkühlung von einzelsträngiger DNA entsteht eine stabile intramolekulare Konformation. Die denaturierte DNA wird anschließend durch eine Polyacrylamidgelelektrophorese (PAGE) aufgetrennt. Die DNA-Einzelstränge verschiedener Konformation zeigen ein unterschiedliches Laufverhalten. Somit lassen sich Sequenzunterschiede aufgrund der Lage der Banden im Vergleich zu einer Referenzprobe erkennen. Häufig führt bereits der Austausch einer Base pro 100 Basen zu einem geänderten DNA-Bandenmuster. Der Nachteil der SSCP besteht darin, dass keine Aussage über die Art der Mutation getroffen werden kann. Zur genaueren Identifikation der Mutation muss immer eine DNA-Sequenzanalyse angeschlossen werden.

Die molekulargenetische Analyse zur Detektion von Mutationen des *CHS1*-Gens mittels SSCP wurde erstmals 1996 durchgeführt (Nagle *et al.*, 1996). Es folgten drei weitere Studien (Barbosa *et al.*, 1997; Karim *et al.*, 1997; Karim *et al.*, 2002). Insgesamt konnten durch die SSCP und die anschließende DNA-Sequenzanalyse bei 32 untersuchten Patienten mit CHS 12 homozygote und 8 heterozygote Mutationen beschrieben werden. Bei 12 Patienten konnte keine Mutation im *CHS1*-Gen gefunden werden.

Der PTT macht sich das veränderte Molekulargewicht von Proteinen zunutze, bei denen eine Mutation zu einem Abbruch der Translation während der

Proteinsynthese geführt hat. Bei diesem Verfahren werden die zu untersuchenden DNA-Fragmente zunächst *in vitro* transkribiert und translatiert. Bei der Translation werden radioaktiv markierte Aminosäuren (z.B. <sup>35</sup>S Methionin) benutzt. Es erfolgt die Auftrennung durch die PAGE. Im Anschluss kann mit Hilfe der Veränderung der Molekulargewichtsverteilung eine Mutation vermutet und durch die DNA-Sequenzierung bestätigt werden. Nachteil des PTT ist, dass nur Mutationen nachzuweisen sind, die zu einem verkürzten Protein führen. Demnach können alle Mutationen, die zu einem *frameshift* führen, und teilweise auch Deletionen detektiert werden.

Der PTT zur Detektion von Mutationen im *CHS1*-Gen wurde 1999 erstmals durchgeführt (Dufourcq-Lagelouse *et al.*, 1999). Man fand bei einem Patienten mit CHS eine homozygote Mutation bei einer maternalen Isodisomie des Chromosoms 1. Im Jahr 2000 wurden mittels PTT und anschließender DNA-Sequenzanalyse in einer Gruppe von 8 Patienten 8 Mutationen beschrieben, von denen 7 homozygot und eine heterozygot waren (Certain *et al.*, 2000).

Zusammenfassend wurde in der Literatur seit 1996 nur bei 21 von 42 Patienten eine relevante Mutation des *CHS1*-Gens beschrieben (siehe **Tabelle 1.2**). Von den 21 detektierten Mutationen waren 17 homozygot. Davon zeigten 10 Patienten eine Deletion oder eine Insertion einer oder mehrerer Aminosäuren, die zu einer Verschiebung des Leserasters (*frameshift*) und zum Abbruch der Proteinsynthese führte. Die übrigen 7 Patienten hatten einen Austausch einer einzelnen Aminosäure, die zu einem sofortigen Abbruch der Proteinsynthese führte. Bei 4 der 21 Patienten ließ sich eine compound-heterozygote Mutation des *CHS1*-Gens als Ursache des CHS nachweisen. Zusätzlich wurden in der Literatur noch 7 Patienten mit heterozygoten Mutationen beschrieben. Der Annahme folgend, dass es sich beim CHS um eine autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung handelt, sollte eine heterozygote Mutation nicht zum Vollbild des

CHS führen. Bei insgesamt 14 Patienten konnte keine Mutation des *CHS1*-Gens gefunden werden. Über Polymorphismen im *CHS1*-Gen wurde in der Literatur nur vereinzelt berichtet (Karim *et al.*, 2002).

Sowohl PTT als auch SSCP haben sich in der Detektion von Mutationen in vielen Genen bewährt. Durch diese beiden Methoden konnte jedoch im *CHS-1* Gen nur bei der Hälfte der Patienten eine relevante Mutation gefunden werden. PTT und SSCP eignen sich demnach nur eingeschränkt zur Detektion von Mutationen im *CHS-1* Gen. Es wurde bislang lediglich eine Studie publiziert, bei der eine komplette DNA-Sequenzanalyse des *CHS1*-Gens durchgeführt wurde und eine *compound* heterozygote Mutation beschrieben wurde (Zarzour *et al.*, 2005). Die DNA-Sequenzanalyse ist SSCP und PTT bezüglich des Auffindens von Sequenzabweichungen inklusive exakter Lokalisation überlegen.

homo-/heterozygot	Exon	Allel 1 (bp)	Allel 2 (bp)	Form des CHS	Konsanguinität
homozygot	Exon 7	1467delG	1467delG	childhood	ja
homozygot	Exon 7	1899insA	1899insA	childhood	ja
homozygot	Exon 8	2620delT	2620delT	childhood	nein, maternale Isodisomie
homozygot	Exon 8	2623delT	2623delT	childhood	nein, maternale Isodisomie
homozygot	Exon 8	3085C>T	3085C>T	childhood	nein
homozygot	Exon 8	3310C>T	3310C>T	adolescent	nicht bekannt
homozygot	Exon 8	3310C>T	3310C>T	childhood	ja
homozygot	Exon 15	4688G>A	4688G>A	adult	ja
homozygot	Exon 23	5996T>A	5996T>A	adult	ja
homozygot	Exon 24	6078C>A	6078C>A	childhood	ja
homozygot	Exon 24	6078C>A	6078C>A	childhood	nein
homozygot	Exon27	7060-7066del7bp	7060-7066del7bp	childhood	ja
homozygot	Exon 29	7555delT	7555delT	childhood	ja
homozygot	Exon 40	9106-9161del56bp	9106-9161del56bp	childhood	ja
homozygot	Exon 43	9590delA	9590delA	childhood	ja
homozygot	Exon 43	9591delA	9591delA	childhood	ja
homozygot	Exon 48	10395delA	10395delA	childhood	ja
compound heterozygot	Exon 7/45	1540C>T	9893delT	childhood	nicht bekannt
compound heterozygot	Exon 14/34	4274del T	8428G>A	adolescent	nein
compound heterozygot	Exon 18/14	5061T>A	4361C>A	adolescent	nein
compound heterozygot	Exon 19/41	5317delA	9228ins10bp	childhood	nein, CHS in Familie +
heterozygot	Exon 5	118insG	/	childhood	nicht bekannt
heterozygot	Exon 5	148C>T	/	adult	nicht bekannt
heterozygot	Exon 8	2454delA	/	childhood	nein
heterozygot	Exon 8	3073+3074delA	/	childhood	nein
heterozygot	Exon 9	3434-3435insA	/	childhood	nein
heterozygot	Exon 13	4052C>G	/	childhood	nein
heterozygot	Exon 35	8583G>A	/	adult	nein

**Tabelle 1.2:** Bekannte Mutationen im *CHS1*-Gen (Barbosa *et al.*, 1996/1997; Certain *et al.*, 2000; Dufourcq-Lagelouse *et al.*, 1999 ; Karim *et al.*, 1997; Karim *et al.*, 2002; Nagle *et al.*, 1996; Zarzour *et al.*, 2005).

### 1.3 Fragestellung

Das Chédiak-Higashi Syndrom ist eine sehr seltene Multisystemerkrankung. Aufgrund der geringen Prävalenz konnten seit 1996 nur 42 Patienten mit CHS auf Mutationen im *CHS1*-Gen untersucht werden. Bei der Hälfte dieser Patienten (21 von 42 Patienten) konnte jedoch keine Mutation im *CHS1*-Gen gefunden werden, die ursächlich für das Krankheitsbild des CHS sein kann. Diese Auffälligkeit lässt zwei Hypothesen zu. Zum einen besteht die Möglichkeit, dass durch die Ungenauigkeit der bisher angewandten *Screening*- und Analysemethoden die dem CHS zugrundeliegenden Mutationen im *CHS1*-Gen nicht detektiert werden konnten. Zum anderen findet sich in zwei Veröffentlichungen (Karim *et al.*, 2002; Zazour *et al.*, 2005) eine weitere Hypothese. So wird vermutet, dass bei Patienten mit CHS, bei denen keine Mutation im *CHS1*-Gen nachzuweisen ist, eine Mutation in einem oder mehreren anderen bisher unbekanntenen Genen verantwortlich für das Krankheitsbild des CHS sein könnte. Um dieser Annahme nachzugehen, sollte in dieser Arbeit das komplette *CHS1*-Gen von vier Patienten mit CHS einer DNA-Sequenzanalyse unterzogen werden. Hierbei sollte untersucht werden, ob sich bei allen vier Patienten eine Mutation im *CHS1*-Gen nachweisen lässt und welche Art der Mutation vorliegt.

In der Literatur sind wenige klinische Fälle des CHS beschrieben. Neben der genetischen Analyse sollte auch die Krankengeschichte der vier Kinder dargestellt werden, um einen eventuellen Zusammenhang zwischen Mutation und Ausprägung des klinischen Krankheitsbildes aufzuzeigen. Karim *et al.* (Karim *et al.*, 2002) beobachteten eine Häufung von *missense* Mutationen im *CHS1*-Gen bei Patienten mit einer mildereren Ausprägung des CHS. Diese waren meist mit *nonsense* Mutationen kombiniert und in einer Kontrollgruppe nicht

aufzufinden, demnach also nicht als Polymorphismen zu werten. Solche missense Mutationen wurden bei Patienten mit der *childhood form* nicht gefunden. So wurde die Hypothese aufgestellt, dass mildere Phänotypen des CHS mit einer Kombination von missense Mutationen des CHS1-Gens einherzugehen scheinen, sodass ein verkürztes oder unvollständiges Protein entsteht. Die schwere *childhood form* hingegen wäre mit *nonsense* Mutationen und damit einem kompletten Abbruch der Proteinsynthese assoziiert. Es sollte in dieser Arbeit anhand der Krankengeschichten und der Genetik der 4 Patienten geprüft werden, ob eine solche Korrelation ebenfalls nachweisbar ist.

Anhand der klinischen Beschreibung sollte auch die von Certain *et al.* (Certain *et al.*, 2000) geäußerte Vermutung, dass der Kontakt zum Epstein-Barr-Virus (EBV) oder zum Zytomegalievirus (CMV) eine akzelerierte Phase auslösen kann, bei unseren Patienten geprüft werden.

## **2. Patienten, Material und Methoden**

### **2.1 Patienten und DNA**

Es wurden vier Patienten mit dem Chédiak-Higashi Syndrom auf Mutationen im *CHS1*-Gen untersucht. Die DNA von zwei Patienten entstammte der Klinik für pädiatrische Hämatologie und Onkologie des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die DNA der beiden anderen Patienten wurde vom Universitätsklinikum Ulm zur Verfügung gestellt. Die verwendete genomische DNA wurde aus EDTA-Blut gewonnen.

Die Eltern der Patienten stammen aus Afghanistan, Saudi-Arabien, der Türkei und Deutschland. Die Familien der Patienten stehen in keinem verwandtschaftlichen Verhältnis zueinander. Die Schwester eines Patienten verstarb an CHS. Die Eltern und Geschwister der übrigen Patienten sind klinisch unauffällig. Alle vier Patienten haben konsanguine Eltern.

Die Krankengeschichte von Patient 1 wurde bereits in der Fachliteratur publiziert (Ganschow *et al.*, 2002).



## 2.2 Material

### 2.2.1 Geräte

DNASIS (Software):	Hitachi, Japan
DNA-Sequenzierer Abi Prism 310:	Applied Biosystems, Foster City, USA
Gelelektrophoresekammer:	BIORAD, Hercules, USA
Mikrowelle:	Günther Wilke OHG, Hamburg
T-Gradient (PCR):	Biometra, Göttingen
UV-Imager:	Appligene, Illkürch Graffenstaden
UV-Transilluminator ECX-20-M:	Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen
Waage:	Scaltec Instruments GmbH, Göttingen
Vortex Certomat MV:	B. Braun Biotech Int. GmbH, Melsungen
Zentrifugen:	Hettlich Zentrifugen, Tuttlingen

### 2.2.2 Chemikalien

<i>Aqua ad iniectabilia:</i>	Braun, Melsungen
<i>Big-Dye Terminator Cycle Sequencing Kit:</i>	Perkin-Elmer Rodgan, Jügesheim
Bromphenolblau:	Serva, Hildesheim
DNTPs für PCR:	Roche, Mannheim
<i>DNA Molecular weight marker VIII:</i>	Roche Diagnostics GmbH
Ethidium-Bromid:	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Gibco BRL Agarose-1000 ultra-pur:	Invitrogen, Karlsruhe
Platinum Taq DNA Polymerase:	Invitrogen, Alameda, USA
<i>Primer:</i>	Metabion, Martiusried
1xTAE-Puffer ( <i>modified TAE buffer</i> ):	Millipore, Bedford, USA
Ultrafree-DA ( <i>DNA-Extraction from Agarose Gel</i> )	Millipore, Bedford, USA

### 2.2.3 Oligonukleotide (*Primer*)

Die genetische Sequenz des *CHS-1*-Gens ist seit seiner Entdeckung 1996 bekannt. In der Literatur werden jedoch verschiedene Nomenklaturen zur Nummerierung der Exons dieses Gens verwendet. Die Nomenklatur in dieser Arbeit wurde von Karim *et al.* (Karim *et al.*, 2002) übernommen.

