

Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin

Aus dem Institut für Humangenetik

Direktor Professor Dr. med. Andreas Gal

**Mutationsanalyse des *FOXP1*-Gens bei Patienten mit geistiger
Behinderung und verschiedenen Gehirnfehlbildungen**

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Max Flindt
aus Hamburg

Hamburg 2011

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am 06.06.2012:

Veröffentlicht mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Professor Doktor Kerstin Kutsche

Prüfungsausschuss: 2. Gutachter: Professor Doktor Guido Sauter

Prüfungsausschuss: 3. Gutachtein: Professor Doktor Gabriele Rune

I.	Ziel der Arbeit	1
II.	Einleitung	2
1.	Strategien zur Identifizierung menschlicher Krankheitsgene	2
1.1	Eine <i>de novo</i> 2;14-Translokation bei einer Patientin mit Mikrozephalie, mentaler Retardierung und verschiedenen Gehirnfehlbildungen	2
2.	Das <i>FOXG1</i>-Gen und humane Erkrankungen	4
2.1	Expression und Funktion des FOXG1-Proteins	4
2.2	Mutationen im <i>FOXG1</i> -Gen führen zu einer kongenitalen Variante des Rett-Syndroms	6
3.	Klinik und Genetik des Rett-Syndroms	7
III.	Material und Methoden	9
1.	Patientenkollektiv und DNA	9
2.	Chemikalien und Lösungsmittel	9
3.	Puffer und Lösungen	10
3.1	Puffer für die PCR-Amplifikation	10
3.2	Puffer und Lösungen für die Agarosegel-Elektrophorese	10
3.3	Lösungen für die SSCP-Gelanalyse	10
3.4	Allgemeine Puffer	11
4.	Enzyme und Kits	11
5.	Oligonukleotide	11
6.	Gerätschaften	12
7.	Computerprogramme und Datenbanken	13

8.	Genomweite DNA-Amplifikation	13
9.	Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)	14
9.1	Allgemeines Prinzip	14
9.2	PCR-Ansatz und Programm	15
10.	Agarosegelelektrophorese	16
10.1	Prinzip	16
10.2	Herstellung eines Agarosegels, Durchführung der Elektrophorese und Auswertung des Agarosegels	17
10.3	Aufreinigung der PCR-Produkte	17
11.	DNA-Sequenzanalyse	18
12.	<i>Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse</i>	19
12.1	Prinzip	19
12.2	Heteroduplizes	21
13.	Mikrosatellitenanalyse zum Nachweis der Elternschaft	21
IV.	Ergebnisse	23
1.	Mutationsanalyse des <i>FOXG1</i>-Gens bei Patienten mit verschiedenen Gehirnfehlbildungen	23
1.1	Vorbemerkungen	23
1.2	PCR-Amplifikation des <i>FOXG1</i> -Gens und anschließende direkte Sequenzanalyse	23
2.	Mutationsanalyse des <i>FOXG1</i>-Gens bei Patienten mit Rett-Syndrom	28
2.1	Vorbemerkungen	28
2.2	PCR-Amplifikation des <i>FOXG1</i> -Gens und anschließende direkte Sequenzanalyse	28
3.	SSCP-Analysen zum Nachweis von möglichen seltenen Sequenzvarianten im <i>FOXG1</i>-Gen	31

V.	Diskussion	35
1.	Zwei Mutationen im <i>FOXG1</i>-Gen, die zur Leserasterverschiebung führen, bei drei Patienten mit einem dem Rett-Syndrom ähnlichen Phänotyp	35
2.	Das klinische Bild von Patienten mit <i>FOXG1</i>-Mutationen	36
3.	Vergleich des klinischen Bildes von Patienten mit einer Mutation im <i>FOXG1</i>-Gen mit dem Phänotyp des Rett-Syndroms	39
VI.	Zusammenfassung	40
VII.	Literaturverzeichnis	42
VIII.	Danksagung	45
IX.	Eidesstattliche Versicherung	46

I. Ziel der Arbeit

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche wurde eine Patientin mit einer balanciert erscheinenden *de novo* 2;14-Translokation [46,XX,t(2;14)(q11.2;q12)], die klinisch durch postnatale Mikrozephalie, geistige Retardierung und gastroösophagealen Reflux auffiel, untersucht. Das MRT zeigte frontal betont eine milde Pachygyrie, einen in diesem Bereich leicht verdickten Cortex und ein dünnes und wenig geformtes Corpus callosum. Durch Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung wurde der Translokationsbruchpunkt auf dem Chromosom 14 ~265 Kb stromabwärts vom *FOXG1*-Gen lokalisiert, woraufhin vermutet wurde, dass die Expression von *FOXG1* bei der Translokationspatientin durch einen Positionseffekt verändert sein könnte.

Das *FOXG1*-Gen kodiert für einen *winged helix*-Transkriptionsfaktor der *forkhead*-Proteinfamilie, der sehr spezifisch im Gehirn exprimiert wird und frühe Schritte der kortikalen Entwicklung reguliert. Durch eine Mutationsanalyse des *FOXG1*-Gens bei 36 Patienten mit geistiger Retardierung, Mikrozephalie und Pachygyrie wurde bei einer Patientin eine heterozygote *de novo* Missense-Mutation, c.757A>G (p.N253D), identifiziert. Das klinische Bild dieser Patientin LIS1 ist mit dem der Translokationspatientin vergleichbar.

In der Literatur wurden heterozygote Funktionsverlustmutationen in *FOXG1* bei zwei Patientinnen mit einem zum Rett-Syndrom ähnlichen Phänotyp (der kongenitalen Variante des Rett-Syndroms) beschrieben (Ariani et al., 2008).

Das Rett-Syndrom kommt in der Regel bei Mädchen vor und ist gekennzeichnet durch eine zunächst normale geistige und psychomotorische Entwicklung. Ab dem 7. Lebensmonat verlieren die Kinder bereits erworbene Fähigkeiten. Klinisch imponiert dies u.a. durch den Verlust der Sprache, Handstereotypien, geistige Retardierung, Mikrozephalie, epileptische Anfälle und gastroösophagealen Reflux.

Um das phänotypische Spektrum, welches mit *FOXG1*-Mutationen einhergeht, näher zu charakterisieren, wurde im Rahmen dieser Arbeit nach Mutationen im *FOXG1*-Gen bei 152 Patienten mit einer geistigen Behinderung, bestimmten Gehirnauffälligkeiten und/oder einem zum Rett-Syndrom ähnlichen klinischen Bild gesucht.

II. Einleitung

1. Strategien zur Identifizierung menschlicher Krankheitsgene

Die Identifizierung von Krankheitsgenen ist in der Humangenetik von großer Bedeutung. Erst für 2603 Erkrankungen mit einem Mendel'schen Erbgang konnte bisher eine genetische Ursache festgestellt werden. Dagegen ist die genetische Veränderung bei 1784 Erkrankungen mit einem Mendel'schen Erbgang und 2022 Erkrankungen, bei denen ein Mendel'scher Erbgang vermutet wird, noch unbekannt (*OMIM*, Stand Oktober 2009).

Da nicht alle etwa 25.000 menschlichen Gene bei der Suche nach der Ursache für einen bestimmten Krankheitsphänotyp auf mögliche Mutationen überprüft werden können, wird auf bestimmte Hilfsmittel zur Identifizierung entsprechender Kandidatengene zurückgegriffen.

Einen besonderen Stellenwert nehmen hierbei chromosomale Rearrangements, z.B. reziproke Translokationen, ein. Diese können einerseits dazu führen, dass ein Gen direkt unterbrochen wird, andererseits dazu, dass die Expression eines Gens durch einen so genannten Positionseffekt beeinflusst wird. Bei einem Positionseffekt kann durch eine Veränderung der chromosomalen Umgebung die zeitliche und örtliche Genexpression beeinflusst werden (Kleinjan et al., 1998; 2005). Zur Kartierung und Eingrenzung der Bruchpunktregionen wird die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) eingesetzt. Mit Hilfe von Datenbankrecherchen kann in den Bruchpunktregionen nach möglichen Kandidatengenen für den Phänotyp des Translokationspatienten gesucht werden. Patienten mit demselben bzw. einem zum Translokationspatienten ähnlichen Krankheitsphänotyp werden dann auf Mutationen in den Kandidatengenen untersucht. Pathogene Mutationen in einem dieser Gene beweisen das Kandidatengen als Krankheitsgen (Read und Strachan, 1999). Die molekulare Ursache vieler monogener Erkrankungen konnte auf diese Weise identifiziert werden. Beispiele hierfür sind das *PAX6*-Gen für die Aniridie (MIM 106210; Jordan et al., 1992) und das *FBN1*-Gen für die Synpolydaktylie (MIM 608180; Debeer et al., 1998).

1.1 Eine *de novo* 2;14-Translokation bei einer Patientin mit Mikrozephalie, mentaler Retardierung und verschiedenen Gehirnfehlbildungen

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche wurde eine Patientin mit einer balancierten *de novo* 2;14-Translokation [46,XX,t(2;14)(q11.2;q12)] im Rahmen eines Forschungsprojektes untersucht. Klinisch fiel die Patientin durch eine postnatale

Mikrozephalie, eine schwere psychomotorische Retardierung, epileptische Anfälle und einen gastroösophagealen Reflux auf. Das MRT-Bild zeigte eine milde frontale Pachygyrie, einen vor allem frontotemporal links leicht verdickten Kortex sowie ein hypoplastisches Corpus callosum. Zur Kartierung der Bruchpunktregionen wurden FISH-Analysen durchgeführt. Dabei wurde ein Fosmidklon gefunden, der den Bruchpunkt in 14q12 überspannt und ihn auf etwa 35 Kb eingrenzte. Etwa 256 Kb proximal zur Bruchpunktregion liegt das *FOXG1*-Gen. Distal vom Bruchpunkt befinden sich Sequenzabschnitte, für die durch eine *in silico*-Analyse ein hohes regulatorisches Potential vorausgesagt wurde. Es wurde angenommen, dass diese Sequenzabschnitte Einfluss auf die Expression des *FOXG1*-Gens haben können. Weiter wurde angenommen, dass durch die Translokation dieser Sequenzelemente auf das Chromosom 2 deren Einfluss auf die Expression des *FOXG1*-Gens verloren ging, was den Phänotyp der Patientin bedingt. Die nachfolgende Abbildung verdeutlicht den Zusammenhang zwischen der Bruchpunktregion, den regulatorischen Elementen und *FOXG1*.

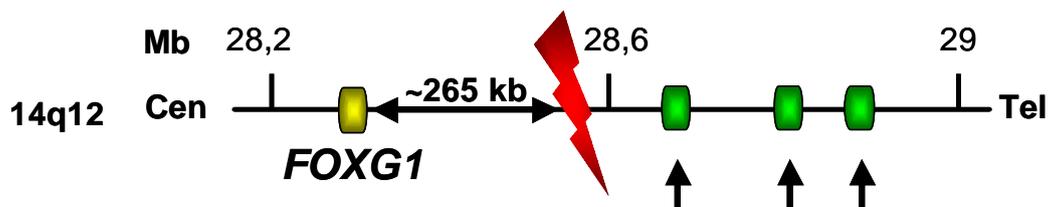


Abb. 1: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion in 14q12

Dargestellt ist ein Ausschnitt aus der chromosomalen Region 14q12. Die Bruchpunktregion der Translokationspatientin ist durch einen roten Blitz gekennzeichnet. Proximal in Richtung Centromer liegt das *FOXG1*-Gen (gelb) in einem Abstand von ca. 265 Kb. Distal befinden sich Sequenzabschnitte (grün, durch Pfeile markiert), die ein hohes regulatorisches Potential aufweisen. Diese können Einfluss auf die Expression des *FOXG1*-Gens haben. Cen: Centromer; Tel: Telomer, Mb: Megabasen.

Um zu verstehen, warum gerade *FOXG1* und nicht ein anderes Gen aus der Bruchpunktregion im Zusammenhang mit dem Phänotyp der Patientin diskutiert wird, ist es wichtig, die Expression und Funktion von *FOXG1* sowie Erkrankungen, die mit *FOXG1*-Mutationen assoziiert sind, vorzustellen.

2. Das *FOXG1*-Gen und humane Erkrankungen

2.1 Expression und Funktion des FOXG1-Proteins

FOXG1 ist ein *winged helix*-Transkriptionsfaktor (Li und Vogt, 1993) und gehört zur Familie der *forkheadbox*-Proteine (Murphy et al., 1994). Die Funktion von FOXG1 wurde vorwiegend an Mäusen aufgeklärt. *Foxg1* wird während der Gehirnentwicklung von Mäusen ausschließlich im telenzephalen Neuroepithelium sowie in der nasalen Hälfte der Retina und im Sehstrang exprimiert (Tao et al., 1992; Xuan et al., 1995). Die höchste Expression ist in sich schnell teilenden Zellen zu beobachten. Mäuse mit homozygoter *Foxg1*-Nullmutation sterben direkt nach der Geburt. Die Lungen entfalten sich nicht, was zu einem respiratorischen Ausfall führt, und die Masse der beiden Gehirnhemisphären bei neugeborenen *Foxg1*^{-/-} Mäusen ist um 95 Prozent reduziert, obwohl der Rest des Gehirns nicht betroffen erscheint. Erst ab dem zehnten Tag der embryonalen Entwicklung (E10,5) weisen die Mäuse eine deutlich verminderte Größe des ventralen Telenzephalons auf. FOXG1 scheint also bis dahin noch nicht entscheidend an der Gehirnentwicklung beteiligt zu sein. Zum Zeitpunkt E12,5 sind die telenzephalen Vesikel verkleinert und die eigentlich einheitliche und ebene Oberfläche erscheint irregulär, höckerig und verschieden dick. Ventrale Anteile sind stärker betroffen als dorsale (siehe Abb. 2). Weiterhin ist ein scharf abgegrenzter Verlust der Primordia der basalen Ganglia zu beobachten (Xuan et al., 1995; Dou et al., 1999).

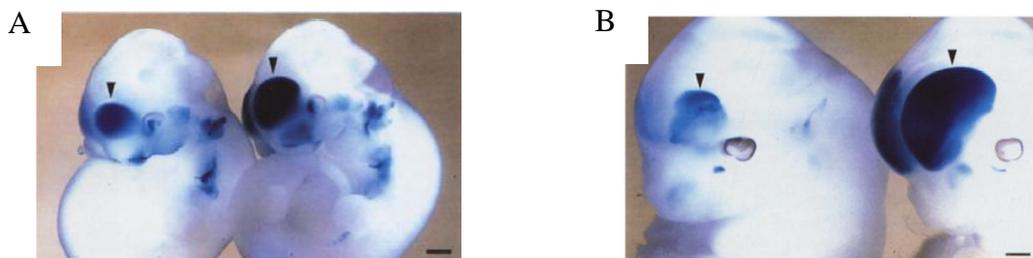


Abb. 2: Verminderte Größe des Telenzephalons bei *Foxg1*-Knockoutmäusen

Die Darstellung zeigt links jeweils ein Knockoutembryo^{-/-} und rechts ein Embryo mit einer heterozygoten *Foxg1*-Mutation^{+/-} zum Zeitpunkt E10,5 (A) und E12,5 (B). Durch die Expression von β -Galaktosidase, welches blau erscheint, wurden die Areale dargestellt, die *Foxg1* exprimieren. Es zeigte sich eine verminderte Größe des Telenzephalons (durch Pfeile markiert) bei der jeweiligen Mutante mit der homozygoten Mutation. Bei der Knockoutmutante (links im Bild B) ist eine unregelmäßige Oberfläche des Telenzephalons zu erkennen (Abbildungen aus Xuan et al., 1995).