Aus der Literatur waren keine Oligonukleotidsequenzen (*Primer*) für das *CHS-1* Gen zu entnehmen. Das Design der Vorwärts- und Rückwärts-*Primer* erfolgte manuell, eine Länge von 19-26 Nukleotiden wurde gewählt. Das *CHS1*-Gen besitzt eine sehr AT-reiche Sequenz. Es wurde trotzdem versucht einen GC-Gehalt der *Primer* von etwa 50% zu erreichen und ein Guanin oder Cytosin am 3'-Ende der Oligonukleotidsequenz gewählt. Die *Primer* wurden nach Empfehlungen des Herstellers in destilliertem Wasser gelöst. Einige Exons benötigten zusätzliche interne *Primer*, andere Exons konnten mit einem gemeinsamen *Primer* amplifiziert werden (siehe **Tabelle 2.1**). Die *Primer* wurden für eine *Annealing*-Temperatur von 56-60°C konzipiert. Die Temperaturen zur Amplifikation der einzelnen Exons wurden experimentell angepasst, um eine Optimierung des Ergebnisses der Polymerasekettenreaktion (PCR) zu erreichen. Die anschließende Sequenzierung wurde sowohl mit dem jeweiligen Vorwärts- als auch mit dem Rückwärts-*Primer* durchgeführt.

Tabelle 2.1.: Oligonukleotidsequenz der verwendeten Vorwärts- und Rückwärts-Primer. Der jeweils hervorgehobene Primer zeigte ein besseres Produkt bei der Sequenzierung.

Exon	Primer	Oligonukleotidsequenz 5'-3' (Vorwärts-Primer)	Oligonukleotidsequenz 5'-3' (Rückwärts-Primer)
E1-E4		nicht analysiert	
E5	CHS_ex5	5'-AGC ACC TGA CTA GGT CAG AAC TAT GC-3'	<b>5'-AAGACT GGA CTT TAT CTC AAG GAG GC-3'</b>
E6	CHS_ex6	<b>5'-TCA CAG CTT TAA CTG GAT TGA AGA TAG-3'</b>	5'-TCA CAA TAA CAT ATA GTG TTC TGA ATC-3'
E7	CHS_ex7-1	<b>5'-AGT GTG AGA GGA GGT AAC CCA GAG-3'</b>	5'-TAC ACT GGC TGC TAA AGG AGA ATT ATG-3'
	CHS_ex7-2	<b>5'-AGA GAT GCA AGA AAG ACA CAG CTC-3'</b>	
	CHS_ex7-3	<b>5'-AGC CAG CTG CCT TGT CTG TTA TCA G-3'</b>	5'-TGT AGT AAG CGC AAG CAC TGA TGG GC-3'
	CHS_ex7-4	<b>5'-ACC GAA GAA CCG GTG GCT TTG-3'</b>	
	CHS_ex7-5	<b>5'-TGC AGG AGG TTC AGG AAG ATT TTG TG-3'</b>	
	CHS_ex7-6	<b>5'-TCC CGA GGC CTC AGA GCA TTT G-3'</b>	
	CHS_ex7-7	<b>5'-TGC ATC ATC ACC GAG ATC TCT CAG G-3'</b>	5'-ATC ACT CAC TTG AAA GCA TCC AAT G-3'
	CHS_ex7-8	<b>5'-TGG AAT ATG CTG TTG TAT GGA TCC C-3'</b>	
	CHS_ex7-9	<b>5'-AAC TTA TGT GAT GCT GAA CTC TCC-3'</b>	
E8	CHS_ex8-1	<b>5'-TGG TTA GTA TAT CCC ACA TGC AAT AG-3'</b>	5'-ACA TGT AGA TCC AAC GAC ACA TAG AC-3'
	CHS_ex8-2	<b>5'-AGA TTC TCC TCA GAG TCT CAG C-3'</b>	
	CHS_ex8-3	<b>5'-AGT CAT ATG CTG CCA TGT ATA TCT CTC-3'</b>	5'-TGG GCA GGG CAG CCA ACA GTA TCA C-3'
	CHS_ex8-4	<b>5'-TCT CAA CCT AAG AGA ACT ATG AAG G-3'</b>	
E9	CHS_ex9	<b>5'-TGC TTT GAC TTC TTC GCT TAG CTT C-3'</b>	5'-ATA AGA TCC ACT GAA CTC ATC TGA C-3'
E10	CHS_ex10	<b>5'-TTA AGT TGT CTG AAA GGA TCT GGG-3'</b>	5'-TGC ATA TAT GAA TGC CAG ACT GTT GG-3'
E11	CHS_ex11	<b>5'-AGG TTT TGT AAG CAT CCT CTG AAT TAC-3'</b>	5'-AGA TGT TAT TGG GTG ATG AGT CTG-3'
E12	CHS_ex12	<b>5'-ACA TGC TCG CTG TTT TGA AAA ATC AAT-3'</b>	5'-AGT GCT AAG ATC ACA GGC ATG AGC C-3'
E13	CHS_ex13	<b>5'-GAG ATC ATG CCA TTG CAC TCC AG-3'</b>	5'-AAA ATA TAA TCT CAG CGA TAT GTC TGG-3'
E14	CHS_ex14-1	<b>5'-AAT AGG AAT GCT GAT ATG TGT GGG-3'</b>	5'-ACT ACC ACA TTT TTA CGG CTC AAG G-3'
	CHS_ex14-2	<b>5'-ATC GGC TGC TTT CAT CTT GGC AC-3'</b>	
E15	CHS_ex15	<b>5'-AAC AGG TCA GGC TCA GAC ATT CTG-3'</b>	5'-ATT ATC TAT TCA TGG GAG GCT GAG G-3'
E16	CHS_ex16	<b>5'-ACG AAG ACC TAC TGA CTT TTC AAG C-3'</b>	5'-TGC ACA TTG TGC ACA TGT ACC CTA G-3'
E17	CHS_ex17	<b>5'-TCA TAC TTT AAA AAT ACT TAG TAC TAG AC-3'</b>	5'-AAA CAC AAG TAA AGG AAC ATA GAT GG-3'
E18	CHS_ex18-1	<b>5'-TCA TCT TCC ATC ATA GTT GAC ATA GG-3'</b>	5'-AGC CTG GGT GAC AGA GTG AAA TC-3'
	CHS_ex18-2	<b>5'-ATG CTT GTG GAC CCA ACC ATA C-3'</b>	
E19	CHS_ex19	<b>5'-AGG ATC AGT TGA GTG TGT TTT CAC-3'</b>	5'-ACC TTA ATC ATC TAT GGC AGA AAG C-3'
E20	CHS_ex20	5'-AGC CTT ACA TAG GTA GAG TAT GAG C-3'	<b>5'-TGA CGA GAT GAG TAT CAC TGC ATA TG-3'</b>
E21	CHS_ex21	<b>5'-AGC TTA ATG TTT CTG TTG AAC TTC CTG-3'</b>	5'-TGG ACA ACA CTG TAA ATG CAC TTA ATG C-3'
E22	CHS_ex22	<b>5'-ATT GTT GCG CGT TGT GTG TCT TCC-3'</b>	5'-ATC AAG CTG TAA GAT GCA GCA GTT G-3'
E23	CHS_ex23	<b>5'-ATG GTA AGT ATG ATC AGA CTA GAG TAG-3'</b>	5'-ATA TGT AAT TAG AGC AGC ACA GAG GC-3'
E24	CHS_ex24	<b>5'-AGA GTA AGT ATT CAC ATA TCG TGT GC-3'</b>	5'-AGA ACA AGA TAG CAT GAG CCT CAT CC-3'

E25	CHS_ex25-1	<b>5'-TAG ATA AAT GGG CTT TTG CTG TGG-3'</b>	
	CHS_ex25-2	<b>5'-ATT CTT TGG GGA GTT CCG ACA C-3'</b>	
	CHS_ex25-3	<b>5'-AGG TCA GAA GAT GAC AGT CCT G-3'</b>	
E26	CHS_ex26	<b>5'-TGC TAC TAC TTG TCA CAG TTC CTA AG-3'</b>	5'-AGG GGG ACT TAA AGC TGG ATG ATG-3'
E27	CHS_ex27	5'-AGC TTT CTG TGT TCT TCT GTA CAT ATG-3'	<b>5'-TTG AGG CAG GAG AAT CGC TTG AAC-3'</b>
E28	CHS_ex28	<b>5'-AGC AAG ATG ACC CAT AGT TGC TAT C-3'</b>	5'-TTC AGA GGT ACA CAG AAA GGC TTC-3'
E29	CHS_ex29	<b>5'-TGA CTG CAT GAA TGA GTG CAA GCT G-3'</b>	5'-AGT TTC TAA GAA GAA AGA GAT TGT GCT C-3'
E30	CHS_ex30	<b>5'-AAT GTC TAC TAC CAT CAT CCC CAT G-3'</b>	5'-AGT GTG AAT GGC ATA AGA ACA TAG G-3'
E31	CHS_ex31	5'-AGT ACT GTT GCA CTT CTT CAA AGA G-3'	<b>5'-ACC AGT TTC CTC TTA GAT TAC TTC TC-3'</b>
E32	CHS_ex32-1	<b>5'-TGC AGT TTA ACT TAC CTT CAT TAG TCC-3'</b>	5'-AAG CAA TGC TTC ATG AGT TGA GTC-3'
	CHS_ex32-2	<b>5'-AAG ACC TCA GTT TTC CAG ACC G-3'</b>	
E33	CHS_ex33	<b>5'-AGT GAT GCT GCT ATG AAT GTT GTA TG-3'</b>	5'-AAA GCA CCT GAG AAA GAC CTT AGG-3'
E34	CHS_ex34	<b>5'-TCA GAT TTC TGT ACT TAT CCT CAG AAT G-3'</b>	5'-TCA AGT TCA TCA TCA ATG ATA GCC TG-3'
E35/36	CHS_35/36-1	<b>5'-ATA TTC TGG TCT CCT AGG GAC AAT TG-3'</b>	5'-TTA CTA TCT AGA TGA GCT ACT GCC C-3'
E35/36	CHS_35/36-2	<b>5'-AAT ACG TTC CAT GTA TGC TTA AC-3'</b>	"
E37	CHS_37/38	<b>5'-ACA GAT CAG TTG TGA CTT ACT TAC TC-3'</b>	5'-ACA AGG GCC AGA ACA TGA TGA CTG-3'
E38		"	"
E39	CHS_ex39	<b>5'-AAC TCT ATC TAG TCT GCT TTG CAG-3'</b>	5'-TGC TAT TCA TGT GCT TTT CAG AAC AC-3'
E40	CHS_ex40	<b>5'-AAC TGT GTC GAG GTA GTG AGA TTC-3'</b>	5'-TCA GAC CAA TCT ATA CAT AGA GTG AC-3'
E41	CHS_ex41	<b>5'-TCA GGT AAT CTT ATC TGC CAT CTG C-3'</b>	5'-TCA GTA TGA GTA TAG TTA CAG TGG C-3'
E42	CHS_ex42	<b>5'-TGG ACT TGA ATC TCA GTT CTC TAC-3'</b>	5'-ATG GAT GAA CCC TAA AGG TGA TG-3'
E43	CHS_ex43	<b>5'-ACC TAC TTA CAA GAT GCA GAC ATC-3'</b>	5'-TCT AGT TGT CTG TCA ATC CTA GTA C-3'
E44	CHS_ex44	<b>5'-AGA CAC TCA AGG AGG CTG AAG TC-3'</b>	5'-TGA GAC ATT AGC AAG ATG ATT TGG C-3'
E45	CHS_ex45	5'-TAT GTG CAA GGT GTG GGT GAT ATC-3'	<b>5'-TGG AAA ATT ACA AAA TAA CCA CAA GCC C-3'</b>
E46	CHS_ex46	<b>5'-AGG TAC ATA AGT AGA TGA GCA GTG G-3'</b>	5'-TAG GTG ACA GTT TAA TGC TAC TAC C-3'
E47	CHS_ex47	<b>5'-TAC TTC TGA TCT CAG TGA GAC CAT G-3'</b>	5'-TAG GCC AGG ACC ATG CTA TTC ATC-3'
E48	CHS_ex48	<b>5'-TTC TAT ACG CTA AGC ATG GGG AAG-3'</b>	5'-AAG TAG CAG CAC AGA TGA GCT AG-3'
E49	CHS_ex49	<b>5'-ATG TTC TGC TAT GTA AAC TTC ACC C-3'</b>	5'-TGA AAT CCC GTC TCT ACT AAA AGA ATA C-3'
E50	CHS_ex50	5'-ACA GGC ACG TAT AGA CAT AGA CTA TG-3'	<b>5'-AGA CCT AAT GTA GGG AGA AGA TTA AG-3'</b>
E51	CHS_ex51	<b>5'-TGA GAA GAC CAT TTG AGT CAC TTT G-3'</b>	5'-ACT ACC TTT AAG CAT GTG TTT CAT GG-3'
E52	CHS_ex52	<b>5'-ACA ATA GGT ACA TAG ACT GAG AAG AAG-3'</b>	5'-AAG TAT TTA GAT CTG GCA GGG ACC-3'
E53	CHS_ex53	<b>5'-ACA AAT GAG CTT GCC CTT CAG GG-3'</b>	5'-TTT CTG AAA CTC CTC TGT CCT TAT G-3'
E54	CHS_ex54	<b>5'-TCC CTA GAG GGA ACT ACT GTT AAT TG-3'</b>	5'AAG TCT GTG TGC TTA AAT ACC TCT C-3'

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist ein molekularbiologisches Verfahren, das es ermöglicht, definierte DNA-Abschnitte *in vitro* zu amplifizieren. So ist eine selektive Vermehrung vorbestimmter DNA-Sequenzen möglich, indem spezifische Oligonukleotide (*Primer*) eingesetzt werden, die diese flankieren (Mullis *et al.*, 1987).

Die PCR besteht aus drei Einzelreaktionen, die zyklisch durchlaufen werden.

1. Hitzedenaturierung: Die zu amplifizierende DNA wird bei 95°C denaturiert und die DNA-Einzelstränge so von einander getrennt.
2. *Annealing*: Die *Primer* lagern sich bei 56-60°C den beiden Einzelsträngen an.
3. Elongation: Die neuen DNA-Stränge werden bei 72°C durch die Taq-Polymerase synthetisiert. Die Primer bilden den Ausgangspunkt für die Synthese, der DNA-Einzelstrang dient als Matrize für die revers-komplementäre Anlagerung der Desoxynukleotid-Triphosphate.