Einleitung

Zusätzlich zur verminderten Größe des Telenzephalons wurde bei den Mäusen eine Reduktion der Proliferationsrate von Progenitorzellen sowie eine frühzeitige Differenzierung des kortikalen Neuroepithels festgestellt, was vermuten lässt, dass FOXG1 die Proliferation von Vorläuferzellen während der Entwicklung des Gehirns fördert und/oder deren Differenzierung hemmt (Xuan et al., 1995). FOXG1 hat also eine essentielle Bedeutung für das normale Wachstum und die Differenzierung des im Großhirn gelegenen Neuroepithels (Xuan et al., 1995; Dou et al., 1999; Yao et al., 2001).

Das FOXG1-Protein weist eine multiple Domänenstruktur auf. Am N-terminalen Ende befinden sich eine histidin-, eine prolin- und eine glycinreiche Region. Auf diese Regionen folgt die *forkhead*-Domäne, die eine zentrale Rolle bei der Interaktion mit der DNA spielt. Am C-terminalen Ende befinden sich zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen, die wichtig für die Interaktion mit Groucho-Proteinen und JARID1B sind (vgl. Abb. 3).

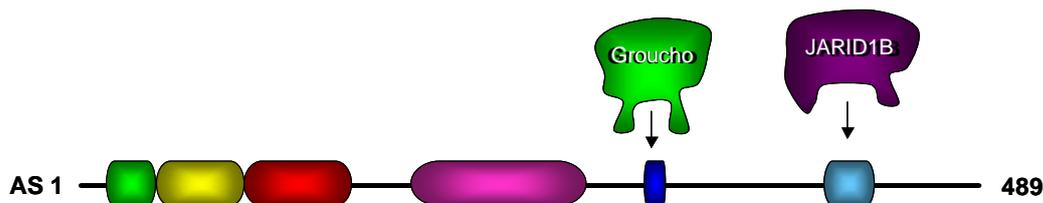


Abb. 3: Schematische Darstellung der Domänenstruktur von FOXG1

Am N-terminalen Ende befinden sich histidin- (grün), prolin- (gelb) und glycinreiche (rot) Regionen. Auf diese Regionen folgt die *forkhead*-Domäne (pink), welche bedeutsam für die Interaktion mit der DNA ist. Am C-terminalen Ende liegen zwei Protein-Protein-Interaktionsdomänen. Die erste Domäne (dunkelblau) interagiert mit Groucho/TLE und die zweite (hellblau) mit JARID1B. AS: Aminosäure.

Groucho/TLE-Proteine und JARID1B sind Transkriptionsrepressoren, die in Verbindung mit FOXG1 die Progenitorzellen vor einer frühzeitigen Ausdifferenzierung schützen können (Yao et al., 2001; Tan et al., 2003). Wäre FOXG1 während der Gehirnentwicklung nicht vorhanden, würden sich nahezu alle Progenitorzellen zu Cajal-Retzius-Zellen differenzieren (Hanashima et al., 2004). Neben der Fähigkeit mit Proteinen zu interagieren, kann FOXG1 als Transkriptionsrepressor die Expression bestimmter Gene beeinflussen. So kann FOXG1 z.B. durch den inhibierenden Einfluss auf die Expression von *Bmp4* und *Wnt* sowie den protegierenden Einfluss auf *Fgf* die Zellproliferation von telenzephalen Progenitorzellen fördern, wodurch das telenzepitale Wachstum angeregt wird (Dou et al., 1999; Hébert et al., 2008).

Somit reguliert FOXP1 die Gehirnentwicklung im Wesentlichen durch zwei Mechanismen. Zum einen kann es mit anderen Proteinen im Komplex wirken und so die frühe Zelldifferenzierung hemmen. Zum anderen kann es durch die Beeinflussung der Expression verschiedener Gene die Zellproliferation von neuronalen Progenitorzellen fördern. Das FOXP1-Protein hat also eine essentielle Bedeutung für die Gehirnentwicklung und stellt somit ein aussichtsreiches Kandidatengen für eine Mutationsanalyse bei Patienten mit Gehirnehlbildungen dar.

2.2 Mutationen im FOXP1-Gen führen zu einer kongenitalen Variante des Rett-Syndroms

Während die Bruchpunkte der 2;14-Translokation in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche feinkartiert wurden, veröffentlichten Ariani und Kollegen (2008) eine Arbeit über zwei Patientinnen mit Rett-Syndrom, bei denen Mutationen im FOXP1-Gen festgestellt wurden.

Ariani und Kollegen haben 2008 bei 53 Patienten mit einer kongenitalen Variante des Rett-Syndroms eine Mutationsanalyse durchgeführt, wobei die beiden heterozygoten *de novo*-Mutationen c.765G>A (p.W255X) und c.969delC (p.S323fsX325) gefunden wurden. Bei beiden Patientinnen verliefen Schwangerschaft und Geburt unauffällig, und die Geburtsmaße der Patientinnen waren normal. Im Alter von drei Monaten wurde bei beiden Patientinnen ein abnorm verkleinerter Kopfumfang festgestellt, sie begannen untröstlich zu weinen, konnten ihre Arme nicht heben und reagierten nicht, wenn sie gerufen wurden. Die ältere Patientin 1 konnte nie allein sitzen und lag permanent im Bett, wohingegen die jüngere Patientin 2 nur unsicher allein sitzen konnte. Seit dem ersten Lebensjahr hatten beide Patientinnen eine Apraxie, zeigten spastische Bewegungen der Oberlippe und Rett-typische stereotype Dyskinesien. Die Patientinnen lernten nie zu sprechen und waren psychomotorisch retardiert. Patientin 1 hatte ab dem Alter von 14 Jahren und Patientin 2 bereits ab 2½ Jahren generalisierte Krampfanfälle. Beide zeigten einen Rett-typischen EEG-Befund. In der cranialen Magnetresonanztomographie (cMRT) war eine Hypoplasie des Corpus callosum erkennbar. Insgesamt ist die beschriebene Klinik bei beiden FOXP1-mutationspositiven Patientinnen mit der Diagnose einer so genannten kongenitalen Form des Rett-Syndroms vereinbar (Ariani et al., 2008).

3. Klinik und Genetik des Rett-Syndroms

Das Rett-Syndrom ist eine fortschreitende Störung der neuronalen Entwicklung (Deidrick et al., 2005; Percy et al., 2005). Es tritt mit einer Inzidenz von 1:10.000 bis 1:15.000 auf und ist eine der häufigsten Ursachen für mentale Retardierung bei Mädchen (Deidrick et al., 2005; Matijevic et al., 2009). Das Rett-Syndrom ist gekennzeichnet durch eine scheinbar normale Entwicklung in den ersten 6 bis 18 Lebensmonaten, auf die eine Phase folgt, in der die Patienten vorher erlernte Sprachkenntnisse und motorische Fähigkeiten wieder verlernen. Typischerweise werden gezielte Handbewegungen durch stereotype händewaschende Bewegungen ersetzt. Weitere Merkmale sind eine postnatale Mikrozephalie, soziale Absonderung, Kommunikationsprobleme, eine kognitive Beeinträchtigung und eine Ataxie. Zusätzlich können Skelettdeformationen (Skoliose, Kyphose), eine verminderte Größe, Zähneknirschen, respiratorische Dysfunktionen, kalte untere Extremitäten, ein verschlechtertes Schlafverhalten sowie autistische Verhaltensweisen auftreten (Williamson et al., 2006). Im Verlauf stagniert die Regression, und einige Fähigkeiten können wiedererlernt werden. Die Patienten überleben meist bis ins Erwachsenenalter, sterben jedoch signifikant häufiger am plötzlichen Herztod (Sekul et al., 1994). Die Diagnose eines Rett-Syndroms erfolgt anhand der Klinik und ist in den Konsensuskriterien zur Diagnose des Rett-Syndroms festgelegt (Hagberg et al., 2002). Bei 80% der Patienten mit Rett-Syndrom konnte eine heterozygote Mutation im X-chromosomalen *MECP2*-Gen festgestellt werden. Die meisten Mutationen im *MECP2*-Gen liegen *de novo* vor (Matijevic et al., 2009). Je nach Mutationstyp, Lokalisation und X-Inaktivierungsmuster kommt es zu einer unterschiedlich starken Ausprägung des Phänotyps (Cheadle et al., 2000; Monros et al., 2001; Huppke et al., 2002; 2003).

Das Rett-Syndrom kann in unterschiedlichen Formen auftreten. Leonard und Bower (1998) beschrieben in einer retrospektiven Studie eine Variante des Rett-Syndroms, bei der die Patientinnen schon seit der Geburt eine auffällige Entwicklung oder ein ungewöhnliches Verhalten zeigten. Eine weitere Variante des Rett-Syndroms ist die Zappella-Variante, die auch *preserved speech variant* genannt wird. Sie zeichnet sich dadurch aus, dass die Probleme in der Sprachentwicklung sowie der Handmotorik teilweise reversibel sind (Zappella et al., 2001; De Bona et al., 2000).

Da nicht alle Patienten mit Rett-Syndrom eine Mutation in *MECP2* aufweisen, wurde angenommen, dass es noch andere Gene geben müsse, die, wenn sie mutiert sind, verantwortlich für die Ausbildung eines Rett-Syndroms sind. So konnten bei mehreren

MECP2-mutationsnegativen Patienten Mutationen im *CDKL5*-Gen identifiziert werden (Kalscheuer et al., 2003; Weaving et al., 2004; Tao et al., 2004; Scala et al., 2005). Die meisten dieser Patienten weisen eine atypische Variante mit frühen Krampfanfällen auf (Weaving et al., 2004).

III. Material und Methoden

1. Patientenkollektiv und DNA-Proben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden die DNAs von 71 Patienten mit verschiedenen Gehirnehlbildungen, die denen der Patientin LIS1 ähnelten, und 81 DNAs von Patienten mit Verdacht auf Rett-Syndrom auf Mutationen im *FOXG1*-Gen untersucht. Die Eltern der Patienten waren über Art und Ziel der Untersuchung aufgeklärt und die Teilnahme erfolgte freiwillig.

2. Chemikalien und Lösungsmittel

Chemikalien und Lösungsmittel	Hersteller
Agarose (Ultra Pure Agarose)	Invitrogen, Karlsruhe
Acrylamid 30% (mit 0,8% Bisacrylamid)	Roth, Karlsruhe
Ammoniumacetat	Merck, Darmstadt
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Borsäure	Merck, Darmstadt
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck, Darmstadt
Essigsäure 100%	Merck, Darmstadt
Ethanol	Baker, Deventer, NL
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt
Formaldehyd 37%	Merck, Darmstadt
Formamid	Qbiogene, Heidelberg
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Natriumacetat	Merck, Darmstadt
Natriumcarbonat	Merck, Darmstadt
Orange-G	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Salpetersäure 67%	Merck, Darmstadt
Silbernitrat	Merck, Darmstadt
Temed	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen
Wasser für Chromatographie (HPLC)	Merck, Darmstadt

3. Puffer und Lösungen

3.1 Puffer für die PCR-Amplifikation

10x PCR-Puffer	(genaue Konzentrationen vom Hersteller nicht angegeben)	15 mM MgCl ₂ Tris-HCl KCl (NH ₄) ₂ SO ₄ pH 8,7	(QIAGEN, Hilden)
Fail Safe PCR PreMix G		100 mM Tris-HCl (pH 8,3) 100 mM KCl 400 µM eines jeden dNTPs 3-7 mM MgCl ₂ 0-8X Fail Safe PCR-Enhancer (mit Betain), Epicenter (Madison, WI, USA)	
Nukleotidmix (dNTPs)		10 mM	(Invitrogen, Karlsruhe)

3.2 Puffer und Lösungen für die Agarosegel-Elektrophorese

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

3.3 Lösungen für die SSCP-Gelanalyse

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

3.4 Allgemeine Puffer

10x TE	100 mM Tris-HCL 10 mM EDTA pH 8
Ladepuffer für DNA-Sequenzreaktionen	25 mM EDTA 50 mg/ml Dextranblau } pH 8 eine Einheit der Dextranblau/EDTA-Lösung gemischt mit 5 Einheiten Formamid
APS, Ammoniumpersulfat	1 g /10 ml Aqua dest

4. Enzyme und Kits

Enzyme und Kits	Hersteller
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
DNA-Standard (100 Bp-Leiter)	Invitrogen, Karlsruhe
ExoSAP-IT	USB Corporation, Cleveland, OH, USA
GenomiPhi™ DNA Amplification Kit	GE Healthcare, Freiburg
Taq-DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe bzw. QIAGEN, Hilden

5. Oligonukleotide

Die Oligonukleotide (Primer) wurden manuell entworfen, wobei darauf geachtet wurde, dass sie einen GC-Gehalt von etwa 50% aufweisen und eine Guanin- bzw. Cytosinbase am 3'-Ende der Primersequenz vorliegt. Die Sequenz wurde so gewählt, dass kein *single nucleotide polymorphism* (SNP), der eine allelspezifische Amplifikation verursachen könnte, vorhanden ist.

Zur Überprüfung der Primer-Spezifität wurden BLAST-Analysen und/oder *in-silico*-PCR-Analysen (<http://genome.ucsc.edu>) durchgeführt. Oligonukleotideigenschaften, wie Neigung zur Bildung von Primerdimeren und Sekundärstrukturen, wurden genauso wie die beste Schmelztemperatur der Primer mit dem Programm „Oligo Calculator“ optimiert. Damit eine Konzentration von 100 pmol/µl entsteht, wurden die Primer in 1x TE gelöst. Danach wurden Aliquots dieser Stammlösungen auf 10 pmol/µl mit HPLC-H₂O verdünnt, welche schließlich zur PCR-Amplifikation verwendet wurden. Für diese Arbeit wurden die Oligonukleotide

ausschließlich von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Die nachfolgende Tabelle zeigt die in dieser Arbeit verwendeten Primer. Dabei sind die Primersequenzen, welche nicht im kodierenden Teil des Exons liegen, in Kleinbuchstaben und diejenigen, die im kodierenden Teil des Exons liegen, in Großbuchstaben dargestellt.

Vorwärtsprimer in 5' → 3'-Orientierung		Rückwärtsprimer in 5' → 3'-Orientierung	
<i>FOXG1</i>		<i>FOXG1</i>	
1F	ctacatgacttgccagcgccccgag	1R	GCCCTGGACGGGGCTAAAGCGGACG
2F	GTCCAGAACGACAACCACCA	2R	CAACGGCATCTACGAGTTCATCATG
3F	GAGAAGAAGAACGGCAAGTACGAG	3R	CAGCTCCGTGTTGACTCAGAACTC
4F	TCGAGCGACGACGTGTTTCATC	4R	GACTTCGCAGAGCAGCACGTCCAT
5F	AGATCCCGTACGCCACGCAC	5R	ggtgcaatgtggggagaataca
6F	gaccagactgtaagtgaacg	6R	cgattgccttcagtttggtgtg
2f3	CGCCCTGGACGGGGCTAAAGCG		

Die Sequenzabschnitte, welche die 27-Bp-Duplikation von Patient LIS146 und die 6 Bp-Duplikation von Patient LIS109 enthielten, waren sehr lang. Daher wurde zur genaueren Darstellung im SSCP-Gel ein PCR-Produkt mit dem Vorwärtsprimer von Amplikon 2 (2F) und dem Rückwärtsprimer von Amplikon 1 (1R) generiert, wobei die PCR-Bedingungen von Amplikon 2 verwendet wurden.