Die PCR erfolgte mit dem Reaktionsansatz aus **Tabelle 2.2**, gemäß des Protokolls der **Tabelle 2.3**.

Tabelle 2.2: PCR-Reaktionsansatz

40µl destilliertes Wasser
5µl 10xPCR-Puffer
2µl Magnesiumchlorid (15mM)
1µl dNTP-Lösung (10 mM)
2µl Primer (vor- und rückwärts, 10pmol/µl)
1µl DNA (100 ng/µl)
0,1µl Taq-Polymerase (5units/µl)

Tabelle 2.3: PCR-Protokoll (T-Gradient, Biometra)

<b>Phase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten
2. 37 Zyklen mit je		
-Denaturierung	95°C	30 Sekunden
- <i>Annealing</i>	56°/60°C	30 Sekunden
-Elongation	72°C	2 Minuten

### 2.3.2 Agarosegelelektrophorese

Die Agarosegelelektrophorese dient der Auftrennung und Darstellung von DNA-Fragmenten. Aufgrund ihrer negativen Ladung nähern sich DNA-Fragmente in einem elektrischen Feld der Kathode an. Die Laufstrecke eines Fragmentes im Gel ist dabei abhängig von seiner Größe, kleine Fragmente wandern schneller im elektrischen Feld als große. Zur Herstellung eines 1,75%igen Agarosegels wurden Agarose, 1-fach konzentrierter Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) und Ethidiumbromid unter Rühren erhitzt (siehe **Tabelle 2.4**). Im Anschluss wurde das Gel zum Erkalten in eine Trägerplatte mit Kamm (zur Bildung der Taschen) gegossen. Nach Polymerisation des Gels wurden die Käme entfernt

und das Gel in die mit TAE-Puffer gefüllte Elektrophoresekammer eingelegt. Die PCR-Produkte wurden zur Beurteilung der Lauffront mit Bromphenolblau angefärbt und in die Taschen des Agarosegels pipettiert. Zur Größenorientierung wurde zudem ein DNA-Marker aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 100-250V mit einer Laufzeit von ca. 30-60 Minuten. Da Ethidiumbromid in die DNA interkaliert und in ultraviolettem Licht (UV) rot fluoresziert, konnten die DNA-Fragmente unter UV-Licht abgebildet werden. Die Produkte wurden unter Durchleuchtung auf einem UV-Tisch ausgeschnitten und anschließend durch Zentrifugation für 10 Minuten mit 5000 UPM bei 23°C vom Agarosegel getrennt. Das aufgereinigte Produkt wurde zur Sequenzierung eingesetzt.

Tabelle 2.4: Agarosegel-Ansatz

---

3,5 mg Agarose
200ml destilliertes Wasser
20µl Ethidium-Bromid (10mg/ml, 1%)

---

### 2.3.3 DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der DNA-Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger *et al.*, 1977). Die zyklische Sequenzierreaktion besteht aus der Denaturierung der DNA zu Einzelsträngen, dem *Annealing* mit Anlagerung des *Primers* und der Elongation mit Entstehung eines zum Einzelstrang komplementären DNA-Stranges durch die Polymerase. Es werden während der Elongation jedoch neben den 2'-Desoxyribonukleotiden (dNTP) auch fluoreszenzmarkierte 2'3'-Dideoxyribonukleotide (ddNTP) in den sich bildenden komplementären DNA-Strang eingesetzt. Den ddNTP fehlt im Vergleich zu den dNTP am 3'-Kohlenstoff eine Hydroxylgruppe. Das Fehlen der

3'-OH-Gruppe führt dazu, dass keine Phosphodiesterbindung des ddNTP zum nächsten Nukleotid ausgebildet werden kann und führt damit zu einem Abbruch der Amplifizierungsreaktion. Da die ddNTP einen zufälligen Syntheseabbruch verursachen, entstehen DNA-Stränge unterschiedlicher Länge, bei denen jeweils die letzte Base nach Anregung fluoresziert. Die vier ddNTP (A/T/G/C) sind dabei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert, die ihre Fluoreszenzmaxima bei verschiedenen Wellenlängen haben.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Sequenzierung mit Hilfe des ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kits, gemäß **Tabelle 2.5** durchgeführt. Die Sequenzierreaktion erfolgte im *Thermocycler* nach dem Sequenzierungsprotokoll der **Tabelle 2.6**. Sowohl Vorwärts- als auch Rückwärts-*Primer* wurden verwendet, die *Annealing*-Temperatur betrug 57-60°C. Anschließend wurden die Produkte mit dem Dye Ex 96 Kit nach den Protokollbedingungen aufgereinigt. Für die Darstellung der fluoreszenzmarkierten DNA-Fragmente wurde der ABI Prism 3100 Genetic Analyzer von Applied Biosystems verwendet, ein Kapillarsequenziergerät. Die DNA-Fragmente laufen entsprechend ihrer Größe über eine Gelmatrix in einer Kapillare. In der Kapillare ist ein Laser auf eine Stelle des Gels fokussiert. Wenn die markierten DNA-Fragmente den Laser passieren, werden die Farbstoffe zur Fluoreszenz angeregt. Da die ddNTP unterschiedliche Fluoreszenzfarbstoffe und damit verschiedene Wellenlängen aufweisen, kann im angeschlossenen Computer eine Basensequenz erstellt werden, die in Form eines Chromatogramms dargestellt wird.

Die ermittelte Basensequenz konnte anschließend mit Hilfe des Computerprogramms DNASIS und per Hand mit der Wildtypsequenz verglichen werden.



Tabelle 2.5: Sequenzierungsansatz

1µl <i>ABI Prism Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit</i>
3µl 5x Sequenzierpuffer
2µl Primer (Vorwärts- oder Rückwärts-, 10pmol/µl)
4µl PCR-Produkt
10µl destilliertes Wasser

Tabelle 2.6: Sequenzierungsprotokoll (T-Gradient, Biometra)

<b>Phase</b>	<b>Temperatur</b>	<b>Zeit</b>
1. Initiale Denaturierung	95°C	5 Minuten
2. 50 Zyklen mit je		
1. Denaturierung	95°C	30 Sekunden
2. <i>Annealing</i>	57°/60°C	30 Sekunden
3. Elongation	60°C	4 Minuten

Die **Tabelle 2.7** zeigt eine Zusammenfassung der optimalen Temperaturen für das *Annealing* der Primer bei PCR und Sequenzierung. Diese wurden experimentell ermittelt. Zusätzlich sind die optimalen Magnesiumchloridkonzentration des PCR-Ansatzes aufgeführt.

<i>Primer</i>	PCR-Temperatur	Magnesiumchlorid-Konzentration	Sequenzierungstemperatur
5R	56°C	3,0 mMol	60°C
6F	60°C	3,0 mMol	57°C
7-1F	56°C	3,0 mMol	60°C
7-2F	56°C	3,0 mMol	57°C
7-3F	56°C	3,0 mMol	60°C
7-4F	56°C	3,0 mMol	57°C
7-5F	56°C	3,0 mMol	60°C
7-6F	56°C	3,0 mMol	60°C
7-7F	60°C	1,5 mMol	60°C
7-8F	60°C	1,5 mMol	57°C
7-9F	60°C	1,5 mMol	57°C
8-1F	60°C	1,5 mMol	57°C
8-2F	60°C	1,5 mMol	57°C
8-3F	56°C	3,0 mMol	57°C
8-4F	56°C	3,0 mMol	57°C
9R	60°C	3,0 mMol	57°C
10F	60°C	1,5 mMol	57°C
11F	56°C	3,0 mMol	57°C
12F	60°C	1,5 mMol	57°C
13F	60°C	3,0 mMol	60°C
14-1F	56°C	3,0 mMol	57°C
14-2F	56°C	3,0 mMol	60°C
15F	60°C	1,5 mMol	60°C
16F	56°C	3,0 mMol	57°C
17F	56°C	3,0 mMol	57°C
18-1F	60°C	1,5 mMol	57°C
18-2F	60°C	1,5 mMol	57°C
19F	56°C	3,0 mMol	57°C
20R	56°C	3,0 mMol	57°C
21F	60°C	1,5 mMol	57°C
22F	56°C	3,0 mMol	60°C
23F	60°C	1,5 mMol	57°C
24F	56°C	3,0 mMol	57°C
25-1F	60°C	1,5 mMol	57°C
25-2F	60°C	1,5 mMol	57°C
25-3F	60°C	1,5 mMol	57°C
26F	56°C	3,0 mMol	57°C
27F	60°C	1,5 mMol	57°C
28F	56°C	3,0 mMol	57°C
29F	60°C	1,5 mMol	60°C
30F	56°C	3,0 mMol	57°C
31R	56°C	3,0 mMol	57°C
32-1F	56°C	3,0 mMol	57°C
32-2F	56°C	3,0 mMol	57°C
33F	56°C	3,0 mMol	57°C
34F	56°C	3,0 mMol	57°C
35/36-1F	60°C	3,0 mMol	57°C
35/36-2F	60°C	3,0 mMol	57°C
37/38F	56°C	3,0 mMol	57°C
39F	56°C	3,0 mMol	57°C
40F	60°C	1,5 mMol	57°C
41F	56°C	3,0 mMol	57°C
42F	56°C	3,0 mMol	57°C
43F	60°C	3,0 mMol	57°C
44F	56°C	3,0 mMol	60°C
45R	60°C	1,5 mMol	57°C
46F	60°C	1,5 mMol	57°C
47F	60°C	1,5 mMol	57°C
48F	56°C	3,0 mMol	57°C
49F	56°C	3,0 mMol	57°C
50R	56°C	3,0 mMol	57°C
51F	56°C	3,0 mMol	57°C
52F	56°C	3,0 mMol	57°C
53F	56°C	3,0 mMol	60°C
54F	56°C	3,0 mMol	57°C

Tabelle 2.7:  
 Temperaturoptima und optimale Magnesiumchloridkonzentration der *Primer* bei der PCR.  
 Temperaturoptima der *Primer* bei der Sequenzierung.  
 (F = *Forward Primer*, R = *Reverse Primer*)

### 3. Ergebnisse

#### 3.1. Krankengeschichten der 4 Patienten

##### 3.1.1 Patient 1

Patient 1 ist das dritte Kind deutscher konsanguiner Eltern. Seine Eltern und seine zwei leiblichen Geschwister, sowie sein Halbbruder, sind gesund. Nach einer unauffälligen Schwangerschaft wurde die Geburt des Jungen in der 34. Schwangerschaftswoche aufgrund von supraventrikulären Tachykardien eingeleitet. Postnatal zeigte der Junge keine Herzrhythmusstörung oder Tachykardie, das Elektrokardiogramm (EKG) und eine Echokardiographie waren altersentsprechend. Bei der stationären Beobachtung fielen eine blasse Haut, weißblonde Haare und hellblaue Augen auf. Bei einer augenärztlichen Vorstellung wurden ein Astigmatismus, eine Anisometropie, ein Mikrostrabismus, ein Fundus albinoticus und eine beginnende Katarakt bei hochgradiger Myopie diagnostiziert.

Im Alter von vier Monaten entwickelte der Junge im Anschluss an die erste Impfung gegen Diphtherie, Polio, Tetanus und Haemophilus influenzae Fieber und eine ventrikuläre Tachykardie mit Übergang in einen kardiogenen Schock. Nach initialer Kardioversion und kurzfristiger Intubation erholte der Junge sich jedoch schnell und konnte nach 3 Wochen entlassen werden. Bei anschließenden Echokardiographie- und EKG-Kontrollen zeigten sich ein atrioventrikulärer Block I°, eine rechtsventrikuläre Hypertrophie mit inkomplettem Rechtsschenkelblock und ein Vorhofseptumaneurysma.

In den folgenden Jahren hatte der Junge rezidivierende Mittelohrentzündungen, Atemwegsinfekte, orale Candidainfektionen, Panaritien und Hauteiterungen, die meist ohne Fieber verliefen und schlecht auf Antibiotika ansprachen.

Im Alter von 4,9 Jahren erkrankte das Kind an einer Lobärpneumonie mit Lungenabszess, verursacht durch Staphylokokkus aureus. Unter Breitbandantibiotikatherapie besserte sich sein Zustand nicht, so dass eine Lobektomie zur Sanierung des Lungenabszesses nötig war. Aufgrund des ungewöhnlichen Krankheitsverlaufes wurden ein Blut- und Knochenmarksausstrich durchgeführt. Im Blutausstrich zeigten die Leukozytenreihen mikroskopisch die für das CHS pathognomonischen atypischen großen Granula.

Bei weiterer Diagnostik ergab die Granulozytenfunktionsdiagnostik eine leichte Verminderung der Chemotaxisfunktion sowie einen prozentual kleineren Anteil reaktiver Zellen nach Stimulation. Die Funktion der natürlichen Killerzellen war normal. Die Lymphozytenpopulationsanalyse zeigte eine normale Verteilung. Die Serumimmunglobulinanalyse war unauffällig. Die Thrombozytenfunktion war bei dem Jungen normal, die partielle Thromboplastinzeit (pTT) jedoch verlängert. Die EBV- und die CMV-Serologie des Jungen sprachen für abgelaufene Infektionen. Im Elektroenzephalogramm (EEG) war eine generalisierte Verlangsamung der Grundaktivität zu verzeichnen.

Unter einer Prophylaxe mit Trimethoprim, Sulfamethoxazol und Nystatin hatte der Junge bis heute keine weiteren schweren Infektionen und zeigte keine Anzeichen einer akzelerierten Phase. Bei einer Infektion wird der Junge sofort antibiotisch behandelt, um eine Progredienz der Infektion frühzeitig zu verhindern. Sowohl der Vater als auch zwei Geschwister des Jungen sind potentielle histokompatible Knochenmarkspender. Aufgrund des guten

Gesundheitszustandes des Jungen wird eine KMT jedoch bislang ausgesetzt. Der Patient ist derzeit 17 Jahre alt. Er zeigt eine Neigung zu Hämatomen und zu Unterschenkelödemen, außerdem ist er zunehmend adipös. Der Junge hat eine globale Entwicklungsverzögerung und eine verminderte Konzentrationsfähigkeit. Er besucht eine Integrationsklasse.

### 3.1.2 Patient 2

Patient 2 ist das erste Kind saudi-arabischer konsanguiner Eltern. Der Junge kam als hypotrophes Neugeborenes termingerecht nach einer unauffälligen Schwangerschaft zur Welt. Aufgrund eines Ikterus gravis erhielt er in den ersten Lebensstagen eine Phototherapie. Es fielen zu diesem Zeitpunkt bereits ein dunkelgrau-silbriges Haupthaar und ein blasses Hautkolorit auf.

Im Alter von 12 Monaten wurde er mit hohem Fieber, ubiquitärer Lymphknotenschwellung, multiplen Aphten an Gingiva und Zunge, einer leichten Hepatosplenomegalie und einer Panzytopenie zum ersten Mal stationär aufgenommen. Unter Antibiotikatherapie besserte sich sein Zustand schnell.

Im Alter von 2 Jahren traten bei dem Jungen dieselben Symptome erneut auf. Diesmal war die Hepatosplenomegalie jedoch ausgeprägter und eine Besserung unter Antibiotikatherapie blieb aus. Anhand eines Blutausstriches, der die pathognomonischen „Riesengranula“ in den neutrophilen Granulozyten zeigte wurde die Diagnose des Chédiak-Higashi Syndroms gestellt. Die klinische Präsentation des Jungen war zu diesem Zeitpunkt typisch für eine akzelerierte Phase. Es wurde eine vierwöchige immunsuppressive Therapie eingeleitet, durch die es zur Remission der akzelerierten Phase und einer Rückbildung der Hepatosplenomegalie kam.

Zu diesem Zeitpunkt wurde weitere Diagnostik veranlasst. Es ließ sich keine Aktivität der natürlichen Killerzellen nachweisen. Die CMV-Serologie sprach für eine abgelaufene Infektion, Antikörper gegen EBV waren nicht nachweisbar. Im EEG war eine generalisierte Verlangsamung der Grundaktivität zu verzeichnen. Es wurden ein Mikrostrabismus convergens, eine Amblyopie, eine Hyperopie, ein Astigmatismus und eine beidseitige inkomplette Stenose des Ductus lacrimalis diagnostiziert.

Nach Stabilisierung des Allgemeinzustandes des Jungen wurde eine allogene Knochenmarkstransplantation mit Knochenmark einer weiblichen nicht-verwandten Spenderin durchgeführt. Der Junge entwickelte am 15. Tag nach KMT Fieber, eine Tachypnoe, eine Transparenzminderung der Lungen im Röntgenthorax und eine zunehmende Hepatosplenomegalie. Diese Symptome besserten sich unter Antibiotikagabe. Am 27. Tag nach Transplantation kam es zum vollen Chimärismus. Ab dem 30. Tag nach KMT bekam das Kind unter antibiotischer Therapie erneut Fieber. Er zeigte eine Zunahme der Hepatosplenomegalie, ein morbilliformes Exanthem und eine Leuko- und Thrombozytopenie. Eine Biopsie bestätigte eine *Graft versus host disease (GvHD)*, wobei auch eine erneute akzelerierte Phase durch persistierende Makrophagen in Betracht gezogen wurde. Der Junge erhielt Immunsuppressiva und Steroide. Er entwickelte unter dieser Therapie eine medikamentös-induzierte Hypertension und ein Cushing-Syndrom, sein Allgemeinzustand besserte sich jedoch rasch. Zwei Monate nach der Transplantation konnte der Patient in gutem Allgemeinzustand mit einer antibiotischen, virustatischen, antimykotischen und immunsuppressiven Medikation entlassen werden.

In den folgenden zwei Jahren traten, auch nach Absetzen der immunsuppressiven und antiinfektiösen Medikation, keine schweren Infektionen

oder akzelerierten Phasen mehr auf. Eine antihypertensive Medikation war nach 2 Jahren ebenfalls nicht mehr notwendig. Der Junge ist derzeit 12 Jahre alt, über neurologische Defizite wird nicht berichtet. Eine Splenomegalie persistiert weiterhin.

### 3.1.3 Patient 3

Patient 3 ist eines von drei Kindern konsanguiner Eltern afghanischer Herkunft. Seine Eltern und beide Schwestern sind gesund. Seine Perinatalanamnese war, abgesehen von einer postnatalen Hepatosplenomegalie, unauffällig. Schon bei Geburt hatte er hellere Augen, Haut und Haare als der Rest seiner Familie.

Im Alter von 3 1/2 Jahren wurde der Junge erstmals mit einer Otitis media und einer Begleitmastoiditis stationär behandelt. Auf die Gabe von Antibiotika sprach der Junge schlecht an, eine Mastoidektomie war notwendig. In den nächsten 5 Jahren folgten mehrere leichte Infekte.

Mit 8 Jahren entwickelte der Patient hohes Fieber, eine ausgeprägte Lymphadenopathie, eine Hepatosplenomegalie, ein Exanthem und einen Ikterus. Bei ausbleibender Besserung trotz oraler Antibiose erfolgte die stationäre Einweisung. Anhand der klinischen Präsentation und einem positiven EBV-Immunglobulin M-Titer (EBV IgM-Titer) und einer positiven EBV-PCR wurde eine Mononukleose diagnostiziert. Das Kind entwickelte im Verlauf der Erkrankung jedoch keinen persistierenden EBV-*virus-capsid-antigen*(VCA)-IgG- beziehungsweise EBV-*Epstein-Barr-nuclear-antigen*(EBNA)-IgG-Titer. Der Zustand des Jungen besserte sich im Verlauf spontan, er erhielt eine prophylaktische Antibiotikatherapie. Zu diesem Zeitpunkt wurde anhand eines peripheren Blutausstriches der Verdacht auf ein Chédiak-Higashi Syndrom gestellt. Dieser zeigte die pathognomonischen Granulationsanomalien der Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten, Mit Hilfe eines

Knochenmarksausstriches wurde diese Diagnose im Verlauf bestätigt. Da die Diagnosekriterien einer HLH erfüllt waren (Henter et al., 2007) konnte im Nachhinein von einer ersten akzelerierten Phase bei EBV-Infektion ausgegangen werden.

Weitergehende Diagnostik wurde durchgeführt. Die Granulozytenfunktionsdiagnostik ergab eine gestörte Chemotaxis der Granulozyten. Eine Lymphozytensubpopulationsanalyse zeigte viele aktivierte T- und NK-Zellen, sowie einen ausgeprägten Mangel an B-Zellen. Die Serumimmunglobulinanalyse war unauffällig. Ophthalmologisch war das „Kirchenfensterphänomen“ als Hinweis auf einen okulären Albinismus nachzuweisen. Auch fielen eine leichte Sprachentwicklungsverzögerung und Probleme in der sozialen Interaktion zu diesem Zeitpunkt erstmalig auf.

Die Suche nach einem möglichen Knochenmarksspender in der Familie sowie nach einem Fremdspender verlief negativ. Nach einem Jahr in gutem Gesundheitszustand wurde der Patient nach einem akuten respiratorischen Infekt erneut mit hohem Fieber, Hepatosplenomegalie und Panzytopenie, im Sinne einer zweiten akzelerierten Phase, stationär aufgenommen. Unter einer Therapie mit Steroiden und Immunglobulinen zur Behandlung der HLH, sowie mit Antibiotika und Antimykotika, besserte sich sein Zustand kurzfristig.

Schon nach zwei Monaten folgte eine dritte akzelerierte Phase. Die immunsuppressive Therapie wurde erweitert. Der Junge entwickelte jedoch nach wenigen Tagen eine Sepsis, eine ausgeprägte Leuko- und Thrombozytopenie bei Knochenmarksinsuffizienz, eine Leberinsuffizienz mit peripheren Ödemen und eine respiratorische Insuffizienz bei Pneumonie. Die EBV-PCR war positiv. Trotz Entlastung eines Pleuraergusses und Gabe eines Breitbandantibiotikums wurde das Kind intubationspflichtig. Im Rahmen der



EBV-Virämie entwickelte der Junge eine EBV-Enzephalitis mit therapierefraktären Krampfanfällen und eingeschränkter Vigilanz. Durch die Thrombozytopenie entwickelte der Junge ein rechtsseitiges Subduralhämatom, das durch Drainage entlastet werden musste. Es kam trotz Thrombozytensubstitution zu erheblichen Blutverlusten. Bei progredienter respiratorischer, Nieren-, Leber- und Herzinsuffizienz verstarb der Patient im Alter von 9,3 Jahren.

#### 3.1.4 Patient 4

Patient 4 war das dritte Kind konsanguiner Eltern türkischer Herkunft. Seine Eltern und sein älterer Bruder waren gesund. Seine ältere Schwester starb im Alter von 2 ½ Jahren an CHS. Der Junge wurde in der 32+3. Schwangerschaftswoche bei einer Placenta praevia und ausgeprägtem Blutverlust der Mutter durch Kaiserschnitt zur Welt gebracht. Er musste aufgrund eines Atemnotsyndroms (ANS) 3.Grades 24 Stunden lang beatmet werden. Bei Verdacht auf ein Amnioninfektionssyndrom wurde eine Antibiotikatherapie eingeleitet. Der Allgemeinzustand des Jungen besserte sich unter dieser Therapie. Bei positiver Familienanamnese, blass-grauem Hautkolorit und der bestehenden schweren Infektion bestand bereits zu diesem Zeitpunkt der Verdacht auf ein Chédiak-Higashi Syndrom. Der Verdacht wurde durch den Nachweis der typischen „Riesengranula“ im peripheren Blutaussstrich bestätigt.

Nach einem infektionsfreien Intervall wurde der Junge mit 3 Monaten erneut mit Fieber, ausgeprägtem Mundsoor und deutlicher Hepatosplenomegalie stationär aufgenommen. Serologisch wurde eine konnatale CMV-Infektion diagnostiziert. Bei fraglicher Exazerbation der CMV-Infektion wurde eine Virustatikatherapie initiiert. Bei Erregernachweis in der Blutkultur wurde eine antibiotische Therapie

begonnen und bei ausgeprägtem Mundsoor ein lokales Antimykotikum verabreicht. Sein Allgemeinzustand besserte sich unter dieser Therapie zunächst, er entfieberte. Nach vier Wochen entwickelte der Junge unter dieser Therapie jedoch erneut eine Sepsis und eine Bronchopneumonie mit multiplen Atelektasen, sodass die antibiotische Therapie erweitert werden musste. Eine gleichzeitige ausgeprägte Panzytopenie und progrediente Splenomegalie sprachen für eine erste akzelerierte Phase. Unter dieser Therapie und der Gabe von Steroiden sowie Erythrozyten- und Thrombozyten-substitutionen stabilisierte sich der Zustand des Jungen.

Die weitere Diagnostik ergab Normwerte für Lymphozytenfunktion, Lymphozytendifferenzierung und Granulozytenfunktion. Ophthalmologisch gab es ebenfalls keine Auffälligkeiten. Zu diesem Zeitpunkt wiesen die EBV- und die CMV-Serologie auf bereits abgelaufene Infektionen hin. Es fiel eine deutliche psychomotorische Entwicklungsverzögerung des Jungen auf.

Der Junge wurde unter prophylaktischer Dauertherapie mit Cotrimoxazol und Nystatin nach Hause entlassen. Er hatte trotz Antibiotikaprophylaxe im folgenden Halbjahr regelmäßig alle vier bis fünf Wochen Infekte (vor allem des Respirationstraktes), die mit hohen Infektionsparametern, zunehmender Hepatosplenomegalie und Panzytopenie einhergingen. Unter der Gabe von Antibiotika kam es jeweils zu einer Besserung der Symptome, der Laborwerte und der Hepatosplenomegalie. Das Kind war im Intervall in einem relativ guten Allgemeinzustand.

Im Alter von 9 Monaten persistierten die Panzytopenie und die Splenomegalie nach Abklingen des Infektes. Unter der Annahme einer zweiten akzelerierten Phase wurde sofort mit der Gabe von Steroiden und Immunsuppressiva begonnen.

Im Alter von 11 Monaten kam es nach Einlage eines zentralvenösen Katheters zu einer erneuten schweren Infektionsperiode mit einem ersten fokalen Krampfanfall. Die Liquorpunktion zeigte eine leichte lymphozytäre Pleozytose. Unter antibiotischer Behandlung und Fortführung der immunsuppressiven Therapie besserte sich der Allgemeinzustand des Jungen soweit, dass im Alter von 12 Monaten eine allogene Knochenmarkstransplantation von einem männlichen Fremdspender durchgeführt werden konnte. Es kam jedoch zu keinem Angehen des Knochenmarkes. Vier Wochen nach Transplantation wurde deshalb eine haploidente Retransplantation mit väterlichen Stammzellen durchgeführt. Auch diese blieb ohne Erfolg, und es kam erneut zur autologen Regeneration des Knochenmarks.

Der Junge entwickelte eine Woche nach der Retransplantation Fieber mit Anstieg der Infektionsparameter ohne Erregernachweis. Der Junge erhielt eine breite Antibiotika- und Antimykotikatherapie. Bei weiterhin zunehmender Hepatosplenomegalie und Panzytopenie wurde eine weitere akzelerierte Phase vermutet. Unter immunsuppressiver Therapie und mehrfacher Thrombozyten-, Erythrozyten- und Granulozytensubstitution stellte sich keine Besserung des Allgemeinzustandes ein. Bei progredienter Tachydyspnoe wurde trotz negativer PCR- und Serologiebefunde der Verdacht auf eine CMV-Pneumonitis gestellt und antiviral behandelt. Der Junge wurde respiratorisch insuffizient und intubationspflichtig. Er entwickelte Zeichen einer pulmonalen Hypertension mit progredienter Rechtsherzinsuffizienz. Drei Monate nach Knochenmarkstransplantation wurde die intensivmedizinische Therapie aufgrund von insuffizienter Beatmungsmöglichkeit abgebrochen. Der Junge verstarb im Alter von 1,3 Jahren.

Eine Zusammenfassung der klinischen Charakteristika der vier Patienten bietet die **Tabelle 3.1** (Seite 52).