Für die Mutationen c.460dupG (p.Glu154GlyfsX301) und c.505_506delGGinsT (p.Gly168SerfsX23) der Patienten LIS46, LIS151 und LIS127 wurde ein PCR-Produkt mit einem neuen Vorwärtsprimer (2f3) und dem Rückwärtsprimer von Amplikon 2 (2R) hergestellt.

6. Gerätschaften

Geräte	Hersteller
ABI Prism DNA Sequenziergerät 3130	PE Applied Biosystems, Weiterstadt
Digitalkamera	OLYMPUS, Hamburg
Drucker Digital Graphic Printer	SONY, Japan
Einschweißgerät	Vacupack plus, Krups
Eismaschine	Ziegra, Isernhagen
Eppendorf 5417R Kühlzentrifuge	Eppendorf, Hamburg
Gelelektrophoresekammer	BioRad, München
Gelelektrophoresekammer für SSCP	Invitrogen, Karlsruhe
Kunststoff-Tubes (Falcon)	Becton Dickinson GmbH, Heidelberg
Heizblock Typ 52526101	Liebisch, Bielefeld

Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik, Staufen i. Br.
PCR-Cycler MJ Research PTC 200	MJ Research, Inc., Watertown, USA
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH, Oldenburg
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences, Fernwald
Pipetten Finnpipetten	Thermo Labsystems, Helsinki, Finnland
Spannungsgeber Power Pac 300	BioRad, München
Tischzentrifuge Biofuge Pico	Heraeus, Hannover
UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab, Wiesloch
Vortex-Gerät Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000	Scientific Industries, INC., Bohemia, New York, USA
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus, Hannover

7. Computerprogramme und Datenbanken

Computerprogramme/ Datenbanken	Anwendung
Chromas Lite 2.01	Editieren der Sequenz in DNA-Sequenzchromatogrammen
DIGI CAM Digital Camera Control	Dokumentation von Agarosegelen
EditSeq (Dnastar)	Editieren von DNA-Sequenzen
Ensembl	Vergleich der Sequenzen mit der SNP-Datenbank
MapDraw (Dnastar)	Ermittlung von Restriktionsschnittstellen in DNA-Sequenzen sowie Ermittlung der abgeleiteten Aminosäuresequenz einer cDNA-Sequenz
NCBI (Human Genome Resources)	Homologievergleiche von DNA-Sequenzen (BLAST), Vergleich der Sequenzen mit der SNP-Datenbank, Literaturrecherche
VISTA Enhancer browser	Ermittlung von möglichen regulatorischen Elementen
SeqPilot	Auswertung der Sequenzen und Auffinden von Mutationen
SpliceView, NetGene und BDGP	Ermittlung des Einflusses von Mutationen auf die Stärke von Spleißdonor- und Spleißakzeptorstellen

8. Genomweite DNA-Amplifikation

Da bei einigen Patienten nur sehr wenig DNA zur Mutationsanalyse vorlag, wurde in diesen Fällen die gesamte genomische DNA vervielfältigt. Mit Hilfe des „GenomiPhi V2 DNA Amplification Kits“ konnten aus 10 ng eingesetzter DNA 4-7 µg DNA pro 20 µl Reaktionsansatz entstehen. Die in diesem Kit eingesetzte Phi29-DNA-Polymerase hat sowohl eine 3'→5'-Exonuklease-Aktivität als auch eine *strand displacement*-Aktivität, so dass die

synthetisierten DNA-Stränge noch einmal als Matrize für weitere Amplifikationen verwendet werden können und Temperaturzyklen nicht notwendig sind.

Zur Amplifikation wurden zunächst 1 µl (1-10 ng) der zu vervielfältigenden DNA in einem Probenpuffer bei 95°C denaturiert. Danach wurde ein Reaktionspuffer zugesetzt, der Random-Hexanukleotide, dNTPs und Puffer enthielt. Im Anschluss daran wurde 1 µl der Phi29-DNA-Polymerase zugegeben. Zum Inkubieren wurde der gesamte Ansatz für 1,5 Stunden auf 30°C gestellt. Anschließend wurde die Polymerase für 10 min bei 65°C inaktiviert.

9. Amplifikation spezifischer DNA-Sequenzen mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die Polymerasekettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist eine Methode zur *in vitro*-Amplifikation von DNA-Fragmenten. Ein bestimmter Abschnitt kann aus genomischer DNA vervielfältigt werden, indem spezifische Oligonukleotide (Primer) eingesetzt werden, die diesen flankieren (Mullis et al., 1987). Die bei der PCR-Amplifikation verwendete *Taq*-Polymerase ist ein thermostabiles Enzym, welches aus dem Bakterium *Thermophilus aquaticus* isoliert wird.

9.1 Allgemeines Prinzip

Die PCR-Methode basiert auf der Durchführung repetitiver Reaktionszyklen bei bestimmten Temperaturen. Jeder Reaktionszyklus besteht in der Regel aus drei Einzelreaktionen:

1. Hitzedenaturierung bei 94°C bis 96°C

Die Doppelstrang-DNA wird in Einzelstränge getrennt.

2. Annealing bei 45°C bis 70°C

Die eingesetzten Oligonukleotide hybridisieren an die DNA-Einzelstränge. Die optimale Temperatur hängt von den Schmelztemperaturen der Primer ab.

3. Elongation bei 72°C

Durch die *Taq*-DNA-Polymerase kommt es zur Synthese der neuen DNA-Stränge. Der DNA-Einzelstrang dient als Matrize, an welcher der neue Strang revers-komplementär aus Desoxynukleotid-Triphosphat-Bausteinen erstellt wird. Die Primer fungieren dabei als Startpunkt. Die Elongationszeit richtet sich nach der Länge des zu synthetisierenden Amplikons, wobei die Polymerase 500-1000 Bp pro Minute polymerisieren kann.

Nach der Elongation ist ein Reaktionszyklus abgeschlossen. Der nächste Reaktionszyklus beginnt erneut mit der Denaturierung. Diesem Zyklus dient nun auch das neu synthetisierte DNA-Stück als Matrize. Die Amplifikation erfolgt exponentiell, so dass in 30 bis 40 Zyklen eine Vermehrung des entsprechenden DNA-Fragments um den Faktor 10^6 erreicht werden kann. Zur Erhöhung der Spezifität der entstehenden Produkte werden so genannte *touchdown*-PCR-Reaktionen durchgeführt. Hierbei wird die Annealingtemperatur der Primer schrittweise zweimal um 2°C erniedrigt. Wenn z.B. für drei Zyklen mit einer Annealingtemperatur von 58°C begonnen wird, so haben die nächsten vier Zyklen eine Annealingtemperatur von 56°C und die darauffolgenden 29 Zyklen eine Temperatur von 54°C .

9.2 PCR-Ansatz und Programme

Der während dieser Arbeit verwendete 25 μl -Ansatz für eine Standard-PCR sah wie folgt aus:

1 μl	DNA (~100 ng)
0,5 μl	Primer 1 (10 pmol/ μl)
0,5 μl	Primer 2 (10 pmol/ μl)
0,5 μl	dNTPs (10 mM)
2,5 μl	PCR-Puffer (10x)
0,1 μl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/ μl)
19,9 μl	H ₂ O
<hr/>	
25 μl	Ansatz

Durch Verwendung von Kontroll-DNAs wurden die jeweiligen spezifischen PCR-Bedingungen für jedes Amplikon ermittelt. Generell wurde die *touchdown*-PCR durchgeführt:

95°C	5 min	
95°C	15 sec	} 3 Zyklen
65-54°C	10 sec	
72°C	35 sec	
95°C	15 sec	} 3 Zyklen
63-52°C	10 sec	
72°C	35 sec	
95°C	15 sec	} 30 Zyklen
61-50°C	10 sec	
72°C	35 sec	
72°C	4 min	

Die PCR-Bedingungen variierten je nach verwendetem Primerpaar. In der nachfolgenden Tabelle wird ein Überblick über die PCR-Bedingungen der einzelnen Amplikons des untersuchten Gens gegeben.

Amplikon	Größe des Amplikons	PCR-Bedingung
Amplikon 1	546 Bp	58°C→56°C→54°C
Amplikon 2	545 Bp	58°C→56°C→54°C
Amplikon 3	530 Bp	60°C→58°C→56°C
Amplikon 4	524 Bp	60°C→58°C→56°C
Amplikon 5	551 Bp	65°C→63°C→61°C
Amplikon 6	652 Bp	54°C→52°C→50°C

Da die DNA-Fragmente Amplikon 1 und 2 einen hohen GC-Gehalt oder Sekundärstrukturen aufwiesen, waren diese besonders schwer zu amplifizieren. Daher wurde bei diesen der FailSafe PCR-PreMix G verwendet.

10. Agarosegelelektrophorese

10.1 Prinzip

Zur Auftrennung und Überprüfung der PCR-Produkte auf Qualität und Quantität wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Die Laufstrecke eines Fragments im Gel ist dabei umgekehrt proportional zu dem Logarithmus seines Molekulargewichts. Kleine Fragmente wandern also schneller im elektrischen Feld durch die Poren des Gels als große. Die negativ geladene DNA läuft vom negativen zum positiven Pol. Die Agarosegelelektrophorese ermöglicht die Auftrennung von Fragmenten mit einer Größe unter ~20 Kb, wobei kleinere Fragmente präziser in hochprozentigen Gelen und größere Fragmente präziser in Gelen mit weniger Agarose dargestellt werden können.

10.2 Herstellung eines Agarosegels, Durchführung der Elektrophorese und Auswertung des Agarosegels

Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels wurden zunächst 4 g Agarose in 200 ml 1x TBE aufgeköcht. Nachdem die Agaroselösung auf ca. 60°C abgekühlt war, wurde sie in einen mit Kämmen bestückten Gelschlitten gegossen. Hier kühlte die Agarose weiter ab und polymerisierte aus. Nach ca. 30 min wurden die Kämmen entfernt, so dass Geltaschen entstanden. Der Gelschlitten wurde in der Elektrophoresekammer positioniert und mit 1x TBE überschichtet. Je 5 µl der zu beurteilenden PCR-Produkte wurden mit dem Ladepuffer vermischt und in die Geltaschen pipettiert. Die Gelelektrophorese wurde im Anschluss etwa 30 Minuten bei ca. 160 mV durchgeführt. Danach wurde das Gel für ca. 15 min in Ethidiumbromid gefärbt. Ethidiumbromid interkalierte zwischen die DNA-Basen und fluoreszierte rötlich, wenn es mit ultraviolettem Licht bestrahlt wurde. Das Ergebnis wurde fotodokumentiert. Eine auf das Gel aufgetragene 100 Bp-Leiter (Standardfragmente mit bekannter Molekülmasse) ermöglichte den Vergleich mit der Größe der zu analysierenden PCR-Produkte.

10.3 Aufreinigung der PCR-Produkte

Bevor die DNAs sequenziert wurden, waren die PCR-Produkte zunächst mit dem Enzymmix ExoSAP-IT[®] aufgereinigt worden. Der Mix besteht aus der Exonuklease I und der Shrimp Alkali-Phosphatase und wird zum Entfernen von einzelsträngiger DNA (Primern) verwendet. Im nachfolgenden ist der ExoSAP-Ansatz dargestellt.

2,500 µl	PCR-Produkt
~ 0,375 µl	ExoSAP-IT
4,125 µl	HPLC-H ₂ O
<hr/>	
7,000 µl	Gesamtvolumen

Der ExoSAP-Ansatz wurde im PTC-200 Thermocycler erst für 15 min bei 37°C und dann zur Enzymaktivierung für 15 min bei 80°C erhitzt.

11. DNA-Sequenzanalyse

Bei der DNA-Sequenzanalyse kann die Basenfolge einer DNA durch enzymatische Herstellung von definierten DNA-Fragmenten ermittelt werden. Als Enzym zur Synthese der neuen DNA wird eine thermostabile Polymerase verwendet, welche die einzelsträngige Ausgangs-DNA als Matrize verwendet (Sanger et al., 1977). Als DNA-Bausteine werden zusätzlich zu normalen Nukleotidbausteinen noch Didesoxynukleotide (ddNTPs) verwendet. ddNTPs unterscheiden sich von den normalen dNTPs ausschließlich dadurch, dass ihnen am 2'-Kohlenstoff und am 3'-Kohlenstoff eine Hydroxylgruppe fehlt. Da die 3'-Hydroxylgruppe jedoch wichtig ist, um eine Phosphodiesterbindung zur nächsten Base zu bilden, kommt es, wenn solch ein ddNTP in die neue DNA eingebaut wird, zum Kettenabbruch. Der Einbau eines ddNTPs geschieht rein zufällig, weshalb die entstehenden DNA-Fragmente unterschiedlich lang sind. Die zyklische Sequenzierung selbst besteht aus drei aufeinanderfolgenden Schritten: Denaturierung, Annealing und Elongation (Kretz et al., 1994). Da nur ein Primer benutzt wird, steigt die Menge des Produktes im Gegensatz zur PCR nicht exponentiell, sondern linear an. Für jede Base wird ein ddNTP verwendet, welches eine Fluoreszenzgruppe aufweist. Durch den zufälligen Einbau einer dieser Basen kommt es zum Kettenabbruch und es liegen unterschiedlich lange DNA-Fragmente vor, deren letzte Base nach Anregung fluoresziert. Diese DNA-Fragmente werden dann elektrophoretisch aufgetrennt. Dabei ist ein Laserstrahl feststehend auf eine Stelle gerichtet. Während die markierten DNA-Fragmente diese Stelle passieren, regt der Laser die fluoreszenzmarkierten ddNTPs an. Jeder der Farbstoffe hat sein Fluoreszenzmaximum bei einer unterschiedlichen Wellenlänge. Durch eine elektronische Messung der Fluoreszenzmaxima und eine anschließende Computerverarbeitung der Signale wird ein Chromatogramm erstellt.

Die verwendete Sequenzierungsreaktion ist im Folgenden dargestellt.

3,5 µl	ExoSAP-Produkt
0,5 µl	Primer Fwd oder Rev (10 pmol/µl)
0,5 µl	BigDye Mix
2,0 µl	BigDye Terminatorpuffer (5x)
3,5 µl	HPLC-H ₂ O
<hr/>	
10 µl	Gesamtvolumen

Für die DNA-Sequenzierungsreaktion wurde im Thermocycler das folgende Programm durchgeführt:

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

Um nicht eingebaute dNTPs und ddNTPs zu entfernen, wurde nach der Sequenzierreaktion eine Aufreinigung des Sequenzierprodukts durch eine Natriumacetat-(NaAc)-Fällung durchgeführt.

10 µl	Sequenzierungsprodukt
40 µl	ddH ₂ O
5 µl	3 M Natriumacetat
125 µl	100% Ethanol

Der Ansatz wurde kurz gevortext und für 20 min bei 13000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. 250 µl 70%-iger Ethanol wurde hinzugegeben und erneut kurz gevortext. Daraufhin wurde für 5 min bei 13000 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet bei 37°C getrocknet.

Danach wurde das Pellet in 3 µl Ladepuffer bei 37°C für 15 min gelöst und anschließend eine Minute bei 90°C denaturiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt und später auf das Sequenziergerät geladen, um sie aufzutrennen.