### 3.2 Klinische Präsentation von Patienten mit CHS in der Literatur

In der Fachliteratur finden sich vor allem Beschreibungen des Krankheitsbildes von Kindern mit der *childhood form* von CHS. Es sind häufig ganze Familien mit mehreren erkrankten Kindern dargestellt. Etwa die Hälfte der beschriebenen Patienten mit der *childhood form* stammen von konsanguinen Eltern ab. Bei ebenfalls der Hälfte finden sich weitere Fälle von CHS in der Familie. Die Diagnose wurde im Durchschnitt im Alter von 30 Lebensmonaten gestellt, bei der Hälfte der Patienten erst bei der Manifestation der ersten akzelerierten Phase. Ca. 1/3 der Kinder erhielten eine KMT. Die Hälfte dieser Patienten überlebte langfristig. Fast alle Kinder bei denen eine KMT nicht möglich war, verstarben im Verlauf, die meisten schon wenige Monate nach der Manifestation der ersten akzelerierten Phase. Alle beschriebenen Patienten mit der *childhood form* wiesen Auffälligkeiten der Pigmentierung der Augen und der Haut auf. Alle Kinder zeigten eine Infektanfälligkeit mit rezidivierenden Atemwegs- oder Hautinfektionen. Blutungen kamen selten vor. Fast alle Kinder hatten eine Entwicklungsretardierung oder kognitive Einschränkungen, unabhängig davon ob sie eine KMT erhielten oder nicht (Karim *et al.*, 1997; Dufourcq-Lagelouse *et al.*, 1999; Freitas *et al.*, 1999; Herman *et al.*, 1999; Al-Sheyyab *et al.*, 2000; Certain *et al.*, 2000; Kapoor *et al.*, 2000; Trigg *et al.*, 2001; Shome *et al.*, 2002; Ahluwalia *et al.*, 2003; Möttönen *et al.*, 2003; Demirkiran *et al.*, 2004; Zarzour *et al.*, 2005). Unsere Patienten 2 und 4 zeigten dieses typische klinische Bild der *childhood form* des CHS. Sie hatten gravierende Infektionen und entwickelten früh eine akzelerierte Phase. Beide erhielten eine KMT, die bei Patient 2 erfolgreich war, bei Patient 4 jedoch zu einer autologen Regeneration mit nachfolgendem Tod an einer akzelerierten Phase führte. Patient 3 war ebenfalls von Geburt an infektanfällig, hatte aber erst mit 9 Jahren seine erste akzelerierte Phase. Es folgten weitere akzelerierte Phasen, im Rahmen einer solchen er

verstarb. In der Literatur finden sich ebenfalls solche Fälle mit verzögert einsetzender Aggravierung des Gesundheitszustandes. Der Junge hatte demnach ebenfalls die *childhood form* des CHS.

Über Patienten mit der *adolescent form* von CHS sind in der Literatur nur vereinzelte Fallbeschreibungen zu finden (Certain *et al.*, 2000; Karim *et al.*, 2002). Wie auch bei unserem Patienten 1, lagen die Probleme dieser Kinder eher in der neurologischen Symptomatik, obwohl in der Kindheit auch schwere potentiell letale Infektionen durchgemacht wurden.

Keiner unserer Patienten hatte die seltene *adult form* des CHS. In der Literatur gibt es wenige Fallbeschreibungen von Patienten mit der *adult form* von CHS. Bei diesen Patienten wurde das CHS erst im Erwachsenenalter diagnostiziert und war einen Zufallsbefund bei der Abklärung einer neurologischen Symptomatik. Im Vordergrund standen dabei periphere Polyneuropathien, Tremor, Ataxie und parkinsonoide Symptome (Uyama *et al.*, 1994; Baldus *et al.*, 1999; Certain *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 2000; Möttönen *et al.*, 2003; Silveira-Moriyama *et al.*, 2003). Häufig bestanden zusätzlich eine Einschränkung der kognitiven Leistungsfähigkeit oder eine Entwicklungsverzögerung in der Anamnese. Da die Symptome nicht spezifisch für die *adult form* des CHS sind und CHS selten als Differenzialdiagnose in Betracht gezogen wird ist davon auszugehen, dass die Prävalenz der *adult Form* unterschätzt wird.

### 3.3 Mutationsanalyse

Für die Mutationsanalyse des *CHS1*-Gens stand genomische DNA der vier beschriebenen Patienten mit CHS zur Verfügung. Das *CHS1*-Gen besteht aus 51 kodierenden Exons. Da sich die bisher bekannten Mutationen nicht auf einen bestimmten Genabschnitt beschränkten, wurden alle Exons einer Mutationsanalyse unterzogen. Zunächst wurden geeignete *Primerpaare* für die PCR-Amplifikation ausgewählt. Die großen Exons (7, 8, 14, 18, 25 und 32) benötigten zusätzliche interne Primer. Exon 35 und 36, sowie 37 und 38 konnten in einem Amplikon zusammengefasst werden. Die Etablierung der PCR-Bedingungen wurde an genomischer Kontroll-DNA durchgeführt. Im Anschluss wurde die genomische DNA der Patienten zur Amplifikation der Exons verwendet. Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, enzymatisch aufgereinigt und sequenziert.

Bei allen vier Patienten konnte eine homozygote Mutation im *CHS1*-Gen gefunden werden, die zu einer Verschiebung des Leserasters und zum Abbruch der Proteinsynthese führt. Aus der genomischen DNA der Eltern von Patient 1 und 3 wurden die Exons mit der Mutation ebenfalls amplifiziert und sequenziert. Wie zu erwarten zeigten sich hierbei äquivalente heterozygote Mutationen.

Die genetische Analyse von **Patient 1** ergab eine homozygote Basenpaarduplikation in Exon 7 (c.575dupT). Diese ist in **Abb. 3.2** im Vergleich zur Wildtypsequenz in **Abb. 3.1** dargestellt. Die Mutation führt zu einer Verschiebung des Leserasters und zur Synthese einer Stopkodons an der Position des Basenpaars 592 (F575fsX592), sodass es dort zu einem Abbruch der Proteinsynthese kommt. Seine Eltern sind beide heterozygote Träger der Mutation (siehe **Abb. 3.3 und 3.4.**). Zusätzlich konnten drei Basensubstitutionen nachgewiesen werden, die jedoch nicht zu einer Änderung der Proteinsequenz

führen, und als putative Polymorphismen gewertet wurden. Diese finden sich in Exon 7 (c.1251A>G), Exon 17 (c.4956A>G) und Exon 19 (c.5373G>A).

Abb. 3.1

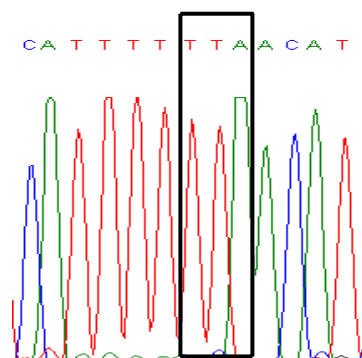


Abb. 3.2

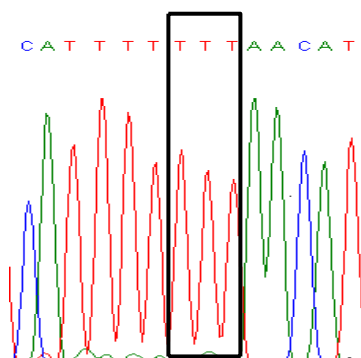


Abb. 3.3

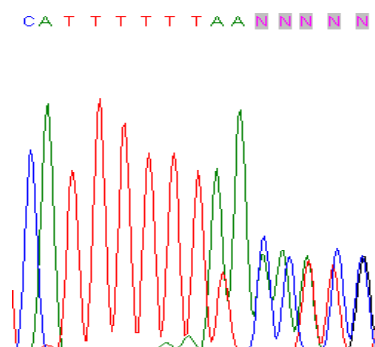
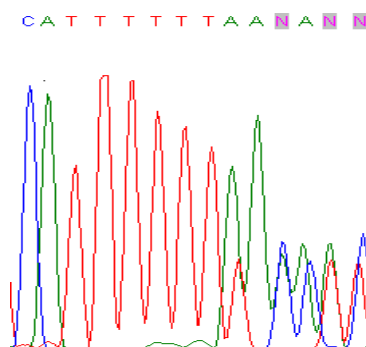


Abb. 3.4



**Abb.3.1-3.2:** Chromatographische Darstellung der homozygoten Mutation c.575dupT bei Patient 1 (Abb. 3.2). Gezeigt ist im Vergleich die Wildtypsequenz (Abb.3.1). Mit der Umrahmung ist das Kodon mit der Insertion gekennzeichnet. Die vier Basen sind jeweils durch eine andere Farbe repräsentiert (A=grün, T=rot, C=blau, G=schwarz), jeder *Peak* steht für eine Base der Sequenz.  
**Abb. 3.3-3.4:** Darstellung der äquivalenten heterozygoten Mutation c.575insT bei der Mutter (Abb.3.3) und dem Vater (Abb. 3.4) von Patient 1.

Die Mutationsanalyse von **Patient 2** zeigte eine homozygote Basenpaardeletion in Exon 17 (c.5004delA). Diese ist in **Abb. 3.6** im Vergleich zur Wildtypsequenz in **Abb. 3.5** dargestellt. Die Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters mit Abbruch der Proteinsynthese durch Bildung eines Stopkodons an der Position des Basenpaares 5091 (I5004fsX5091). Andere Aberrationen der Basensequenz, im Sinne von Polymorphismen, ließen sich bei Patient 2 nicht finden.

Abb.3.5

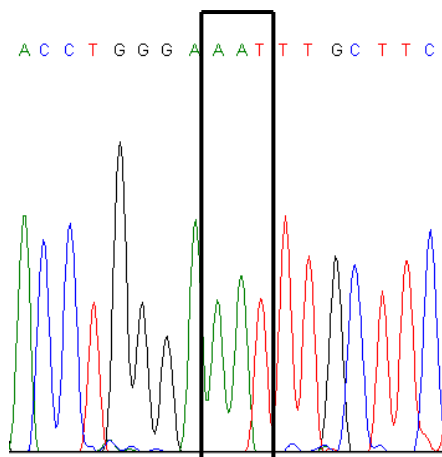
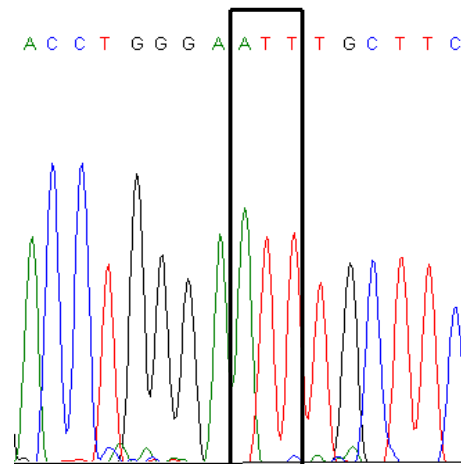


Abb.3.6



**Abb.3.5-3.6:** Dargestellt ist die homozygote Mutation c.5004delA bei Patient 2 (Abb. 3.6) im Vergleich zur Wildtypsequenz (Abb.3.5). Das Kodon mit der Mutation ist schwarz umrahmt. Die vier Basen sind jeweils durch eine andere Farbe repräsentiert (A=grün, T=rot, C=blau, G=schwarz), jeder *Peak* steht für eine Base der Sequenz.



Bei der genetischen Analyse von **Patient 3** wurde eine homozygote Basenpaardeletion in Exon 20 (c.5519delC) gefunden. Diese ist in **Abb. 3.8** im Vergleich zur Wildtypsequenz in **Abb. 3.7** dargestellt. Diese führt zu einer Verschiebung des Leserasters und einem Abbruch der Proteinsynthese an der Position des Basenpaares 5527 (Y5519fsX5527). Die Sequenzierung mit dem *Rückwärtsprimer* erbrachte eine deutlichere Darstellung der Basensequenz als die Sequenzierung mit dem *Vorwärtsprimer*. In den Abbildungen 3.7-3.10 ist deswegen das Ergebnis der Sequenzierung mit dem *Rückwärtsprimer* und damit der komplementäre Matrizenstrang dargestellt. Aus diesem Grund zeigt sich eine Deletion der Base G, anstelle einer Deletion der Base C. Die Eltern von Patient 3 sind heterozygote Träger der Mutation (siehe **Abb. 3.9 und 3.10**). Zusätzlich ließen sich 4 Basensubstitutionen nachweisen, die jedoch nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz führen und somit als putative Polymorphismen gewertet wurden. Diese finden sich in Exon 7 (c.1251A>G und c.1683A>G), Exon 17 (c.4956A>G) und Exon 19 (c.5373G>A). In Exon 25 findet sich bei Patient 3 außerdem eine Basensubstitution (c.6482A>C), die zu einer Änderung der Aminosäuresequenz (Austausch von Alanin gegen Glutamat) im Sinne einer *missense* Mutation führt. Wir sehen diese Sequenzaberration ebenfalls als putativen Polymorphismus an.