12. *Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP)-Analyse*

12.1 Prinzip

Die SSCP-Methode beruht auf Unterschieden im Laufverhalten einzelsträngiger DNA-Moleküle, die in einem oder mehreren Nukleotiden differieren und sich daher in ihrer Sekundärstruktur unterscheiden (Orita et al., 1989). Die denaturierten PCR-Produkte (Einzelstrang-DNAs) des gleichen Genortes (gleiches Amplikon) der jeweiligen Patienten werden zusammen mit den denaturierten PCR-Produkten von Kontrollpersonen auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen. Durch Anlegen einer konstanten Spannung werden diese elektrophoretisch aufgetrennt. In der einzelsträngigen DNA kommt es zu einer intramolekularen Basenpaarung, die während der Elektrophorese zu einer stabilen Konformationen führt. Die unterschiedlichen Konformationen der DNA-Einzelstränge führen zu einem spezifischen Laufverhalten und zeigen sich später als DNA-Banden auf dem Polyacrylamidgel. Durch die richtig gewählte Größe des SSCP-Gels und der PCR-Produkte können die Einzelstrangbanden (im oberen Teil des Gels) und die Heteroduplexformationen (im unteren Teil des Gels) sichtbar gemacht werden. Die Einzelstrangformationen laufen

Material und Methoden

wesentlich langsamer, besonders, wenn das Gel Glycerin enthält. Die möglichen Konformationen sind abhängig von der Nukleotidsequenz. Die SSCP-Methode ist sehr sensitiv, so kann bereits eine Basensubstitution durch ein verändertes Bandenmuster im Gel auffallen.

Für die Auftrennung der DNA-Fragmente in der SSCP-Analyse wurde in dieser Arbeit ein nicht-denaturierendes Polyacrylamidgel verwendet. Nachfolgend wird die Zusammensetzung des Gels beschrieben.

	<u>PAA-Gel (8%)</u>
ddH ₂ O	80 ml
Acrylamid/Bisacrylamid (30%)	33,0 ml
10 x TBE	12,5 ml
10% APS	1,0 ml
Temed	24,0 µl

5 bis 10 µl des PCR-Produktes wurden mit 5 µl SSCP-Ladepuffer gemischt und 10 min bei 95°C denaturiert, danach auf Eis gestellt und auf das PAA-Gel geladen. Über Nacht erfolgte die Elektrophorese in 1x TBE Puffer bei 5 bis 9 Watt (W). Um die einzel- und doppelsträngigen Banden sichtbar zu machen, wurden die PAA-Gele wie folgt behandelt:

Zur Fixierung des Gels wurde es zunächst für 5-10 min in 10%-igem Ethanol geschwenkt. Danach wurde es zur besseren Silbernitrat Aufnahme 3 min in 1%-iger Salpetersäure geschwenkt. Nach zweimaliger Spülung mit frischem Wasser wurde es für 20 min in Silbernitratlösung geschwenkt und erneut zweimal mit frischem Wasser gewaschen. Daraufhin wurde das Gel so lange in Entwicklerlösung (Reducer) geschwenkt, bis das Silbernitrat ausfiel. Die Reducerlösung wurde abgesaugt und frische wurde nachgefüllt. Jetzt wurde das Gel so lange in der frischen Entwicklerlösung geschwenkt, bis die einzel- und doppelsträngigen Banden sichtbar wurden. Um die Reaktion zu stoppen, wurde das Gel für 2 min in 10%-iger Essigsäure geschwenkt. Anschließend wurde das Gel mit Wasser gewaschen und in Plastikfolie eingeschweißt.

12.2 Heteroduplizes

Ein Großteil der durch Mutationen verursachten Änderungen in der Sekundärstruktur kann durch die oben beschriebene SSCP-Gelanalyse dargestellt werden. Mutationen, die jedoch keine Veränderung in der Sekundärstruktur bewirken, bleiben unentdeckt. Durch fehlgepaarte Basen, die bei der Hybridisierung der komplementären Stränge von mutiertem mit Wildtypallel auftreten, können Heteroduplexstränge entstehen. Da die Heteroduplexstränge eine geringere elektrophoretische Beweglichkeit als Homoduplexstränge haben, können bei ausreichender Gelgröße langsamer wandernde Banden nachgewiesen werden. Wenn ein Einzelstrangshift also nicht prominent ist, kann eine Heteroduplexanalyse dazu beitragen, Mutationen zu detektieren. In dieser Arbeit wurde eine Kombination aus SSCP-Analyse und Heteroduplexanalyse auf dem gleichen Gel durchgeführt.

13. Mikrosatellitenanalyse zum Nachweis der Elternschaft

Um eine mögliche Elternschaft zu bestätigen, wurde eine Mikrosatellitenanalyse durchgeführt. Mikrosatelliten sind polymorphe Nukleotidrepeats, die unterschiedlich lang sein können. Durch die Analyse der Vererbung der Nukleotidrepeats kann eine Elternschaft sowohl bewiesen als auch ausgeschlossen werden. Für eine Mikrosatellitenanalyse wurden PCRs an der genomischen DNA des Kindes und der Eltern mit verschiedenen Mikrosatellitenmarkern durchgeführt. Die PCR-Bedingungen hierfür sind dieselben wie bei einer *touchdown*-PCR mit einer Anfangstemperatur von 58°C.

Der Ansatz für eine Mikrosatelliten-PCR wird im Folgenden dargestellt.

1 µl	DNA
2,5 µl	10x PCR-Puffer
1 µl	Primer-Mix
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	<i>Taq</i> -Polymerase
19,8 µl	HPLC-H ₂ O
<hr/>	
25 µl	Gesamtvolumen

Die PCR-Produkte wurden durch eine Agarosegelelektrophorese auf Quantität und Qualität überprüft. Je nach Mikrosatellitenmarker wurden dann 0,5 bis 1 µl PCR-Produkt mit 20 µl deionisiertem Formamid und 0,4 µl Standard (TAMRA oder ROX) vermischt, für 5 Minuten bei 95° C denaturiert und auf Eis gestellt. Dieser Ansatz wurde durch eine computergestützte

Material und Methoden

Analyse mit Hilfe des ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer und der GeneScan Software ausgewertet.

Nachfolgend werden die Mikrosatellitenmarker aufgelistet, die in dieser Arbeit verwendet wurden.

Mikrosatellitenmarker	Mikrosatellitenmarker
<i>D2S2330</i>	<i>D10S1652</i>
<i>D5S647</i>	<i>D12S1659</i>
<i>D5S2027</i>	<i>D13S217</i>
<i>D6S1574</i>	<i>D14S990</i>
<i>D6S1581</i>	<i>DXS8045</i>

IV. Ergebnisse

1. Mutationsanalyse des *FOXG1*-Gens bei Patienten mit verschiedenen Gehirnehlbildungen

1.1 Vorbemerkungen

Für die Mutationsanalyse standen die genomischen DNAs von 107 Patienten mit mentaler Retardierung, postnataler Mikrozephalie und verschiedenen Gehirnehlbildungen, wie einer Hypo- oder Aplasie des Corpus callosum und Pachygyrie, zur Verfügung. Bereits vor Beginn der Analyse wurden in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche 36 dieser Patienten auf Mutationen im *FOXG1*-Gen untersucht. Somit wurden in dieser Arbeit 71 Patienten einer Mutationsanalyse unterzogen. Die DNAs der Patienten wurden durchnummeriert, wobei das untersuchte Kollektiv die Nummern LIS37-80, 161-162 und 164-188 hat.

1.2 PCR-Amplifikation des *FOXG1*-Gens und anschließende direkte Sequenzanalyse

Das *FOXG1*-Gen besteht aus einem Exon, welches im Rahmen dieser Arbeit auf Mutationen untersucht wurde. Als erstes wurde die entsprechende genomische DNA-Sequenz mit Hilfe einer computergestützten Analyse („RepeatMasker“) auf das Vorhandensein von repetitiven Sequenzen untersucht. Die Primer für die PCR-Amplifikationen wurden so ausgewählt, dass sie die Kodierregion und zusätzlich 179 Bp der 5'-untranslatierten Region (5'-UTR) sowie 661 Bp der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) umfassen. Es wurden sechs Amplikons generiert. Für jedes Amplikon wurden die PCR-Bedingungen an genomischen Kontroll-DNAs etabliert. Danach wurden die Amplikons aus genomischer DNA der Patienten amplifiziert und die PCR-Produkte in einem Agarosegel auf Qualität und Quantität überprüft. In der nachfolgenden Abbildung wird exemplarisch ein Agarosegel mit den PCR-Produkten des Amplikons 1 dargestellt.

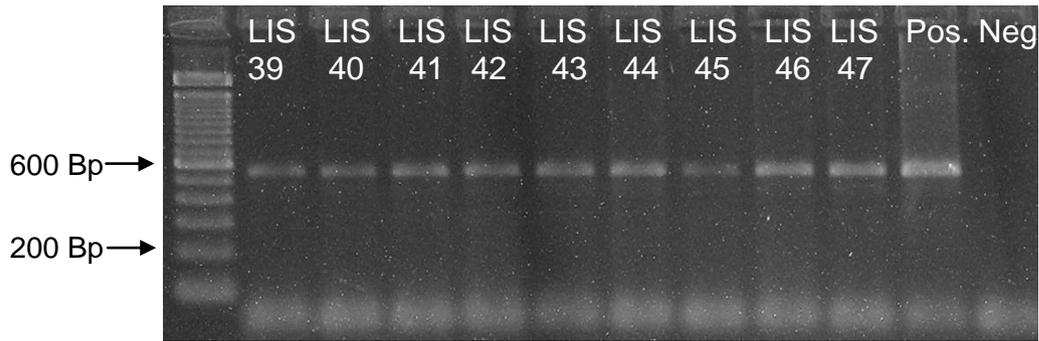


Abb. 4: Darstellung eines Agarosegels mit den PCR-Produkten des Amplikons 1 des *FOXG1*-Gens

Das Bild zeigt ein 2%-iges Agarosegel, auf welches je 10 µl der PCR-Produkte des Amplikons 1 von neun Patienten (LIS39-47) aufgetragen wurden. Die PCR-Produkte haben eine Größe von 546 Bp. Als Positivkontrolle (Pos.) diente ein Ansatz mit einer genomischen Kontroll-DNA und als Negativkontrolle (Neg.) ein Ansatz ohne DNA. Als Größenstandard diente eine 100 Bp-Leiter, die links aufgetragen wurde. Die 200 Bp- und die 600 Bp-Banden sind mit einem Pfeil markiert.

Die PCR-Produkte wurden enzymatisch aufgereinigt und sequenziert. Dabei wurden sechs Mutationen gefunden, von denen sich zwei im kodierenden Teil des Exons befinden und die anderen Mutationen entweder in der 5'-UTR oder in der 3'-UTR liegen (siehe Tabelle 1).

Bei der Patientin LIS46 konnte ein kleines Rearrangement nachgewiesen werden. Es handelt sich um die heterozygot vorliegende 1 Bp-Duplikation c.460dupG (p.Glu154GlyfsX301) (Abb. 5). Durch das Rearrangement kommt es zu einer Leserasterverschiebung, und nach 300 proteinfremden Aminosäuren wird ein Stoppkodon vorhergesagt. Hierbei handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine pathogene Mutation. Damit eine mögliche Neumutation aufgedeckt werden kann, wurde das entsprechende Amplikon ebenfalls bei den Eltern der Patientin LIS46 auf das Vorliegen dieser Mutation untersucht. Diese wiesen die Mutation nicht auf, weshalb sie als *de novo* bezeichnet werden kann. (Abb. 5).

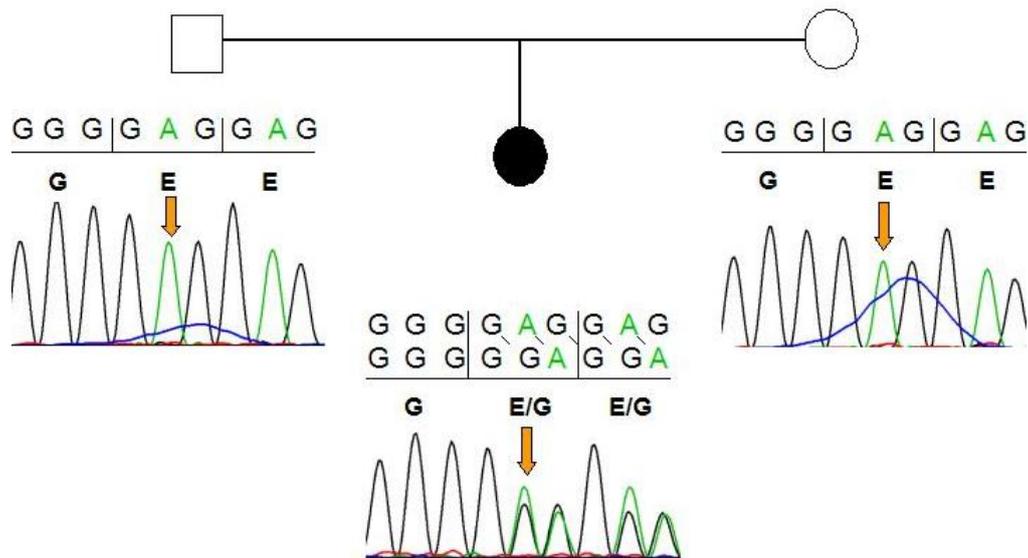


Abb. 5: Ausschnitte aus dem Sequenzchromatogramm des *FOXG1*-Amplikons 2 der Patientin LIS46 mit einer heterozygoten 1 Bp-Duplikation und den Sequenzchromatogrammen ihrer Eltern

In der Abbildung sind der Stammbaum der Familie und Ausschnitte aus den Sequenzchromatogrammen des Amplikons 2 des *FOXG1*-Gens der Patientin LIS46 (unten), ihres Vaters (links) und ihrer Mutter (rechts) dargestellt. Die Patientin trägt die Duplikation c.460dupG. Heterozygotie sowie Wildtypbase sind mit orangefarbenen Pfeilen gekennzeichnet. Die obere Buchstabenfolge über dem Sequenzchromatogramm der Patientin stellt die Wildtypsequenz dar und die untere die des mutierten Allels mit der Leserasterverschiebung. Die Basen sind durch Buchstaben gekennzeichnet (A – Adenin, G – Guanin) und werden durch die Peaks in verschiedenen Farben repräsentiert (A – grün, G – schwarz). Jedes Triplet ist durch einen schwarzen Balken von dem nächsten getrennt. Die kodierten Aminosäuren sind im Einbuchstabencode unter jedem Triplet angegeben, wobei in dem Sequenzchromatogramm der Patientin jeweils die Wildtypamino­säure links und die mutierte Aminosäure rechts vom Schrägstrich steht.

Zur Überprüfung der Elternschaft wurde eine Mikrosatellitenanalyse durchgeführt. Insgesamt wurden dabei zehn Mikrosatelliten überprüft, wovon bei der Patientin sieben in heterozygotem und drei in homozygotem Zustand vorlagen. Im Fall einer Heterozygotie konnte gezeigt werden, dass jeweils ein Allel von der Mutter und ein Allel vom Vater vererbt wurde (Abb. 6). Im Fall einer Homozygotie war das entsprechende Allel bei beiden Elternteilen nachweisbar. Somit kann angenommen werden, dass es sich um die leiblichen Eltern handelt.

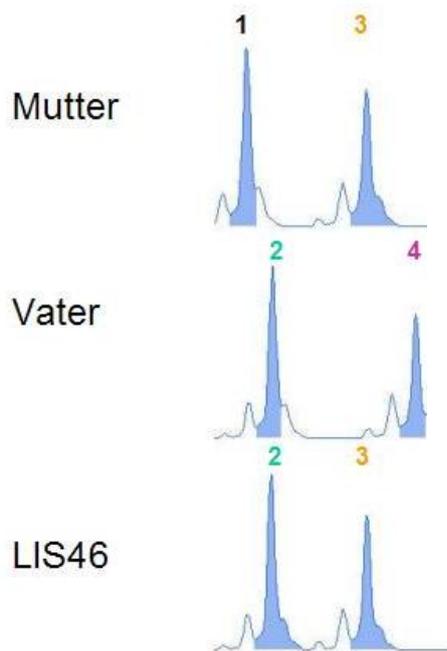


Abb. 6: Elektropherogramme des Mikrosatellitenmarkers *D6S1574* für die Patientin LIS46 sowie für ihre Eltern

Die blauen Peaks verdeutlichen die unterschiedliche Länge der Nukleotidrepeats, die den einzelnen Allelen entsprechen. Die Allele der Mutter (oben) sind mit 1 und 3 gekennzeichnet, die des Vaters (Mitte) mit 2 und 4. Anhand der unterschiedlichen Länge der Nukleotidrepeats ist ersichtlich, dass die Patientin LIS46 (unten) das Allel 2 vom Vater und das Allel 3 von der Mutter geerbt hat.

Die heterozygote Mutation c.1161G>A (p.=), die im Amplikon 4 bei Patientin LIS38 gefunden wurde, ist eine stille Mutation. Um zu überprüfen, ob durch den Nukleotidaustausch Spleißstellen verändert werden oder neu entstehen, wurden die Wildtyp- und die mutierte Sequenz mit Hilfe der drei Computerprogramme „SpliceView“, „NetGene“ und „BDGP“ untersucht. Die Vorhersagen aller drei Programme ergaben, dass keine natürlichen Spleißstellen verändert werden oder neu entstehen werden. Um eine mögliche Neumutation aufzudecken, wurde das Amplikon 4 aus der genomischen DNA der Eltern der Patientin amplifiziert und sequenziert. Hierbei zeigte sich, dass der Vater denselben heterozygoten Basenaustausch trägt wie die Patientin (Abb. 7). Eine Pathogenität dieser Mutation ist daher eher unwahrscheinlich. Die nachfolgende Abbildung zeigt das Sequenzchromatogramm der Patientin mit der Sequenzvariante sowie die Sequenzchromatogramme ihrer Eltern..

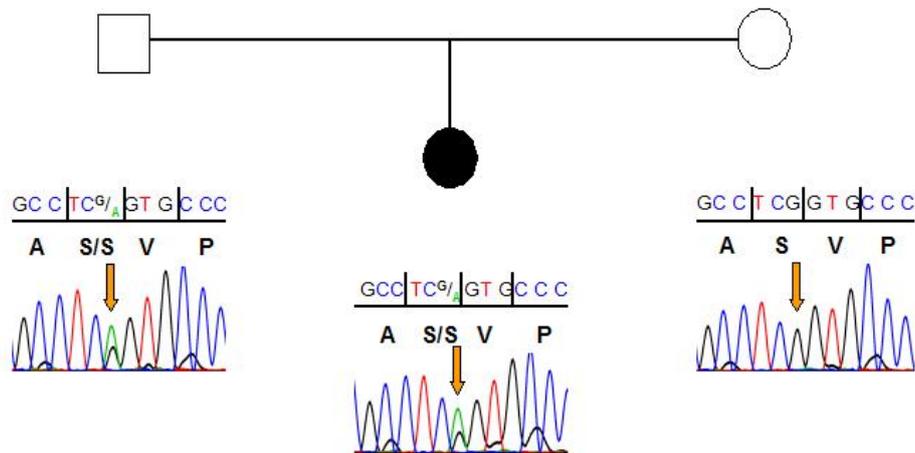


Abb. 7: Darstellung eines Sequenzchromatogrammteils aus dem Amplikon 4 des *FOXG1*-Gens von Patientin LIS38 und ihren Eltern

Die Abbildung zeigt den Stammbaum der Familie sowie Ausschnitte aus den Sequenzchromatogrammen des *FOXG1*-Gens von Patientin LIS38 (Mitte), ihrer Mutter (rechts) und ihres Vaters (links). Der Vater und die Patientin sind heterozygot für die Mutation c.1161G>A (p.=). Die Basen sind durch Buchstaben gekennzeichnet (A – Adenin, G – Guanin, C – Cytosin, T – Thymin) und werden durch die Peaks in verschiedenen Farben repräsentiert (A – grün, G – schwarz, C – blau, T – rot). Heterozygotie sowie Wildtypbase sind mit orangefarbenen Pfeilen gekennzeichnet.

Von den weiteren vier Mutationen ist die 1 Bp-Deletion c.*93delC als *single nucleotide polymorphism* (SNP) in den Datenbanken „Ensembl“ und „NCBI“ eingetragen. Die anderen Mutationen c.-29C>T (5'-UTR), c.*13C>A (3'-UTR) und c.*478_482delTCTTT (3'-UTR) sind in den Datenbanken noch nicht beschrieben worden. Eine Krankheitsassoziation dieser Varianten ist bisher nicht bekannt. Exemplarisch wird die heterozygote Sequenzvariante c.*478_482delTCTTT in der folgenden Abbildung dargestellt.

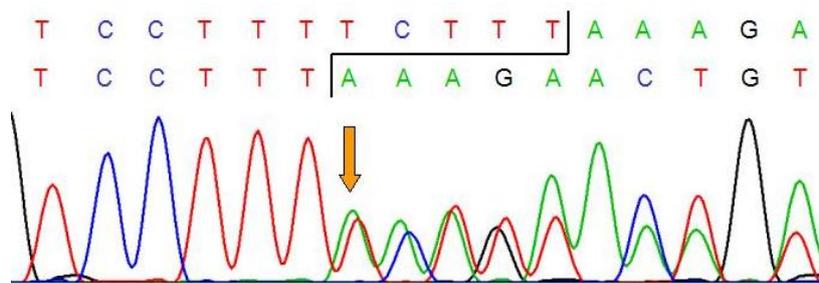


Abb. 8: Ausschnitt des Sequenzchromatogramms eines Patienten mit der heterozygoten Deletion c.*478_482delTCTTT in der 3'-UTR des *FOXG1*-Gens

Der Sequenzausschnitt zeigt die heterozygote 5 Bp-Deletion in der 3'-UTR des *FOXG1*-Gens. Der Beginn der Deletion ist mit einem orangefarbenen Pfeil markiert, und der deletierte Bereich ist durch schwarze Linien gekennzeichnet. Die obere Basenabfolge stellt die Wildtypsequenz dar und die untere die Sequenz des mutierten Allels.

Abschließend gibt die Tabelle 1 einen Überblick über die identifizierten Sequenzvarianten im untersuchten Patientenkollektiv.

Gen	Mutation / Änderung auf Proteinebene	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP / pathogen / nicht pathogen
<i>FOXG1</i>	c.-29C>T	1/142	unbekannt, vermutlich nicht pathogen
	c.460dupG / p.Glu154GlyfsX301	1/142	unbekannt, vermutlich pathogen
	c.1161G>A / p.=	1 ^a /142	unbekannt, vermutlich nicht pathogen
	c.*13C>A	4/142	unbekannt, vermutlich nicht pathogen
	c.*93delC	7/142	<i>rs11433787</i> , vermutlich nicht pathogen
	c.*478_482delTCTTT	22/142 (2)	unbekannt, vermutlich nicht pathogen

Tab. 1: Identifizierte Mutationen im *FOXG1*-Gen bei 71 Patienten mit Gehirnehlbildungen

In der Tabelle sind alle Mutationen, die in dem untersuchten Patientenkollektiv identifiziert wurden, zusammengefasst. Bei der bekannten Mutation ist die SNP-Referenznummer (rs) der NCBI-Datenbank angegeben. Die Zahl in der Klammer gibt das Auftreten des seltenen Allels in homozygotem Zustand an. Der Patient, dessen Vater ebenfalls die Mutation trägt, wird durch ^a markiert.

2. Mutationsanalyse des *FOXG1*-Gens bei Patienten mit Rett-Syndrom

2.1 Vorbemerkungen

Für die *FOXG1*-Sequenzanalyse standen die genomischen DNAs von 81 Patienten mit Verdacht auf Rett-Syndrom und ohne Mutation im *MECP2*-Gen zur Verfügung. Diese wurden von Frau Dr. Soma Das (DNA Diagnostic Laboratory, Department of Human Genetics, University of Chicago, Chicago, Illinois, USA) zur Mutationsanalyse zugeschickt. Da von den meisten DNAs nur eine geringe Menge vorlag, wurden die Amplikons 1 und 2 von 47 DNAs dieser Patienten in Kollaboration mit dem Labor von Frau Dr. Soma Das untersucht. Die DNAs der Patienten wurden durchnummeriert, wobei das untersuchte Kollektiv die Nummern LIS81-160 und 163 hat.

2.2 PCR-Amplifikation des *FOXG1*-Gens und anschließende direkte Sequenzanalyse

Das Primerdesign und die PCR-Optimierung wurden bereits in 1.2 beschrieben. Nach Überprüfung der PCR-Produkte auf einem Agarosegel wurden diese enzymatisch aufgereinigt und sequenziert. Dabei wurden acht Mutationen identifiziert.

Ergebnisse

Patient LIS127 weist ein kleines Rearrangement auf. Hierbei handelt es sich um die heterozygot vorliegende Mutation c.505_506delGGinsT (p.Gly168SerfsX23). Durch die Deletion der beiden Guaninbasen und die Insertion einer Thyminbase kommt es zur Leserasterverschiebung, und nach 22 proteinfremden Aminosäuren wird ein Stoppkodon vorhergesagt. Daher handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um eine pathogene Mutation. Abbildung 9 zeigt Ausschnitte aus den Sequenzchromatogrammen einer Kontrollperson und von Patient LIS127.

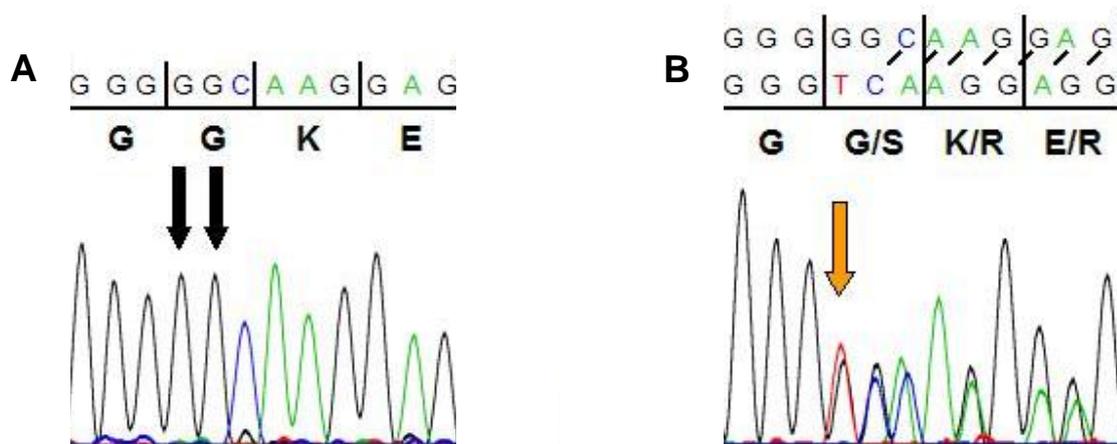


Abb. 9: Ausschnitte aus den Sequenzchromatogrammen einer Kontrollperson und des Patienten LIS127 mit der heterozygoten Deletion von zwei Guaninbasen und der Insertion einer Thyminbase im *FOXG1*-Gen

Es sind Ausschnitte aus den Sequenzchromatogrammen des Amplikons 2 des *FOXG1*-Gens einer Kontrollperson (A) und des Patienten LIS127 (B) gezeigt. Patient LIS127 weist eine Deletion von zwei Guaninbasen und eine Insertion von einer Thyminbase auf. Die deletierten Basen sind in (A) mit schwarzen Pfeilen markiert und die inserierte Base in (B) mit einem orangefarbenen Pfeil. Die obere Buchstabenfolge in (B) stellt die Wildtypsequenz dar und die untere das mutierte Allel. Die Leserasterverschiebung wird durch diagonale Striche verdeutlicht. Die kodierenden Aminosäuren sind im Einbuchstabencode unter jedem Triplet angeben, wobei nach dem Beginn der Mutation jeweils die Wildtypaminoäure links und die mutierte Aminosäure rechts vom Schrägstrich steht.

Bei dem Patienten LIS151 konnte die heterozygot vorliegende 1 Bp-Duplikation c.460dupG (p.Glu154GlyfsX301) nachgewiesen werden. Diese Mutation wurde bereits bei der Patientin LIS46 identifiziert (siehe Kapitel 1.2).

Es wurden sechs weitere Mutationen gefunden. Die heterozygote Missense-Mutation c.209A>C (p.Glu70Pro) wurde bei Patient LIS157 und die heterozygote 6 Bp-Duplikation c.327_332dupGCCACC (p.Pro111_Pro112dup) wurde bei Patient LIS109 identifiziert (Abb. 10).

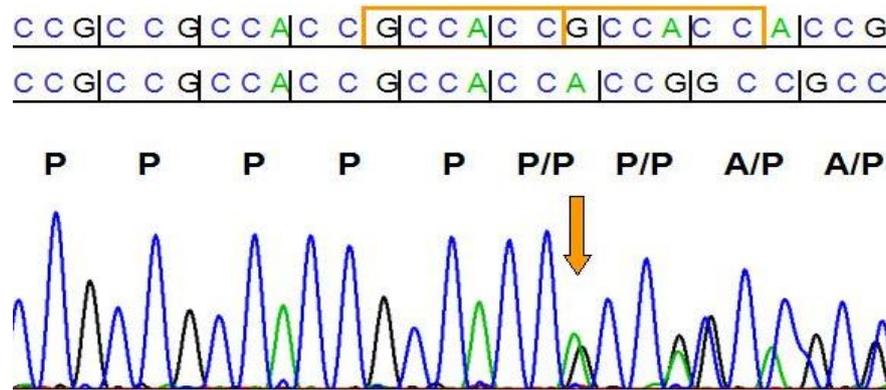


Abb. 10: Darstellung eines Ausschnittes aus dem Sequenzchromatogramm des Amplikons 2 des *FOXG1*-Gens von Patient LIS109

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus dem Sequenzchromatogramm des *FOXG1*-Gens von Patient LIS109. Die obere Buchstabenfolge stellt dabei das mutierte Allel dar und die untere Sequenz das Wildtypallel. Die Duplikation ist durch orangefarbene Kästchen um die duplizierten Basen herum verdeutlicht. Der orangefarbene Pfeil zeigt auf den Beginn der Duplikation. Die kodierenden Aminosäuren sind im Einbuchstabencode unter jedem Triplet angeben, wobei nach dem Beginn der Mutation jeweils die Wildtypamino­säure links und die mutierte Aminosäure rechts vom Schrägstrich steht.

Die Missense-Mutation c.209A>C konnte bei dem Vater des Patienten LIS157 nachgewiesen werden, genauso wie die 6 Bp-Duplikation c.327_332dupGCCACC bei dem Vater des Patienten LIS109. Eine Pathogenität dieser Sequenzvarianten ist daher eher unwahrscheinlich. Patientin LIS146 weist die heterozygote 27 Bp-Duplikation c.209_235dup27 (p.Glu70_78Produp) auf. Die drei Mutationen c.*13C>A, c.*93delC und c.*478_482delTCTTT wurden bereits in Kapitel 1.2 beschrieben.

Tabelle 2 zeigt abschließend alle Mutationen, die nach der Mutationsanalyse des *FOXG1*-Gens bei Patienten mit Verdacht auf Rett-Syndrom gefunden wurden.