Abb. 3.7

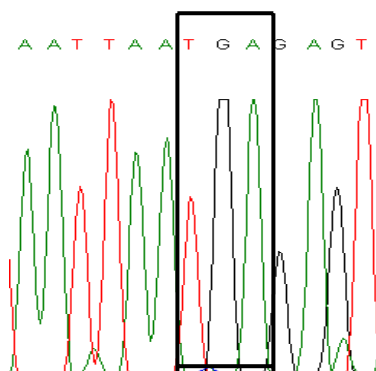


Abb.3.8

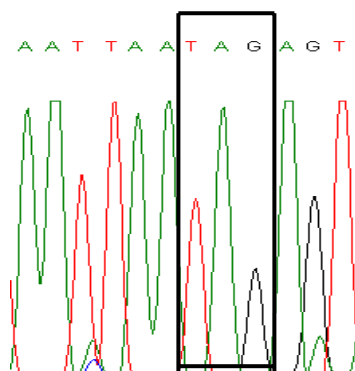


Abb. 3.9

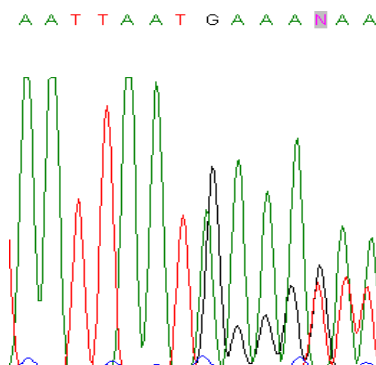
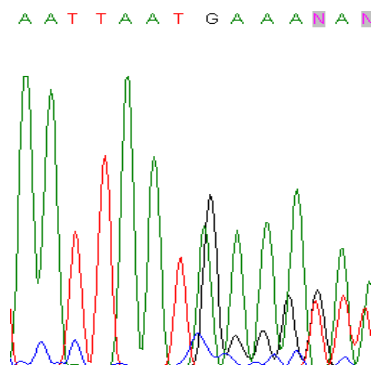


Abb. 3.10



**Abb.3.7-3.8:** Darstellung der homozygoten Mutation c.5519delC des Patienten 3 (Abb. 3.8) im Vergleich zur Wildtypsequenz (Abb.3.7). Das Kodon mit der Deletion ist schwarz umrahmt. Die vier Basen sind unterschiedlich farbig markiert (A=grün, T=rot, C=blau, G=schwarz). Da die Sequenzierung mit dem *Rückwärtsprimer* ein besseres Ergebnis zeigte, als mit dem *Vorwärtsprimer*, ist in den Abbildungen 3.7-3.10 der komplementäre Matrizenstrang dargestellt. Es zeigt sich deswegen eine Deletion der Base G, anstelle einer Deletion der Base C.

**Abb. 3.9-3.10:** Darstellung der heterozygoten Mutation c.5519delC der Mutter (Abb.3.9) und des Vaters (Abb. 3.10) von Patient 3.

Die Mutationsanalyse von **Patient 4** ergab eine homozygote Basenpaardeletion in Exon 43 (c.9590delA). Diese ist in **Abb. 3.12** im Vergleich zur Wildtypsequenz in **Abb. 3.11** dargestellt. Die Deletion führt zu einer Verschiebung des Leserasters und damit zu einem Abbruch der Proteinsynthese an der Position des Basenpaares 9777 (L9590fsX9777). Zusätzlich findet sich in Exon 7 eine Basensubstitution (c.2150A>G), die mit einer Änderung der Aminosäuresequenz (Austausch von Serin gegen Asparagin) einhergeht. Wir werten diese Sequenzaberration als putativen Polymorphismus.

Abb.3.11

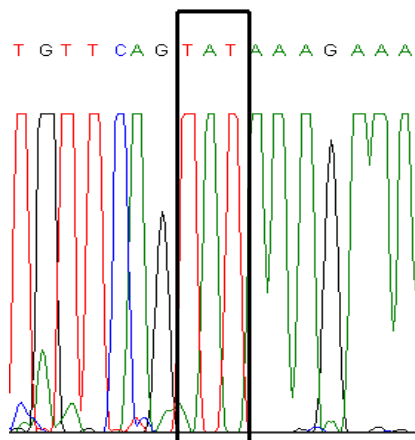
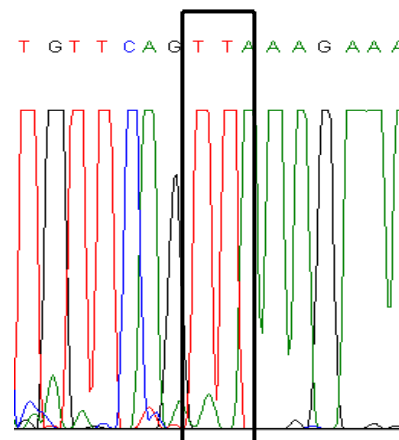


Abb. 3.12



**Abb.3.11-3.12:** Chromatographisch dargestellt ist die homozygote Mutation c.9590delA bei Patient 4 (Abb. 3.12) im Vergleich zur Wildtypsequenz (Abb.3.11). Das Kodon mit der Deletion ist schwarz umrahmt. Die vier Basen sind durch unterschiedliche Farben repräsentiert (A=grün, T=rot, C=blau, G=schwarz).

In **Abb. 3.13** sind alle bisher bekannten Mutationen graphisch dargestellt.

Tabelle 3.1: Klinische Charakteristika und Mutationen der Patienten

Klinische Charakteristika	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Patient 4
Mutation	c.575insT	c.5004delA	c.5519delC	c.9590delA
Exon	7	17	20	43
Genotyp	homozygot	homozygot	homozygot	homozygot
Geschlecht	männlich	männlich	männlich	männlich
Herkunft	Deutschland	Saudi-Arabien	Afghanistan	Türkei
Konsanguinität der Eltern	ja	ja	ja	ja
CHS in der Familie	nein	nein	nein	ja
Alter bei Diagnosestellung	54 Monate	12 Monate	42 Monate	Geburt
Alter bei 1. akzelerierter Phase	noch nicht	12 Monate	108 Monate	3 Monate
Schwangerschaft	intrauterine supraventrikuläre Tachykardie	hypotrophes Kind, Icterus gravis	Perinatale Hepatosplenomegalie	Placenta praevia, ANS, Amnioninfektionssyndrom
Klinik bei Diagnose	Pneumonie, Lungenabszess	1. akzelerierte Phase	EBV-Infektion	konnatale CMV-Infektion
Manifestation des Albinismus	weiss-blondes Haar, blasser Haut, hell-blaue Augen	dunkel-grau-silbriges Haar, blasser Haut, braune Augen	schwarz-silbriges Haar, blasser Haut, braune Augen	schwarz-silbriges Haar, graue Haut, braune Augen
Ophthalmologische Manifestation	Astigmatismus, Mikrostrabismus, Katarakt, hochgradige Myopie	Astigmatismus, Mikrostrabismus, Hyperopie, Amblyopie	partieller okulärer Albinismus	keine
Manifestation der Blutungsneigung	rezidivierende Hämatomer	keine	subdurales Hämatom	keine
Neurologische Manifestation	globale Entwicklungsverzögerung	keine	Sprachentwicklungsverzögerung	globale Entwicklungsverzögerung
EEG-Auffälligkeiten	generalisierte Verlangsamung	generalisierte Verlangsamung	keine	keine
Granulozytenfunktion	gestörte Chemotaxis	nicht untersucht	gestörte Chemotaxis	normal
Funktion der NK-Zellen	nicht untersucht	keine Funktion nachweisbar	nicht untersucht	nicht untersucht
Kontakt zu CMV/EBV	CMV+/EBV+	CMV+/EBV-	CMV-/EBV+	CMV+/EBV+
KIMT	nein	ja	nein	ja
Klinischer Verlauf	derzeit 17 Jahre alt	derzeit 12 Jahre alt	mit 8 Jahren verstorben	mit 1,3 Jahren verstorben

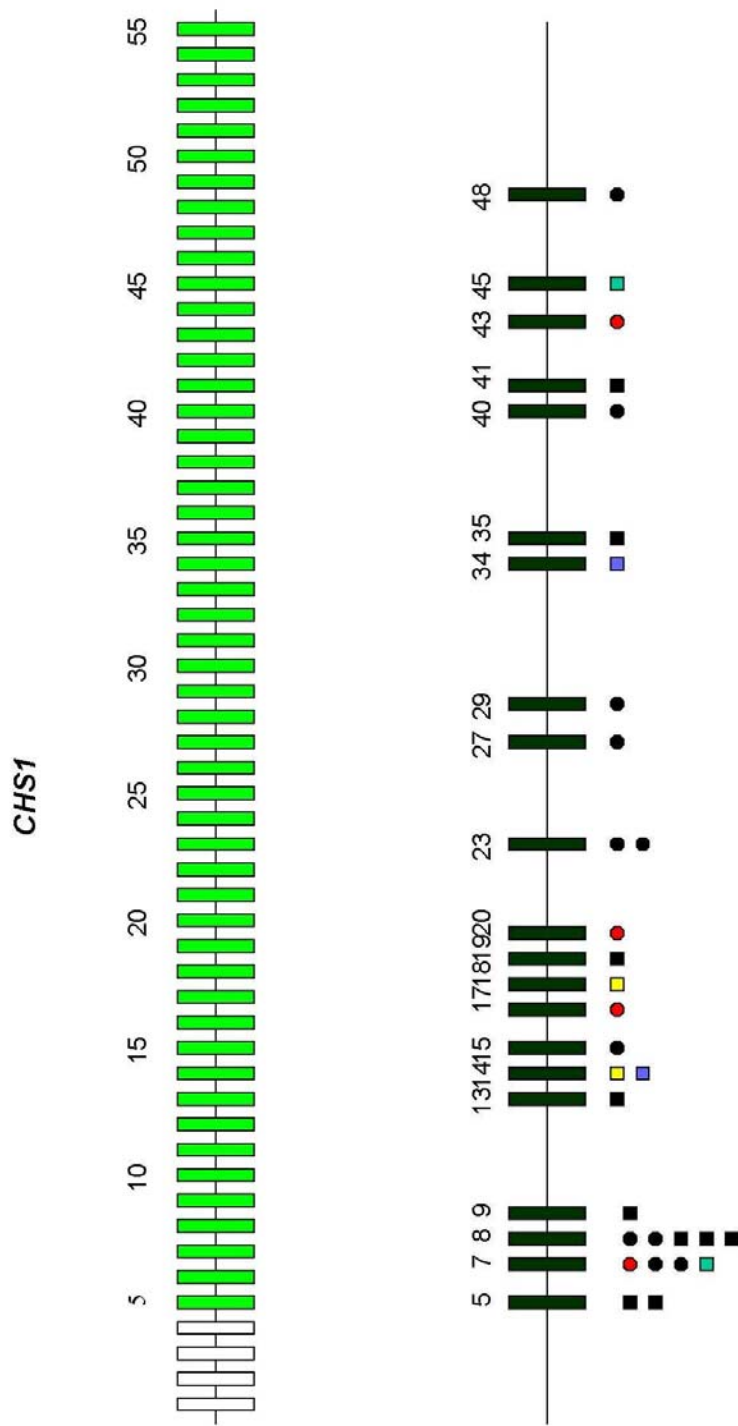


Abb. 3.13 CHS1-Gen mit allen bisher bekannten Mutationen.  
 Oben: Grüner Balken = kodierendes Exon, Weißer Balken = nicht-kodierendes Exon.  
 Unten: Schwarzer Balken = Exon mit bekannter Mutation, Schwarzer Punkt = homozygote Mutation, Schwarzes Quadrat = heterozygote Mutation.  
 Rote Punkte = Mutationen unserer vier Patienten, Paarige farbige Quadrate = compound-heterozygote Mutation.

## 4. Diskussion

Bei der Mutationsanalyse des *CHS1*-Gens bei vier vom Chédiak-Higashi Syndrom betroffenen Patienten konnten vier verschiedene homozygote Mutationen gefunden werden. Bei drei Patienten fand sich eine Basendeletion, bei einem Patienten eine Basenduplikation. Diese führten zu einer Verschiebung des Leserasters und zum Abbruch der Proteinsynthese. Die Mutationen waren in verschiedenen Exons (7, 17, 20 und 43) lokalisiert. Die Basendeletion von Patient 4 in Exon 43 ist bereits in der Literatur beschrieben worden, die anderen drei sind Erstbeschreibungen. Es fanden sich bei den Patienten 1, 3 und 4 zusätzlich noch Sequenzveränderungen, im Sinne von Basensubstitutionen. Bei Patient 1 und auch bei den meisten der Sequenzveränderungen der Patienten 3 und 4 führte dieser Austausch nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz. Sie wurden deswegen als putative Polymorphismen gewertet. Bei Patient 3 fand sich außerdem ein Basenaustausch (c.6482A>C), der zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz durch einen Austausch der Aminosäure Alanin gegen die Aminosäure Glutamat führt. Bei Patient 4 fand sich ein Basenaustausch (c.2150A>G), der ebenfalls zu einer Änderung der Aminosäuresequenz durch den Austausch von Serin gegen Asparagin führt. Vor dem Hintergrund der oben beschriebenen *frameshift* Mutationen sehen wir diese Änderungen der Aminosäuresequenz ebenfalls als putative Polymorphismen an.

In den bisher publizierten genetischen Analysen des *CHS1*-Gens konnte nur bei der Hälfte der Patienten eine relevante homozygote Mutation nachgewiesen werden. Abgesehen von der Möglichkeit des Übersehens von Mutationen durch unzureichende Analysetechniken als Ursache hierfür, wurde die Hypothese geäußert, dass ein Defekt in einem oder mehreren weiteren bisher unbekanntem

Genen ebenfalls den charakteristischen Phänotyp des Chédiak-Higashi Syndroms hervorrufen könnte (Karim *et al.*, 2002; Zarzour *et al.*, 2005). In dieser Arbeit wurden jedoch bei allen vier untersuchten Patienten homozygote Mutationen im *CHS1*-Gen gefunden. Dies deutet soweit nicht auf die Existenz der Beteiligung weiterer Gene zur Ausprägung von CHS hin. Da aber die Patientengruppe aufgrund der Seltenheit des Syndroms sehr klein ist, kann das Vorliegen von Defekten anderer Gene als Ursache für das CHS hier nicht ausgeschlossen werden und sollte weiterhin in Betracht gezogen werden.

Karim *et al.* (Karim *et al.*, 2002) stellten die Hypothese einer Korrelation zwischen der zugrundeliegenden Mutation und der Schwere des Krankheitsbildes des CHS auf. Mildere Phänotypen zeigten in dieser Studie eine Kombination von *missense* Mutationen des *CHS1*-Gens, sodass ein verkürztes oder unvollständiges Protein entstand. Bei der *childhood form* hingegen lagen ausschließlich *nonsense* Mutationen vor, wodurch die Synthese des Proteins komplett unterbunden wird. Die genetischen Analysen unserer vier Patienten zeigen homozygote Mutationen bei allen Patienten. Diese führen alle durch eine Verschiebung des Leserasters zu einem frühzeitigen Abbruch der Proteinsynthese. Es ist demnach bei allen Patienten ein ähnlich schweres klinisches Bild zu erwarten. Auf die Patienten 2, 3 und 4 trifft dies auch zu. Alle drei haben die schwere *childhood form* des CHS. Patient 1 hingegen zeigt eine weitaus mildere Form des CHS, die *adolescent form*, mit schweren Infektionen in der Kindheit, aber ohne lymphoproliferative akzelerierte Phase. In der genetischen Analyse der Patienten 1, 3 und 4 fanden sich mehrere Sequenzaberrationen durch Austausch einzelner Basen. Bei Patient 1 wurde die Aminosäuresequenz hierdurch jeweils nicht verändert. Bei den Patienten 3 und 4 hingegen fanden sich Sequenzaberrationen, die zum Austausch eine Aminosäure führten (*missense* Mutation). Jedoch nur Patient 1 hat eine mildere

Form der Erkrankung. Diese Beobachtung korreliert nicht mit der Hypothese von Karim *et al.*. Somit lässt sich der vermutete Zusammenhang zwischen Mutationstyp und Schwere des Krankheitsbildes hier nicht bestätigen. In der Arbeit von Certain *et al.* (Certain *et al.*, 2000) wird ein Geschwisterpaar mit derselben *compound* heterozygoten Mutation genannt. Während der Junge sehr früh während einer akzelerierten Phase an der *childhood form* von CHS verstarb, zeigte das Mädchen eine milde Form des CHS ohne akzelerierte Phase. Auch diese Beobachtung spricht gegen die Annahme, dass ausschließlich die Art der Mutation die klinische Ausprägung der Erkrankung bestimmt.

Certain *et al.* (Certain *et al.*, 2000) stellte in derselben Publikation einen Zusammenhang zwischen einer EBV- bzw. CMV- Infektion und dem Auftreten einer akzelerierten Phase bei Patienten mit CHS auf. Auch diese Hypothese galt es anhand der Krankengeschichte unserer vier Patienten zu prüfen.

Die Patienten 3 und 4 hatten ihre erste akzelerierte Phase während einer akuten Infektion mit EBV bzw. CMV. Sie verstarben beide während einer Reaktivierung der Virusinfektion. Bei beiden Kindern lässt sich demnach ein direkter Zusammenhang zwischen der Infektion mit dem CMV- bzw. EBV-Virus und dem Auftreten einer akzelerierten Phase nachweisen. Patient 2 hatte zwei akzelerierte Phasen, bevor eine KMT durchgeführt wurde. Leider wurde zu diesen Zeitpunkten keine CMV- bzw. EBV-Serologien bestimmt. Vor der KMT sprach seine CMV-Serologie für eine abgelaufene Infektion. Ein Zusammenhang zwischen CMV-Infektion und einer akzelerierten Phase kann bei Patient 2 also nur vermutet werden. Die CMV- und EBV-Serologien von Patient 1 hingegen weisen auf abgelaufene Infektionen hin. Eine klinische Erkrankung an CMV und EBV ist nicht bekannt. Es trat bislang keine akzelerierte Phase auf.



Bei zwei der vier Patienten lässt sich die Hypothese der Auslösung einer akzelerierten Phase durch EBV bzw. CMV demnach bestätigen, bei einem Patienten zusätzlich vermuten. Patient 1 zeigt die *adolescent form* der Erkrankung. Bislang ist nicht endgültig geklärt, was die Ausprägung dieses milderen Phänotyps beeinflusst, und warum eine Infektion mit EBV oder CMV bei diesen Kindern nicht zu der Auslösung einer akzelerierten Phase führt.

Durch die Seltenheit des Chédiak-Higashi Syndroms ist die genetische Untersuchung einer großen Gruppe von Patienten sehr schwierig. Durch die Etablierung der Sequenzanalyse zum Nachweis von Mutationen im *CHS1*-Gen in dieser Arbeit können in Zukunft weitere Patienten mit CHS genetisch untersucht werden. Damit sind die Voraussetzungen zur Verbesserung der Diagnostik, der endgültigen Klärung des Einflusses der Mutationen auf den Phänotyp und damit der Erweiterung der Kenntnisse über CHS zur Therapieoptimierung geschaffen worden. Auch die genetische Beratung der betroffenen Familien wird durch eine genaue Lokalisation und Art der zugrundeliegenden Mutation verbessert.

## 5. Zusammenfassung

Das Chédiak-Higashi Syndrom (CHS) ist eine seltene autosomal-rezessiv vererbte Erkrankung, charakterisiert durch einen schweren Immundefekt, okulokutanen Albinismus, Blutungsneigung, neurologische Dysfunktionen und eine histiolymphozytäre akzelerierte Phase. Ursächlich für das CHS sind Mutationen im *CHS1*-Gen. Dieses kodiert ein Protein, das bei der lysosomalen Formation, dem intrazellulären Transport und damit der Sekretion bzw. Exkretionsleistung der betroffenen Zellen eine essentielle Rolle spielt.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war der Nachweis von Mutationen des *CHS1*-Gens bei vier Patienten mit CHS. Hierbei sollte gleichzeitig die Relevanz von Defekten des *CHS1*-Gens für das Krankheitsbild des CHS und damit die eventuelle Präsenz von Defekten anderer Gene zur Ausbildung des Phänotyps des CHS geprüft werden. Eine in der Literatur vermutete Korrelation zwischen der vorliegenden Mutation des *CHS1*-Gens und der klinischen Ausprägung der Erkrankung sollte untersucht werden. Hierzu wurde per PCR und anschließender Sequenzierung eine vollständige Sequenzanalyse aller 51 kodierenden Exons des *CHS1*-Gens durchgeführt.

Drei der vier untersuchten Patienten wiesen klinisch die schwere *childhood form* von CHS auf, zwei von ihnen verstarben, der dritte überlebte nach KMT. Der vierte Patient zeigte die mildere *adolescent form*. Wir fanden bei allen vier Patienten homozygote Mutationen im *CHS1*-Gen. Dies lässt vermuten, dass nur Defekte des *CHS1*-Gens für das Krankheitsbild des CHS verantwortlich sind. Es lässt sich jedoch weiterhin nicht ausschließen, dass auch Defekte in weiteren Genen zum Krankheitsbild des Chédiak-Higashi Syndroms führen können. Alle unsere vier Kinder wiesen gleichwertige homozygote Mutationen im *CHS1*-Gen

auf, Patient 1 zeigte jedoch eine deutlich mildere Form von CHS. Diese Beobachtung spricht nicht für die vermutete Korrelation zwischen Art der Mutation und klinischem Schweregrad von CHS.

Die Hypothese, dass EBV/CMV-Infektionen als Auslöser für die akzelerierte Phase fungieren, konnte anhand von zwei Patienten bestätigt werden, die im Rahmen einer EBV- bzw. CMV-Infektion und anschließender akzelerierter Phase verstarben. Bei einem weiteren Patienten konnte ein solcher Zusammenhang vermutet werden. Der vierte Patient zeigt die *adolescent form* der Erkrankung, hat positive Antikörpernachweise für beide Infektionen, bislang aber keine akzelerierte Phase erlebt. Warum EBV und CMV bei ihm keine akzelerierte Phase auslöste, bleibt ungeklärt.

Zusammenfassend konnte durch die Etablierung der Sequenzanalyse des *CHS1*-Gens die Voraussetzung für die genetische Analyse weiterer Patienten geschaffen werden. Dadurch kann in Zukunft weitere Klarheit über den Einfluss der Mutationen im *CHS1*-Gen auf das klinische Krankheitsbild geschaffen werden. Auch die genetische Beratung der Familien kann durch Nachweis der zugrundeliegenden Mutation erleichtert werden.

## 6. Literaturverzeichnis

Ahluwalia J, Pattari S, Trehan A, Marwaha RK, Garewal G *Accelerated phase at initial presentation: An uncommon occurrence in Chédiak-Higashi syndrome*. Pediatric hematology and oncology (2003) 20: 563-567.

Al-Sheyyab M, Daoud AS, El-Shanti H *Chediak- Higashi Syndrome: A report of eight cases from three families*. Indian Pediatrics (2000) 37: 69-75.

Baldus M, Zunftmeister V, Geibel-Werle G, Claus B, Mewes D, Uppenkamp M, Nebe T *Chédiak-Higashi- Steinbrinck syndrome (CHS) in a 27-year-old woman- effects of G-CSF treatment*. Ann Hematol (1999) 78: 321-327.

Barbosa MDFS, Nguyen QA, Tschernev VT, Ashley JA, Detter JC, Blaydes SM, Brandt SJ, Chotai D, Hodgman C, Solari RCE, Lovett M, Kingsmore SF *Identification of the homologous beige and Chediak-Higashi syndrome genes*. Nature (1996) 382: 262-265.

Barbosa MDFS, Barrat FJ, Tschernev VT, Nguyen QA, Mishra VS, Colman SD, Pastural E, Dufourcq-Lagelouse R, Fischer A, Holcombe RF, Wallace MR, Brandt SJ, de Saint Basile G, Kingsmore SF *Identification of mutations in two major mRNA isoforms of the Chediak-Higashi syndrome gene in human and mouse*. Hum Mol Genet (1997) 6(7): 1091-1098.

Barrat FJ, Auloge L, Pastual E, Lagelouse RD, Vilmer E, Cant AJ, Weissenbach J, Le Paslier D, Fischer A, De Saint Basile G *Genetic and physical mapping of the Chediak-Higashi syndrome on Chr. 1q42-q43*. Am J Hum Genet (1996) 59: 625-632.

Barrat FJ, Le Deist F, Benkerrou M, Bousso P, Feldmann J, Fischer A, de Saint Basile G *Defective CTLA-4 cycling pathway in Chediak-Higashi syndrome: A possible mechanism for deregulation of T lymphocyte activation.* Proc Natl Acad Sci (1999) 96: 8645-8650.

Beguez-Cesar AB *Neutropenia cronica maligna familiar con granulaciones atipicas de los leucocitos.* Bol Soc Cubana Pediatr (1943) 15:900-922.

Certain S, Barrat F, Pastural E, Le Deist F, Goyo-Rivas J, Jabado N, Benkerrou M, Seger R, Vilmer E, Beullier G, Schwarz K, Fischer A, de Saint Basile G *Protein truncation test of LYST reveals heterogenous mutations in patients with Chediak-Higashi syndrome.* Blood (2000) 95(3): 979-983.

Chediak M *Nouvelle anomalie leukocytaire de caractere constitutionnel et familial.* Rev Hematol (1952) 7: 362-367.

Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O, Oohashi T, Howell GR, Bye JM, Cahn AP, Durham J, Heath P, Wray P, Pavitt R, Wilkinson J, Leversha M, Huckle E, Shaw-Smith CJ, Dunham A, Rhodes S, Schuster V, Porta G, Yin L, Serafini P, Sylla B, Zollo M, Franco B, Bolino A, Seri M, Lanyi A, Davis JR, Webster D, Harris A, Lenoir G, de St Basile G, Jones A, Behloradsky BH, Achatz H, Murken J, Fassler R, Sumegi J, Romeo G, Vaudin M, Ross MT, Meindl A, Bentley DR *Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene.* Nat Genet (1998) 20(2): 129-135.

Demirkiran O, Utku T, Urkmez S, Dikmen Y *Chediak-Higashi syndrome in the intensive care unit.* Pediatric Anesthesia (2004) 14: 685-688.

Donahue WL, Bain HW *Chédiak-Higashi syndrome: a lethal familial disease with anomalous inclusions in the leukocytes and constitutional stigmata*. Pediatrics (1957) 20: 416-431.

Dufourcq-Lagelouse R, Lambert N, Duval M, Viot G, Vilmer E, Fischer A, Prieur M, de Saint Basile G *Chédiak-Higashi syndrome associated with maternal uniparental isodisomy of chromosome 1*. Eur J Hum Genet (1999) 7: 633-637.

Feldmann J, Callebaut I, Raposo G, Certain S, Bacq D, Dumont C, Lambert N, Ouachee-Chardin M, Chedeville G, Tamary H, Minard-Colin V, Vilmer E, Blanche S, Le Deist F, Fischer A, de Saint Basile G *Munc13-4 is essential for cytolytic granules fusion and is mutated in a form of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL3)*. Cell (2003) 115(4): 461-473.

De Freitas GR, De Oliveira CP, Reis RS, Sarmiento MR, Gaspar NK, Fialho M, Praxedes H *Seizures in Chédiak-Higashi Syndrome*. Arq Neuropsiquiatr (1999) 57(2-B): 495-497.

Ganschow R, Grabhorn E, Lemke J, Lepler R *Cardiac failure in an infant with Chediak-Higashi syndrome: A hypothesis of the effect of diadenosine polyphosphates*. Pediatr Allergy Immunol (2002) 13:307-310.

Haddad E, Le Deist F, Blanche S, Benkerrou M, Rohrlach P, Vilmer E, Griscelli C, Fischer A *Treatment of Chediak-Higashi syndrome by allogenic bone marrow transplantation: report of 10 cases*. Blood (1995) 85(11): 3328-3333.

Hauser RA, Friedlander J, Baker MJ, Thomas J, Zuckerman KS *Adult Chediak-Higashi Parkinsonian Syndrome with Dystonia*. Movement disorder (2000) 15(4): 705-708.

Henter JI, Horne A, Aricó M, Egeler RM, Filipovich AH, Imashuku S, Ladisch S, Mc Clain K, Webb D, Winiarski J, Janka G *HLH-2004: Diagnostic and therapeutic guidelines for hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *Pediatr Blood Cancer* (2007) 48:124-131.

Herman TE, Lee BCP *Accelerated phase of Chédiak-Higashi syndrome diffuse white-matter-enhancing lesions*. *Pediatr Radiol* (1999) 29: 527-529.

Higashi O *Congenital gigantism of peroxidase granules*. *Tohoku J Exp Med* (1954) 59: 315-322.

Introne W, Boissy RE, Gahl WA *Clinical, Molecular and Cell Biological Aspects of Chediak-Higashi Syndrome*. *Mol Genet Metab* (1999) 68: 283-303.

Janka G, Imashuku S, Elinder G, Schneider M, Henter JI *Infection- and malignancy-associated hemophagocytic syndromes. Secondary hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *Hematol Oncol Clin North Am* (1998)12:435-444.

Janka GE *Hemophagocytic syndromes*. *Blood Rev.* (2007) 21: 245-253.

Janka G, Zur Stadt U *Familial and Acquired Hemophagocytic Lymphohistiocytosis*. *Eur J Ped* (2007) 166(2): 95-109.