Gen	Mutation / Änderung auf Proteinebene	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP / pathogen / nicht pathogen
<i>FOXG1</i>	c.209A>C / p.Glu70Pro	1 ^a /162	unbekannt, vermutlich nicht pathogen
	c.209_235dup27 / p.Glu70_Pro78dup	1/162	unbekannt, vermutlich nicht pathogen
	c.327_332dupGCCACC / p.Pro111_Pro112dup	1 ^a /162	unbekannt, vermutlich nicht pathogen
	c.460dupG / p.Glu154GlyfsX301	1/162	unbekannt, vermutlich pathogen
	c.505_506delGGinsT / p.Gly168SerfsX23	1/162	unbekannt, vermutlich pathogen
	c.*13C>A	6/162	unbekannt, vermutlich nicht pathogen
	c.*93delC	3/162	rs11433787, vermutlich nicht pathogen
	c.*478_482delTCTTT	31/162 (4)	unbekannt, vermutlich nicht pathogen

Tab. 2: Identifizierte Mutationen im *FOXG1*-Gen bei Patienten mit Rett-Syndrom

In der Tabelle werden alle Mutationen, die in dem untersuchten Patientenkollektiv identifiziert wurden, zusammengefasst. Bei der bekannten Mutation ist die SNP-Referenznummer (rs) der NCBI-Datenbank angegeben. Die Zahl in der Klammer gibt das Auftreten des seltenen Allels in homozygotem Zustand an. Patienten, bei denen bei dem jeweiligen Vater ebenfalls die entsprechende Mutation gefunden wurden, sind durch ^a markiert.

3. SSCP-Analysen zum Nachweis von möglichen seltenen Sequenzvarianten im *FOXG1*-Gen

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Mutationen auch in der Normalbevölkerung auftreten und somit eventuell als seltene Sequenzvarianten angesehen werden können, wurden SSCP-Gelanalysen durchgeführt. Wenn eines der PCR-Produkte aus dem Kontrollkollektiv im SSCP-Gel das gleiche Laufverhalten zeigt wie ein PCR-Produkt eines Patienten mit *FOXG1*-Mutation, spricht dies für das Vorliegen der seltenen Sequenzvariante in der Normalbevölkerung.

Die PCR-Produkte des Amplikons 2 (555 Bp) des *FOXG1*-Gens der Patienten LIS146 (c.209_235dup27), LIS109 (c.327_332dupGCCACC), LIS46 und LIS151 (c.460dupG) sowie des Patienten LIS127 (c.505_506delGGinsT) wurden einer SSCP-Gelanalyse unterzogen. Hierfür wurden kleinere PCR-Produkte (286 Bp und 295 Bp) mit neuen Primern generiert.

Ergebnisse

Die PCRs wurden wie unter 1.2 beschrieben etabliert. Jeweils die gleiche Menge an PCR-Produkt wurde auf die Polyacrylamidgele aufgetragen.

Zuerst wurden die PCR-Produkte, die die heterozygote Duplikation c.327_332dup6 (LIS109) bzw. die heterozygote c.209_235dup27-Mutation (LIS146) umfassen, zusammen mit den PCR-Produkten von 102 Kontrollen einer SSCP-Gelanalyse unterzogen. Dabei unterschieden sich die PCR-Produkte der Patienten und die PCR-Produkte der Kontrollen in ihrem Laufverhalten (Abb. 11).

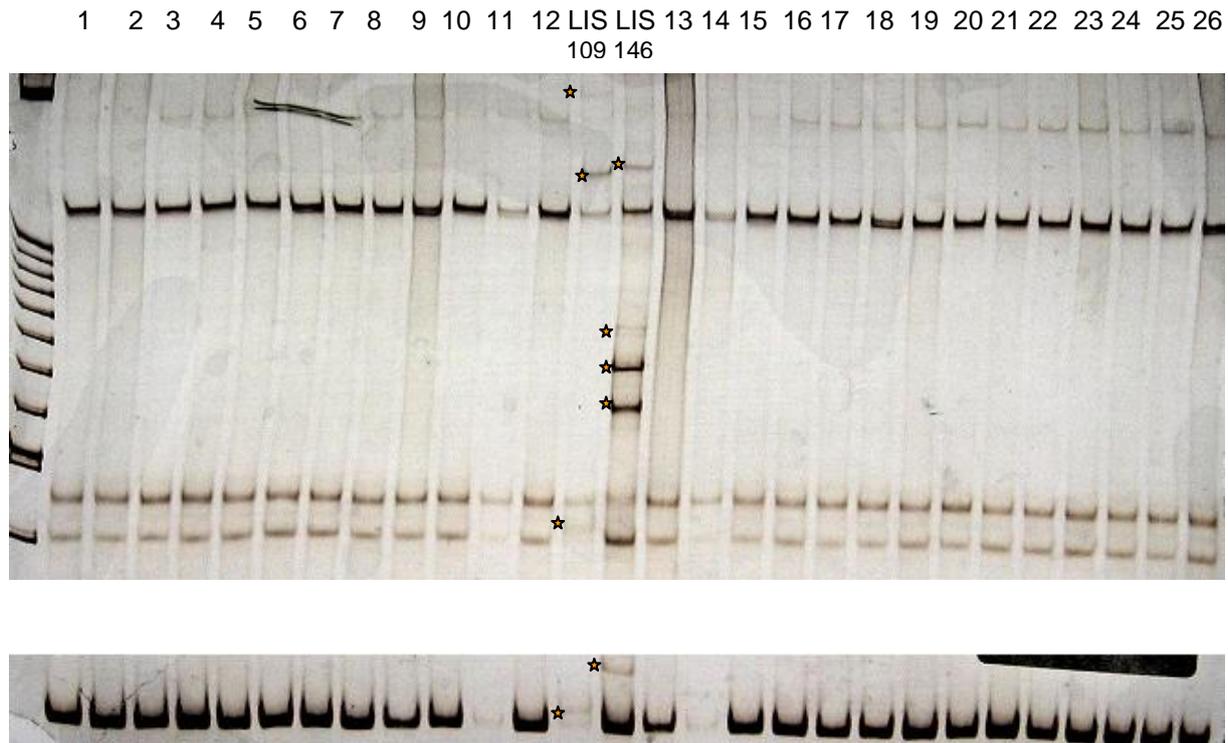


Abb. 11: Darstellung eines SSCP-Gels mit PCR-Produkten des *FOXG1*-Gens der Patienten LIS109 und LIS146 sowie von 26 Kontrollpersonen

Das Bild zeigt ein 8%-iges Polyacrylamidgel, auf welches die PCR-Produkte eines Amplikons des *FOXG1*-Gens der Patienten LIS109 und LIS146 sowie von 26 Kontrollpersonen (1-26) aufgetragen wurden. Die orangefarbenen Sterne verdeutlichen die Unterschiede im Bandenmuster zwischen den PCR-Produkten der Patienten im Vergleich zu denen von Kontrollpersonen. Im oberen Teil der Abbildung ist das Bandenmuster zu erkennen, welches durch Einzelstränge entstanden ist. Im unteren Teil zeigt der linke Stern zusätzlich einen durch Hybridisierung der komplementären Stränge von mutiertem Allel und Wildtypallel entstandenen Heteroduplex. Links ist eine 100 Bp-Leiter aufgetragen.

Auch die PCR-Produkte von LIS46 und LIS151, welche die heterozygote 1 Bp-Duplikation c.460dupG umfassen, zeigen auf dem Polyacrylamidgel ein unterschiedliches Bandenmuster im Vergleich zu den PCR-Produkten von 100 Kontrollpersonen (Abb. 12).

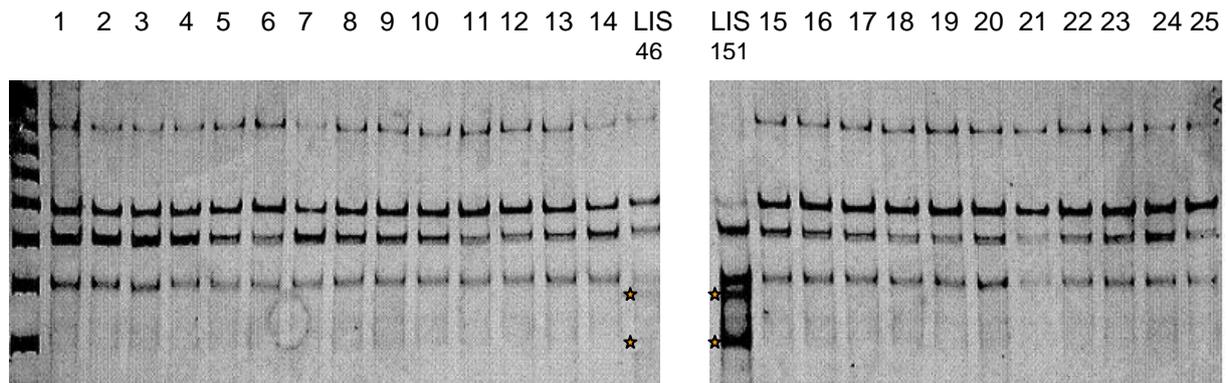


Abb. 12: Ausschnitt eines SSCP-Gels mit den PCR-Produkten des *FOXG1*-Gens der Patienten LIS46, LIS151 und 25 Kontrollpersonen

Das Bild zeigt ein 8%-iges Polyacrylamidgel, auf welches die PCR-Produkte eines Amplikons des *FOXG1*-Gens der Patienten LIS46 und LIS151 sowie von 25 Kontrollpersonen (1-25) aufgetragen wurden. Die orangefarbenen Sterne verdeutlichen die Unterschiede im Bandenmuster zwischen den PCR-Produkten der Patienten im Vergleich zu denen von Kontrollpersonen. Da im unteren Teil des Gels keine Laufunterschiede der Patienten-DNA im Vergleich zu der DNA der Kontrollpersonen festgestellt werden konnten, ist nur der obere Teil des Gels dargestellt. Links ist eine 100 Bp-Leiter aufgetragen.

Abbildung 13 verdeutlicht, dass das PCR-Produkt mit der Mutation c.505_506delGGinsT des Patienten LIS127 im Vergleich zu den PCR-Produkten der Kontrollpersonen ein leicht verändertes Bandenmuster im SSCP-Gel aufweist. Insgesamt wurden die PCR-Produkte von 100 Kontrollpersonen und das PCR-Produkt von LIS127 auf SSCP-Gele aufgetragen.

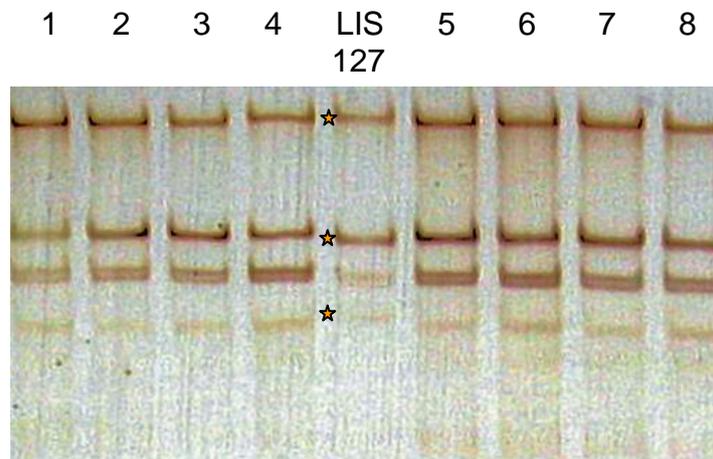


Abb. 13: Ausschnitt eines SSCP-Gels mit PCR-Produkten des *FOXG1*-Gens von Patient LIS127 und acht Kontrollpersonen

Das Bild zeigt ein 8%-iges Polyacrylamidgel, auf welches die PCR-Produkte eines Amplikons des *FOXG1*-Gens von Patient LIS127 und acht Kontrollpersonen (1-8) aufgetragen wurden. Die orangefarbenen Sterne zeigen die Unterschiede im Bandenmuster zwischen dem PCR-Produkt des Patienten im Vergleich zu denen der Kontrollpersonen. Der obere und der untere Stern markieren jeweils Banden, die im Gegensatz zu denen der Kontrollpersonen etwas weiter oben liegen. Dagegen liegt die Bande, welche durch den mittleren Stern hervorgehoben wird, im Vergleich zu den Banden der Kontrollpersonen etwas weiter unten.

Ergebnisse

Neben den Mutationen, die während dieser Arbeit gefunden wurden, wurde auch eine Mutation, die schon zuvor in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche identifiziert worden war, einer SSCP-Gelanalyse unterzogen. Es handelt sich hierbei um die Patientin LIS1 mit der heterozygoten Missense-Mutation c.757A>G (p.Asn253Asp). Keines der PCR-Produkte von 102 Kontrollpersonen wies das gleiche Bandenmuster wie das PCR-Produkt der Patientin mit der Mutation auf (siehe exemplarisch Abb. 14).

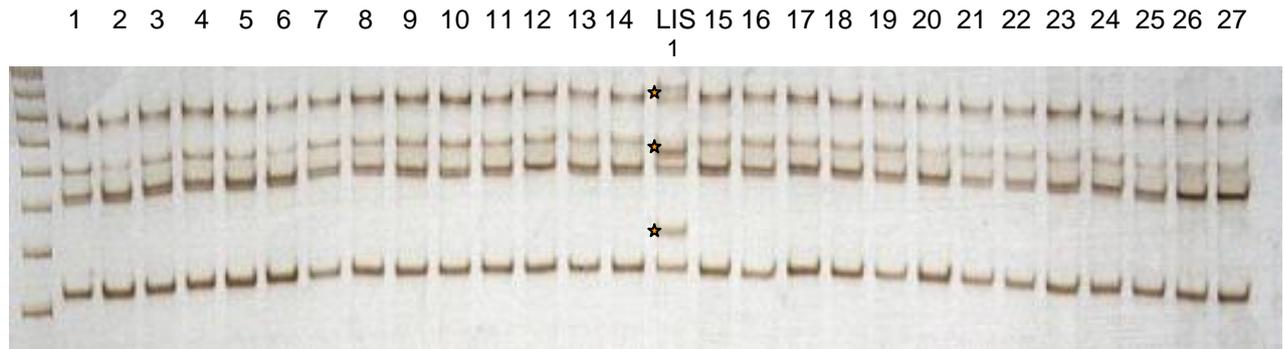


Abb. 14: Darstellung eines Ausschnittes aus einem SSCP-Gel mit den PCR-Produkten des *FOXG1*-Gens von Patientin LIS1 und 27 Kontrollen

Das Bild zeigt ein 8%-iges Polyacrylamidgel, auf welches die PCR-Produkte eines Amplikons des *FOXG1*-Gens von Patientin LIS1 und 27 Kontrollpersonen (1-27) aufgetragen wurden. Die orangefarbenen Sterne verdeutlichen die Unterschiede im Bandenmuster zwischen dem PCR-Produkt der Patientin im Vergleich zu denen von Kontrollpersonen. Links ist eine 100 Bp-Leiter aufgetragen.

Zusammenfassend ist zu konstatieren, dass keine der untersuchten Mutationen in einem Kontrollkollektiv von mindestens 100 Personen durch SSCP-Gelanalyse nachgewiesen werden konnte.

Tabelle 3 zeigt abschließend alle Mutationen, für die eine SSCP-Analyse durchgeführt wurde.