Janka G *Hemophagocytic Lymphohistiocytosis : When the Immune System Runs Amok*. *Klin Padiatr* (2009) 221: 278-285.

Kapoor A, Munjal S, Arya R *Chediak-Higashi Syndrome – A case report*. Indian J Pathol Microbiol (2000) 43 (3): 373-375.

Karim MA, Nagle DL, Kandil HH, Bürger J, Moore KJ, Spritz RA *Mutations in the Chediak-Higashi syndrome gene (CHS1) indicate requirement for the complete 3801 amino acid CHS protein*. Hum Mol Genet (1997) 6(7): 1087-1089.

Karim MA, Suzuki K, Fukai K, Oh J, Nagle DL, Moore KJ, Barbosa E, Falik-Borenstein T, Filipovich A, Ishida Y, Kivrikko S, Klein C, Kreuz F, Levin A, Miyajima H, Regueiro J, Russo C, Uyama E, Vierimaa O, Spritz RA *Apparent Genotype-Phenotype Correlation in Childhood, Adolescent and Adult Chediak-Higashi Syndrome*. Am J Med Genet (2002) 108: 16-22.

McVey Ward D, Griffiths GM, Stinchcombe JC, Kaplan J *Analysis of the Lysosomal Storage Disease Chediak-Higashi Syndrome* Traffic (2000) 1: 816-822.

Mc Vey Ward D, Shiflett SL, Huynh D, Vaughn MB, Prestwick G, Kaplan J *Use of expression constructs to dissect the functional domains of the CHS/Beige protein: Identification of multiple phenotypes*. Traffic (2003) 4: 403-415.

Ménasché G, Feldmann J, Fischer A, de Saint Basile G *Primary hemophagocytic syndromes point to a direct link between lymphocyte cytotoxicity and homeostasis*. Immun Rev (2005) 203: 165-179.

Möttönen M, Lanning M, Baumann P, Saarinen-Pihkala UM *Chediak-Higashi syndrome: four cases from Northern Finland*. Acta Paed (2003) 92: 1047-1051.



Mullis K, Faloona FA *Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction*. Methods in enzymology (1987) 155: 335-350.

Nagle DL, Karim MA, Woolf EA, Holmgren L, Bork P, Misumi DJ, Mc Grail SH, Dussault BJ, Perou CM, Boissy RE, Duyk GM, Spritz RA, Moore KJ *Identification and mutation analysis of the complete gene for Chediak-Higashi syndrome*. Nat Genet (1996) 14: 307-311.

Perou CM, Kaplan J *Chediak Higashi Syndrome is not due to a defect in microtubule-based lysosomal mobility*. J Cell Sci (1993) 106:99-107.

Perou CM, Leslie JD , Green W, Li L, Mc Vey Ward D, Kaplan J *The Beige/Chediak-Higashi Syndrome Gene Encodes a Widely Expressed Cytosolic Protein*. J Bio Chem (1997) 272(47): 29790-29794.

Rigaud S, Fondanèche MC, Lambert N, Pasquier B, Mateo V, Soulas P, Glacier L, Le Deist F, Rieux-Laucat F, Revy P, Fischer A, de Saint Basile G, Latour S *XIAP deficiency in humans causes an X-linked lymphoproliferative syndrome*. Nature (2006) 444(7115): 110-114.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proceedings of the national academy of sciences of the United States of America (1977) 74: 5463-5467.

Shome DK, Al-Mukharraq H, Mahdi N, Ameen G, Farid E *Clinicopathological aspects of Chediak-Higashi syndrome in the accelerated phase*. Saudi Medical Journal (2002) 23 (4): 464-466.

Silveira-Moriyama L, Moriyama TS, Gabbi TVB, Ranvaud R, Barbosa ER *Chediak-Higashi Syndrome with Parkinsonism*. *Mov Dis* (2004) 19(4): 472-475.

Steinbrinck W *Über eine neue Granulationsanomalie der Leukozyten*. *Dtsch Arch Klein Med* (1948) 193:577-581.

Stepp SE, Dufourcq-Lagelouse R, Le Deist F, Bhawan S, Certain S, Mathew PA, Henter JI, Bennett M, Fischer A, de Saint Basile G, Kumar V *Perforin gene defects in familial hemophagocytic lymphohistiocytosis*. *Science* (1999) 286(5446): 1957-1959.

Stinchcombe J, Bossi G, Griffiths GM *Linking Albinism and Immunity: The Secrets of Secretory Lysosomes*. *Science* (2004) 305: 55-59.

Stinchcombe JC, Page LJ, Griffiths GM *Secretory Lysosome Biogenesis in Cytotoxic T Lymphocytes from Normal and Chediak Higashi Syndrome Patients*. *Traffic* (2000) 1: 435-444.

Tardieu M, Lacroix C, Neven B, Bordigoni P, de Saint Basile G, Blanche S, Fischer A *Progressive neurologic dysfunctions 20 years after allogeneic bone marrow transplantation for Chediak-Higashi syndrome*. *Blood* (2005) 106(1): 40-42.

Trigg ME, Shugar R *Chédiak-Higashi syndrome: hematopoietic chimerism corrects genetic defect*. *Bone Marrow Transplantation* (2001) 27: 1211-1213.

Uyama E, Hirano T, Ito K, Nakashima H, Sugimoto M, Naito M, Uchino M, Ando M *Adult Chédiak-Higashi syndrome presenting as parkinsonism and dementia.* Acta neurologica scandinavica (1994) 89(3): 175-183.

Wang X, Herberg FW, Laue MM, Wüllner C, Hu B, Petrasch-Parwez E, Kilimann MW *Neurobeachin: A Protein Kinase A-Anchoring, beige/Chediak-Higashi Protein Homolog Implicated in Neuronal Membrane Traffic.* J Neuroscience (2000) 20(23): 8551-8565.

Witkop CJ, Quevedo WC, Fitzpatrick TB, King RA *Albinism. In the metabolic basis of inherited disease.* (Scriver CR, Beaudet AL, Sly WS, Valle DL, Eds.) 6<sup>th</sup> ed. New York: Mc Graw-Hill (1989) 2: 2905-2947.

Wolf J, Jacobi C, Breer H, Grau A *Das Chediak-Higashi-Syndrom.* Der Nervenarzt (2006) 77: 148-157.

Zarzour W, Kleita R, Frangoul H, Suwannarat P, Jeong A, Kim SY, Wayne AS, Gunay-Aygun M, White J, Filipovich AH, Gahl WA *Two novel CHS1 (LYST) mutations: Clinical correlations in an infant with Chédiak-Higashi syndrome.* Mol Genet Metab (2005) 85: 125-132.

Zur Stadt U, Schmidt S, Kasper B, Beutel K, Diler AS, Henter JI, Kabisch H, Schneppenheim R, Nürnberg P, Janka G, Hennies HC *Linkage of familial hemophagocytic lymphohistiocytosis (FHL) type-4 to chromosome 6q24 and identification of mutations in syntaxin 11.* Hum Mol Genet (2005) 14(6): 827-834.

Zur Stadt U, Beutel K, Kolberg S, Schneppenheim R, Kabisch H, Janka G, Hennies HC *Mutation spectrum in children with primary hemophagocytic*

*lymphohistiocytosis: molecular and functional analyses of PRF1, UNC13D, STX11 and RAB27A.* Hum Mutat (2006) 27(1): 62-68.

Zur Stadt U, Rohr J, Seifert W, Koch F, Grieve S, Pagel J, Strauss J, Kasper B, Nürnberg G, Becker C, Maul-Pavicic A, Beutel K, Janka G, Griffiths G, Ehl S, Hennies HC *Familial hemophagocytic lymphohistiocytosis type 5 (FHL-5) is caused by mutations in Munc 18-2 and impaired binding to syntaxin 11.* Am J Human Genet (2009) 85(4): 482-492.

## 7. Anhang

### 7.1. Abkürzungen

A	Adenosin
ADP/ATP	Adenosinbiphosphat/Adenosintriphosphat
ANS	Atemnotsyndrom
AV-Block	Atrioventrikulärer Block
bp	Basenpaar ( <i>base pair</i> )
CHS	Chédiak-Higashi Syndrom
CMV	Zytomegalievirus
CTL	Zytotoxische T-Lymphozyten ( <i>cytotoxic T-lymphocytes</i> )
C	Cytosin
DNA	Desoxyribonukleinsäure ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
dNTP/ddNTP	(Di)desoxynukleosidtriphosphate
EBV	Epstein-Barr-Virus
EBV-EBNA	<i>EBV-Epstein-Barr-Nuclear-Antigen-Immunglobuline G</i>
EBV-VCA-IgG	<i>EBV-Virus-Capsid-Antigen-Immunglobuline G</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EEG	Elektroenzephalogramm
EKG	Elektrokardiogramm
FHLH	Familiäre Hämophagozytische Lymphohistiozytose
F-/R-Primer	Vorwärts-/Rückwärts- <i>Primer (Forward-/ Reverse-Primer)</i>
GvHD	Graft-versus-Host-Disease
GS	Griscelli Syndrom
G	Guanin
HLH	Hämophagozytische Lymphohistiozytose

IAHS	infektionsassoziiertes hämophagozytisches Syndrom
IgM, IgG	Immunglobulin M, G
kDa	Kilo Dalton
KMT	Knochenmarkstransplantation
Lyst	<i>Lysosomal trafficking regulator gene</i>
LYST	<i>Lysosomal trafficking regulator proteine</i>
MAS	Makrophagenaktivierungssyndrom
mMol	milliMol
MTOC	Mikrotubuliorganisationszentrum (microtubule organizing center)
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
PAGE	Polyacrylgelelektrophorese
PCR	Polymerasekettenreaktion ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
pTT	partielle Thromboplastinzeit
PTT	Protein Truncation Test
SSCP-Analyse	Einzelstrangkonformationsanalyse ( <i>Single-strand conformation polymorphism analysis</i> )
TAE-Puffer	Tri-Acetat-EDTA-Puffer
T	Thymin
UV	Ultraviolett
VAHS	virusassoziiertes hämophagozytisches Syndrom
XLP	x-chromosomales lymphoproliferatives Syndrome ( <i>x-linked proliferative syndrome</i> )
ZNS	Zentrales Nervensystem

## 7.2 Abbildungen

Abbildung 1.1:	Klassifikation der hämophagozytischen Syndrome.....	7
Tabelle 1.1:	Charakteristika der genetischen Formen der HLH im Überblick..	8
Abbildung 1.2:	Knochenmarksausstrich eines Patienten mit CHS.....	11
Abbildung 1.3:	Exon-Intron-Struktur des <i>CHS1</i> -Gens.....	17
Tabelle 1.2:	Bekannte Mutationen im <i>CHS1</i> -Gen.....	21
Tabelle 2.1:	Oligonukleotidsequenz der verwendeten Primer.....	27
Tabelle 2.2:	PCR-Reaktionsansatz.....	30
Tabelle 2.3:	PCR-Protokoll.....	30
Tabelle 2.4:	Agarosegel-Ansatz.....	31
Tabelle 2.5:	Sequenzierungsansatz.....	33
Tabelle 2.6:	Sequenzierungsprotokoll.....	33
Tabelle 2.7:	Konditionen von PCR und Sequenzierung.....	34
Abbildung 3.1+3.2:	Darstellung der homozygoten Mutation c.575insT bei Patient 1 im Vergleich zur Wildtypsequenz.....	47
Abbildung 3.3+3.4:	Darstellung der äquivalenten heterozygoten Mutationen der Eltern von Patient 1.....	47
Abbildung 3.5+3.6:	Darstellung der homozygoten Mutation c.5004delA bei Patient 2 im Vergleich zur Wildtypsequenz.....	48
Abbildung 3.7+3.8:	Darstellung der homozygoten Mutation c.5519delC bei Patient 3 im Vergleich zur Wildtypsequenz.....	50
Abbildung 3.9+3.10:	Darstellung der äquivalenten heterozygoten Mutationen der Eltern von Patient 3.....	50
Abbildung 3.11+3.12:	Darstellung der homozygoten Mutation c.9590delA bei Patient 4 im Vergleich zur Wildtypsequenz.....	51
Tabelle 3.1:	Klinische Charakteristika und Mutationen der Patienten.....	52
Abbildung 3.13:	<i>CHS1</i> -Gen mit allen bisher bekannten Mutationen.....	53

### 7.3 Danksagung

Bei Frau Professor Dr. med. G. Janka möchte ich mich herzlich für die Betreuung und Unterstützung meiner Arbeit bedanken. Vielen Dank für die Geduld.

Für die Bereitstellung des Themas, die Hilfe bei der Präsentation und Publikation der Ergebnisse und die engagierte Betreuung meiner Arbeit möchte ich meinem Betreuer Herrn Dr. U. zur Stadt danken. Durch seine stetige Bereitschaft, aufkommende Fragen zu beantworten und konstruktive Kritik zu äußern, konnte diese Arbeit zustande kommen.

Für die gute Zusammenarbeit im Labor und die vielfältigen Hilfestellungen möchte ich mich bei Katharina Michael, Jürgen Müller und Tobias Obser bedanken. Meinen besonderen Dank verdient dabei Florian Oyen für seine Geduld, stetige Hilfe und die Verbesserung meiner Arbeitstechniken. Ohne seine Hilfe würde ich immer noch im Labor sitzen.

Sabine Holm danke ich für die Hilfe bei Formatierung und Korrektur, sowie für die seelische Unterstützung während dieser Zeit. Meinem Bruder Christoph von Barga vielen Dank für die „graphische“ Unterstützung.

Meiner Mutter Dagmar Scherber möchte ich dafür danken, dass sie mein Studium ermöglicht hat. Horst Kanthak und ihr möchte ich auch dafür danken, dass ich mir jederzeit ihrer Hilfe und Unterstützung bei meinen Plänen und Wünschen sicher sein kann.



### **7.5 Eidesstattliche Erklärung**

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt, und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe. Ferner versichere ich, dass ich die Dissertation bisher nicht einem Fachvertreter an einer anderen Hochschule zur Überprüfung vorgelegt oder mich anderweitig um Zulassung zur Promotion beworben habe.

Unterschrift:.....