Patient	Mutation		Häufigkeit der seltenen Allele bei	
	DNA-Ebene	Protein-Ebene	Patienten	Kontrollen
LIS146	c.209_235dup 27	p.Glu70_Pro78dup	1/188	0/204
LIS109	c.327_332dup GCCACC	p.Pro111_Pro112dup	1/188	0/204
LIS46 LIS151	c.460dupG	p.Glu154GlyfsX301	2/188	0/200
LIS127	c.505_506del GGinsT	p.Gly168SerfsX23	1/188	0/200
LIS1	c.757A>G	p.Asn253Asp	1/188	0/204

Tab. 3: Mutationen im *FOXG1*-Gen bei Patienten mit verschiedenen Gehirnfehlbildungen bzw. Rett-Syndrom, die einer SSCP-Analyse unterzogen wurden

V. Diskussion

1. Zwei Mutationen im *FOXG1*-Gen, die zur Leserasterverschiebung führen, bei drei Patienten mit einem zum Rett-Syndrom ähnlichen Phänotyp

Im Rahmen dieser Arbeit wurden DNA-Proben von 71 Patienten mit einer klinischen Symptomatik, die der von Patientin LIS1 ähnelte, und 81 Patienten mit Verdacht auf Rett-Syndrom auf Mutationen im *FOXG1*-Gen untersucht. Dabei wurden zehn verschiedene Mutationen identifiziert.

Die heterozygoten Mutationen c.460dupG (p.Glu154GlyfsX301) und c.505_506delGGinsT (p.Gly168SerfsX23) bei den Patienten LIS46, LIS151 und LIS127 waren in den DNA-Proben von 100 Kontrollpersonen nicht feststellbar. Diese Mutationen führen zu einer Leserasterverschiebung. Durch die Leserasterverschiebung wird entweder aufgrund eines vorzeitig auftretenden Stoppkodons die mRNA abgebaut (*nonsense-mediated mRNA decay*) (Hentze et al., 1999; Culbertson et al., 1999), oder aber es kann ein COOH-terminal trunkeertes Protein entstehen. In beiden Fällen handelt es sich um *loss-of-function*-Mutationen und das betroffene Allel kann als amorphes Allel (Nullallel) bezeichnet werden (Read und Strachan, 1999). Die Mutationen c.460dupG (p.Glu154GlyfsX301) und c.505_506delGGinsT (p.Gly168SerfsX23) können also als pathogen angesehen werden. Es ist auffällig, dass die Mutation c.460dupG (p.Glu154GlyfsX301) bei zwei verschiedenen Patienten vorlag, was vermuten lässt, dass hier ein *hot spot* für Mutationen im *FOXG1*-Gen vorliegt.

Die DNAs von den Eltern der Patientin LIS146 mit der Mutation c.209_235dup27 (p.Glu70_Pro78dup) lagen während dieser Arbeit noch nicht vor, weshalb keine endgültige Aussage bezüglich der Pathogenität dieser Mutation getroffen werden kann. Einen Hinweis darauf, dass die Mutation vermutlich nicht pathogen ist, könnte die Lokalisation der Mutation liefern. Die durch die Mutation p.Glu70_Pro78dup duplizierten Aminosäuren liegen in einem Proteinabschnitt mit einem variablen Stretch von Prolinen und Glutaminresten. Zwischen verschiedenen Spezies gibt es Unterschiede in der Länge dieses Stretches, was bedeutet, dass die Aminosäuren an dieser Position wahrscheinlich nicht essentiell für die Funktion von *FOXG1* sind (vgl. Abb. 15).

<i>Homo sapiens</i>	61	PAPQPPPPP	QQQQPPPPP	PPAPQPPQTRGAPAAADDKGPQQLLLP	PPPPPPPPAAALD	GAK	120
<i>Cebus capucinus</i>	61	PAPQPPPPP	QQQQPPPPP	PPAPQPPQARGAPAAADDKGPQQLLLP	PPPPPPPPPP	TAALD	GAK 120
<i>Mus musculus</i>	60	PAPQPPPPP	PQQQQQQ-P	PPAPQPPQARGAPAAADDKGPQPLLLP	-----	STALD	GAK 112
<i>Rattus norvegicus</i>	60	PAPQPPPPP	PQQQQQ--P	PPAPQPPQARGAPAAADDKGPQPLLLP	-----	SAALD	GAK 111
<i>Xenopus laevis</i>	47	SHHLQPHHR	PLQEEDE--	-----	LDKSLLEVKTESLPP	-----	77
<i>Agama agama</i>	59	PQPQRAAQA	EEEEEEKSQ	LLLQPPGVGVVAAAAAAGAPATSGPME	-----	VAK	109
<i>Psammobates geometricus</i>	61	QQPQRAAPA	EEEE-KSQ	LLLQPP----	VVAAAAAAT----	TSGTLE	-----VAK 101
<i>Gallus gallus</i>	59	QQPQRAAAA	EEDEEEKAP	LLLPPP-----	-----	AAGALE	-----AAK 91
<i>Crocodylus acutus</i>	60	P-PPRAAPA	EEDEEDK	LLSQPPG----	AAAAAAT----	TSAPLEV	-----VGK 101
<i>Cyprinus dangila</i>	54	KTPLPAQVQ	EQKSENT--	-----	-----	-----	69

Abb. 15: Ausschnitt aus der Aminosäureabfolge des FOXG1-Proteins des Menschen im Vergleich zu anderen Spezies

Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt aus der Proteinabfolge des FOXG1-Proteins des Menschen sowie von verschiedenen anderen Spezies. Der orangefarbene Kasten umrahmt die duplizierten Aminosäuren. Die Aminosäureabfolge variiert bei verschiedenen Tierarten und ist daher nicht hoch konserviert.

Die Aminosäuren, die sich an dieser Position befinden, sind also nicht sehr hoch konserviert und eine Pathogenität der Mutation c.209_235dup27 (p.Glu70_Pro78dup) scheint unwahrscheinlich.

Auch ist die Pathogenität der im 5'-untranslatierten Bereich von *FOXG1* befindlichen Mutation c.-29C>T unklar, da die DNAs der Eltern des Patienten noch nicht hinsichtlich dieser Mutation untersucht werden konnten. Vermutlich ist diese Sequenzveränderung jedoch nicht pathogen.

Die Mutationen c.1161G>A (p.=) und c.327_332dupGCCACC (p.Pro111_Pro112dup) wurden von einem gesunden Elternteil vererbt und sind daher eher nicht pathogen.

Die in der 3'-untranslatierten Region liegenden Sequenzvarianten c.*13C>A, c.*93delC und c.*478_482delTCTTT wurden bei mehreren Patienten beobachtet, was darauf hindeutet, dass es sich um *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) handelt und eine Pathogenität dieser Varianten unwahrscheinlich ist.

2. Das klinische Bild von Patienten mit einer *FOXG1*-Mutation

Mutationen im *Foxg1*-Gen können schwere Auswirkungen auf die Gehirnentwicklung nach sich ziehen. Wie im Mausmodell von Xuan und Kollegen (1995) gezeigt wurde, wird *Foxg1* vor allem in den sich schnell teilenden Zellen des telenzephalen Neuroepitheliums, der nasalen Hälfte der Retina und im Sehstrang exprimiert. *Foxg1*-Knockout-Mäuse weisen eine Hirnreduktion von 95% auf (Xuan et al., 1995). Mäuse mit einer heterozygoten *Foxg1*-Mutation zeigen eine ventral betont verminderte Größe des Telenzephalons sowie eine frühzeitige Differenzierung des kortikalen Neuroepithels (Xuan et al., 1995). Daher kann

angenommen werden, dass Mutationen des *FOXG1*-Gens beim Menschen ebenfalls zu Beeinträchtigungen der Gehirnentwicklung mit ventral betonter Mikrozephalie und einer Affektion des kortikalen Neuroepithels verursachen können. Diese Malformationen können ätiologisch für unterschiedliche Symptome, wie zum Beispiel eine mentale Retardierung, epileptische Anfälle und verschiedene Dyskinesien, sein.

Die drei Patienten LIS46, LIS151 und LIS127 mit der heterozygoten Mutation c.460dupG (p.Glu154GlyfsX301) bzw. c.505_506delGGinsT (p.Gly168SerfsX23) zeigten einen sehr einheitlichen Krankheitsphänotyp. Das Gewicht und die Größe der Patienten waren bei der Geburt zwar normal, der Kopfumfang war jedoch vermindert. Im Alter von ein bis zwei Jahren wurden weitere Untersuchungen durchgeführt, bei denen auffiel, dass die Patienten zu diesem Zeitpunkt ein vermindertes Gewicht hatten und der Kopfumfang im Verhältnis zu Gleichaltrigen noch kleiner war. Der Kopfumfang war im Verlauf weiter regredient, so dass in den letzten Untersuchungen von einer sich entwickelnden postnatalen Mikrozephalie gesprochen werden konnte. Die Patienten wiesen eine schwere mentale Retardierung auf, sie hatten einen verminderten Muskeltonus und lernten, wenn überhaupt, erst spät zu sitzen. Die Sprachentwicklung blieb bei den Patienten aus, und eine soziale Interaktion war nur schwer möglich und beschränkte sich häufig auf den Augenkontakt. Die Patienten entwickelten stereotype Handbewegungen oder andere Dyskinesien. Des Weiteren wurden ein gastroösophagealer Reflux sowie Schwierigkeiten beim Schlafen und Essen beobachtet. Zähneknirschen (Bruxismus) konnte bei einem der drei Patienten festgestellt werden. Zwei der drei Patienten hatten epileptische Anfälle, wobei jedoch kein einheitlicher EEG-Befund zu beobachten war. Das cMRT zeigte ein frontal betont vermindertes Volumen der weißen Substanz, ein hypoplastisches Corpus callosum und bei einem Patienten eine vereinfachte Gyrierung (Pachygyrie).

Diese Arbeit war Teil eines größeren Projektes, in dem Patienten im Hinblick auf Mutationen im *FOXG1*-Gen untersucht wurden. Im Rahmen des größeren Projektes wurden sechs weitere Patienten mit einer Mutation im *FOXG1*-Gen identifiziert. In der Literatur sind zwölf Patienten mit einer *FOXG1*-Mutation beschrieben (Shoichet et al., 2005; Bisgaard et al., 2006; Papa et al., 2008; Mencarelli et al., 2009; Ariani et al., 2008; Philippe et al., 2009; Jacob et al., 2009). Der Krankheitsphänotyp der drei während dieser Arbeit identifizierten Patienten wurde mit dem Krankheitsphänotyp der sechs weiteren Patienten des größeren Projektes sowie dem klinischen Erscheinungsbild der zwölf in der Literatur beschriebenen Patienten verglichen. Tabelle 4 zeigt die Merkmale, die in diesem Patientenkollektiv festgestellt wurden.

	Klinisches Merkmal	Postnatale Mikrozephalie (SD < -2)	Schwere mentale Retardierung	Muskuläre Hypotonie	Motorische Retardierung	Sprachentwicklung nicht vorhanden	Stereotype Handbewegungen	Dyskinesien	Zähneknirschen	Gastroösophagealer Reflux	Schwierigkeiten beim Füttern	Schlafprobleme	Epileptische Anfälle	Pachygyrie	Vermindertes Volumen der weißen Substanz	Hypoplastisches Corpus callosum
Während dieser Arbeit identifizierte Patienten (3)		3/3	3/3	3/3	2/2	3/3	2/3	3/3	1/3	3/3	3/3	1/3	2/3	1/3	3/3	3/3
In dem größeren Projekt identifizierte Patienten (6)	Anzahl der Merkmalsträger / Anzahl der Patienten mit Angaben zum Merkmal	6/6	6/6	5/5	6/6	6/6	3/4	3/5	2/3	4/5	4/6	5/6	4/5	2/6	6/6	5/6
In der Literatur beschriebene Patienten (12)		10/10	11/11	9/9	11/11	11/11	8/8	9/9	8/9	3/3	2/2	4/6	9/12	0/4	2/4	7/10

Tab. 4: Klinische Merkmale von Patienten mit *FOXG1*-Mutation

Tabelle 4 zeigt die klinischen Merkmale und die Häufigkeit ihres Auftretens bei den drei in dieser Arbeit identifizierten Patienten, den sechs Patienten des größeren Projektes und den zwölf in der Literatur beschriebenen Patientinnen. In rot hinterlegt sind die Merkmale, die bei allen Patienten, zu denen Daten vorliegen, festgestellt wurden.

Die Tabelle zeigt, dass eine postnatale Mikrozephalie, eine schwere mentale und psychomotorische Retardierung, Probleme in der Sprachentwicklung und eine muskuläre Hypotonie bei allen Patienten mit *FOXG1*-Mutation vorlagen, zu denen Daten zu diesen Merkmalen vorhanden waren.

Andere Symptome, wie z.B. ein gastroösophagealer Reflux, Schwierigkeiten beim Füttern und Schlafen, Handstereotypien, Dyskinesien, epileptische Anfälle, Zähneknirschen, eine Hypo- oder Aplasie des Corpus callosum, eine Pachygyrie und ein vermindertes Volumen der weißen Substanz, scheinen sehr variabel aufzutreten.

Aus den oben genannten Merkmalskombinationen scheint sich also ein relativ konsistenter Phänotyp für Patienten mit *FOXG1*-Mutation ableiten zu lassen, weshalb einer unserer Kollaborationspartner, Herr Professor Dr. William B. Dobyns (University of Chicago, Department of Human Genetics, Illinois, USA), die Bezeichnung *FOXG1 syndrome* vorgeschlagen hat.

3. Vergleich des klinischen Bildes von Patienten mit einer Mutation im *FOXG1*-Gen mit dem Phänotyp des Rett-Syndroms

Ariani und Kollegen berichteten 2008 von zwei Patienten mit der klinischen Diagnose eines Rett-Syndroms, bei denen Mutationen im *FOXG1*-Gen festgestellt wurden. Aufgrund des kongenitalen Auftretens der Symptome wurde das *FOXG1*-Gen als Krankheitsgen für eine kongenitale Variante des Rett-Syndroms angesehen.

In dieser Arbeit und im Rahmen des größeren Forschungsprojektes, in dessen Kontext diese Arbeit durchgeführt wurde, sind jedoch klinische Merkmale aufgefallen, die über das Spektrum an Symptomen des klassischen Rett-Syndroms hinausgehen. Symptome wie zum Beispiel Schwierigkeiten beim Füttern, gastroösophagealer Reflux, ein vermindertes Volumen der weißen Substanz und ein hypoplastisches Corpus callosum werden in den Konsensuskriterien für die Diagnose des Rett-Syndroms von Hagberg und Kollegen (2001) nicht erwähnt.

Insgesamt sollte daher von einem neuen Krankheitsbild, dem von Herrn Professor Dr. William B. Dobyns vorgeschlagenen *FOXG1 syndrome* gesprochen werden.

VI. Zusammenfassung

In der Arbeitsgruppe von Frau Professor Dr. Kerstin Kutsche wurde bei zwei Patientinnen mit postnataler Mikrozephalie, geistiger Retardierung und gastroösophagealem Reflux sowie frontal betonter Pachygyrie und hypoplastischem Corpus callosum eine heterozygote Mutation im oder in der Nähe des *FOXG1*-Gens in 14q12 identifiziert. Das vom *FOXG1*-Gen kodierte Protein ist ein *winged helix*-Transkriptionsfaktor der *forkhead*-Proteinfamilie, das vor allem im Gehirn exprimiert wird und frühe Schritte der kortikalen Entwicklung reguliert. In der Literatur wurde bei zwei Patientinnen mit einem zum Rett-Syndrom ähnlichen Phänotyp ebenfalls eine *FOXG1*-Mutation beschrieben. Das Rett-Syndrom kommt in der Regel bei Mädchen vor und ist gekennzeichnet durch eine zunächst normale geistige und psychomotorische Entwicklung, welche ab dem 7. Lebensmonat jedoch regredient ist. Klinisch werden die Mädchen zum Beispiel durch den Verlust der Sprache, Handstereotypien, geistige Retardierung und Mikrozephalie auffällig.

Zur genaueren Charakterisierung des Phänotyps, welcher mit Mutationen im *FOXG1*-Gen einhergeht, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine *FOXG1*-Sequenzierung bei 71 Patienten mit den o. g. klinischen Auffälligkeiten und Gehirnfehlbildungen sowie bei 81 Patienten mit einem zum Rett-Syndrom ähnlichen klinischen Bild durchgeführt. Insgesamt wurden neun verschiedene Sequenzveränderungen gefunden. Bei den im 3'-untranslatierten Bereich liegenden Mutationen c.*13C>A, c.*93delC und c.*478_482delTCTTT handelt es sich mit großer Wahrscheinlichkeit um *single nucleotide polymorphisms* (SNP) bzw. *deletion/insertion variations* (DIP), da die c.*93delC-Mutation bereits in den Datenbanken (*rs11433787*) beschrieben wurde und die beiden anderen Sequenzveränderungen bei mehreren Patienten gefunden wurden. Für die synonyme Mutation c.1161G>A (p.=), die in der 5'-untranslatierten Region liegenden Sequenzvariante c.-29C>T und die Duplikationen c.327_332dupGCCACC (p.Pro111_Pro112dup) und c.209_235dup27 (p.Glu70_Pro78dup) gibt es momentan keine Hinweise auf eine pathogenetische Relevanz. Die beiden zu einer Leserasterverschiebung führenden Mutationen c.460dupG (p.Glu154GlyfsX301) und c.505_506delGGinsT (p.Gly168SerfsX23) lagen bei den Patienten in heterozygotem Zustand vor und sind sehr wahrscheinlich mit deren klinischen Auffälligkeiten assoziiert. Dabei wurde die 1-Bp-Duplikation c.460dupG gleich bei zwei Patienten gefunden, wovon sie bei einer *de novo* vorlag.

Der Phänotyp der *FOXG1*-mutationspositiven Patienten stellte sich als sehr homogen heraus und umfasst eine postnatale Mikrozephalie, eine schwere mentale und psychomotorische

Retardierung, keine Sprachentwicklung, Dyskinesien und ein hypoplastisches oder aplastisches Corpus callosum. Es wird vorgeschlagen, das klinisch gut erkennbare Krankheitsbild dieser Patienten nicht als weitere Variante des Rett-Syndroms zu bezeichnen, sondern es mit einem eigenständigen Namen, dem *FOXP1 syndrome*, zu versehen.

VII. Literaturverzeichnis

- Ariani, F.; Hayek, G.; Rondinella, D.; Artuso, R.; Mencarelli, M. A.; Spanhol-Rosseto, A. (2008):** FOXP1 is responsible for the congenital variant of Rett syndrome. In: *Am J Hum Genet*, Jg. 83, H. 1, S. 89-93.
- Bisgaard, A. M.; Kirchhoff, M.; Tumer, Z.; Jepsen, B.; Brondum-Nielsen, K.; Cohen, M. (2006):** Additional chromosomal abnormalities in patients with a previously detected. In: *Am J Med Genet*, Jg. 140, H. 20, S. 2180-2187.
- Cheadle, J. P.; Gill, H.; Fleming, N.; Maynard, J.; Kerr, A.; Leonard, H. (2000):** Long-read sequence analysis of the MECP2 gene in Rett syndrome patients. In: *Hum Mol Genet*, Jg. 9, H. 7, S. 1119-1129.
- Culbertson, M. R. (1999):** RNA surveillance. Unforeseen consequences for gene expression, inherited genetic. In: *Trends Genet*, Jg. 15, H. 2, S. 74-80.
- De Bona C.; Zappella, M.; Hayek, G.; Meloni, I.; Vitelli, F.; Bruttini, M. (2000):** Preserved speech variant is allelic of classic Rett syndrome. In: *Eur J Hum Genet*, Jg. 8, H. 5, S. 325-330.
- Debeer, P.; Schoenmakers, E. F.; De Smet, L.; Van de Ven, W.J.; Fryns, J. P. (1998):** Co-segregation of an apparently balanced reciprocal t(12;22)(p11.2;q13.3) with a metacarpal, metatarsal and tarsal synostoses in three family members. In: *Clin Dysmorphol*, Jg. 7, H. 3, S. 225-228.
- Deidrick, K. M.; Percy, A. K.; Schanen, N. C.; Mamounas, L.; Maria, B. L. (2005):** Rett syndrome: pathogenesis, diagnosis, strategies, therapies, and future. In: *J Child Neurol*, Jg. 20, H. 9, S. 708-717.
- Dou, C. L.; Li, S.; Lai, E. (1999):** Dual role of brain factor-1 in regulating growth and patterning of the cerebral hemispheres. In: *Cereb Cortex*, Jg. 9, H. 6, S. 543-550.
- Hagberg, B.; Hanefeld, F.; Percy, A.; Skjeldal, O. (2002):** An update on clinically applicable diagnostic criteria in Rett syndrome. Comments. In: *Eur J Paediatr Neurol*, Jg. 6, H. 5, S. 293-297.
- Hanashima, C.; Li, S. C.; Shen, L.; Lai, E.; Fishell, G. (2004):** Foxg1 suppresses early cortical cell fate. In: *Science*, Jg. 303, H. 5654, S. 56-59.
- Hébert, J. M.; Fishell, G. (2008):** The genetics of early telencephalon patterning: some assembly required. In: *Nat Rev Neurosci*, Jg. 9, H. 9, S. 678-685.
- Hentze, M. W.; Kulozik, A. E. (1999):** A perfect message: RNA surveillance and nonsense-mediated decay. In: *Cell*, Jg. 96, H. 3, S. 307-310.
- Huppke, P.; Bohlander, S.; Kramer, N.; Laccone, F.; Hanefeld, F. (2002):** Altered methylation pattern of the G6 PD promoter in Rett syndrome. In: *Neuropediatrics*, Jg. 33, H. 2, S. 105-108.
- Huppke, P.; Held, M.; Laccone, F.; Hanefeld, F. (2003):** The spectrum of phenotypes in females with Rett Syndrome. In: *Brain Dev*, Jg. 25, H. 5, S. 346-351.
- Jacob, F. D.; Ramaswamy, V.; Andersen, J.; Bolduc, F. V. (2009):** Atypical Rett syndrome with selective FOXP1 deletion detected by comparative genomic hybridization: case report and review of literature. In: *Eur J Hum Genet*, Jg. 17, H. 12, S. 1577-1581

- Jordan, T.; Hanson, I.; Zaletayev, D.; Hodgson, S.; Prosser, J.; Seawright, A. (1992):** The human PAX6 gene is mutated in two patients with aniridia. In: *Nat Genet*, Jg. 1, H. 5, S. 328-332. Online verfügbar unter doi:10.1038/ng0892-328.
- Kalscheuer, V. M.; Tao, J.; Donnelly, A.; Hollway, G.; Schwinger, E.; Kubart, S. (2003):** Disruption of the serine/threonine kinase 9 gene causes severe X-linked infantile spasms and mental retardation. In: *Am J Hum Genet*, Jg. 72, H. 6, S. 1401-1411.
- Kleinjan, D. J.; van Heyningen, V. (1998):** Position effect in human genetic disease. In: *Hum Mol Genet*, Jg. 7, H. 10, S. 1611-1618.
- Kleinjan, D. A.; van Heyningen, V. (2005):** Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. In: *Am J Hum Genet*, Jg. 76, H. 1, S. 8-32.
- Kretz, K.; Callen, W.; Hedden, V. (1994):** Cycle sequencing. *PCR Methods Appl* 3, S107-112.
- Leonard, H.; Bower, C. (1998):** Is the girl with Rett syndrome normal at birth? In: *Devel. Med. Child Neurol.*, H. 40, S. 115-121.
- Li, J.; Vogt, P. K. (1993):** The retroviral oncogene qin belongs to the transcription factor family that includes the homeotic gene fork head. In: *Proc Natl Acad Sci U S A*, Jg. 90, H. 10, S. 4490-4494.
- Matijevic, T.; Knezevic, J.; Slavica, M.; Pavelic, J. (2009):** Rett syndrome: from the gene to the disease. In: *Eur Neurol*, Jg. 61, H. 1, S. 3-10.
- Mencarelli, M.A.; Kleefstra, T.; Katzaki, E.; Papa, F. T.; Cohen, M.; Pfundt, R. (2009):** 14q12 Microdeletion syndrome and congenital variant of Rett syndrome. In: *Eur J Med Genet*, Jg. 52, H. 2-3, S. 148-152.
- Mencarelli, M.A.; Spanhol-Rosseto, A.; Artuso, R.; Rondinella, D.; Filippis, R.; Bahi-Buisson, N.; Nectoux, J.; Rubinsztajn, R.; Bienvenu, T.; Moncla, A.; Chabrol, B.; Villard, L.; Krumina, Z.; Armstrong, J.; Roche, A.; Pineda, M.; Gak, E.; Mari, F.; Ariani, F.; Renieri, A. de (2009):** Novel FOXP1 mutations associated with the congenital variant of Rett syndrome. In: *J Med Genet*, Jg. 47, H. 1, S. 49-53
- Monros, E.; Armstrong, J.; Aibar, E.; Poo, P.; Canos, I.; Pineda, M. (2001):** Rett syndrome in Spain: mutation analysis and clinical correlations. In: *Brain Dev*, Jg. 23 Suppl 1, S. 251-253.
- Mullis, K. B.; Faloona, F. A. (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. In: *Methods in enzymology*, Jg. 155, S. 335-350.
- Murphy, D. B.; Wiese, S.; Burfeind, P.; Schmudt, D.; Mattei, M. G.; Schulz-Schaeffer, W.; Thies, U. (1994):** Human brain factor 1, a new member of the fork head gene family. In: *Genomics*, Jg. 21, H. 3, S. 551-557.
- Orita, M.; Iwahana, H.; Kanazawa, H.; Hayashi, K.; Sekiya, T. (1989):** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 86, H. 8, S. 2766-2770.
- Papa, F. T.; Mencarelli, M. A.; Caselli, R.; Katzaki, E.; Sampieri, K.; Meloni, I. (2008):** A 3 Mb deletion in 14q12 causes severe mental retardation, mild facial dysmorphisms and Rett-like features. In: *Am J Med Genet*, Jg. 146A, H. 15, S. 1994-1998.
- Percy, A. K.; Lane, J. B. (2005):** Rett syndrome: model of neurodevelopmental disorders. In: *J Child Neurol*, Jg. 20, H. 9, S. 718-721.

- Philippe, C.; Amsellem, D.; Francannet, C.; Lambert, L.; Saunier, A.; Verneau, F.; Jonveaux, P. (2010):** Phenotypic variability in Rett syndrome associated with FOXP1 mutations in females. In: *J Med Genet*, Jg. 47, H. 1, S. 59–65
- Read, A.; P.; Strachan, T. (1999):** Human molecular genetics. 2. Aufl. Oxford [u.a.]: BIOS Scientific Publ.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, Jg. 74, H. 12, S. 5463-5467.
- Scala, E.; Ariani, F.; Mari, F.; Caselli, R.; Pescucci, C.; Longo, I. (2005):** CDKL5/STK9 is mutated in Rett syndrome variant with infantile spasms. In: *J Med Genet*, Jg. 42, H. 2, S. 103-107.
- Sekul, E. A.; Moak, J. P.; Schultz, R. J.; Glaze, D. G.; Dunn, J. K.; Percy, A. K. (1994):** Electrocardiographic findings in Rett syndrome: an explanation for sudden death? In: *J Pediatr*, Jg. 125, H. 1, S. 80-82.
- Shoichet, S. A.; Kunde, S. A.; Viertel, P.; Schell-Apacik, C.; von Voss, H.; Tommerup, N. (2005):** Haploinsufficiency of novel FOXP1B variants in a patient with severe mental retardation, brain malformations and microcephaly. In: *Hum Genet*, Jg. 117, H. 6, S. 536-544.
- Tan, K.; Shaw, A. L.; Madsen, B.; Jensen, K.; Taylor-Papadimitriou, J.; Freemont, P. S. (2003):** Human PLU-1 Has transcriptional repression properties and interacts with the developmental transcription factors BF-1 and PAX9. In: *J Biol Chem*, Jg. 278, H. 23, S. 20507-20513.
- Tao, J.; Van, Esch H.; Hagedorn-Greiwe, M.; Hoffmann, K.; Moser, B.; Raynaud, M. (2004):** Mutations in the X-linked cyclin-dependent kinase-like 5 (CDKL5/STK9) gene are. In: *Am J Hum Genet*, Jg. 75, H. 6, S. 1149-1154.
- Tao, W.; Lai, E. (1992):** Telencephalon-restricted expression of BF-1, a new member of the HNF-3/fork head. In: *Neuron*, Jg. 8, H. 5, S. 957-966.
- Weaving, L. S.; Christodoulou, J.; Williamson, S. L.; Friend, K. L.; McKenzie, O. L.; Archer, H. (2004):** Mutations of CDKL5 cause a severe neurodevelopmental disorder with infantile. In: *Am J Hum Genet*, Jg. 75, H. 6, S. 1079-1093.
- Williamson, S. L.; Christodoulou, J. (2006):** Rett syndrome: new clinical and molecular insights. In: *Eur J Hum Genet*, Jg. 14, H. 8, S. 896-903.
- Xuan, S.; Baptista, C. A.; Balas, G.; Tao, W.; Soares, V. C.; Lai, E. (1995):** Winged helix transcription factor BF-1 is essential for the development of the cerebral hemispheres. In: *Neuron*, Jg. 14, H. 6, S. 1141-1152.
- Yao, J.; Lai, E.; Stifani, S. (2001):** The winged-helix protein brain factor 1 interacts with groucho and hes proteins. In: *Mol Cell Biol*, Jg. 21, H. 6, S. 1962-1972.
- Zappella, M.; Meloni, I.; Longo, I.; Hayek, G.; Renieri, A. (2001):** Preserved speech variants of the Rett syndrome: molecular and clinical analysis. In: *Am J Med Genet*, Jg. 104, H. 1, S. 14-22.

VIII. Danksagung

Zunächst möchte ich mich bei Herrn Professor Dr. Andreas Gal bedanken, der mir die Promotion am Institut für Humangenetik ermöglichte.

Mein besonderer Dank gilt jedoch Frau Professor Dr. Kerstin Kutsche, die zuerst durch ihre anregenden Seminare mein Interesse an der Humangenetik geweckt hat und mich im Prozess meiner Promotion immer mit außerordentlicher Geduld und zahlreichen weiterführenden Ratschlägen begleitete.

Bei Herrn Dr. Gökhan Uyanik möchte ich mich besonders für die Hilfe bei schwierigen Fragen, aber vor allem für viele lustige Momente bedanken.

Weiterhin möchte ich mich beim gesamten Laborteam, insbesondere bei Inka Jantke, für die Einarbeitung und permanente Unterstützung bedanken.

Ich bedanke mich bei meiner Mutter, ohne deren Unterstützung und Liebe ich dieses Studium nicht geschafft hätte, und bei meinem Vater, den ich immer in meiner Erinnerung tragen werde.

Mein größter Dank gilt jedoch meiner Freundin Nina, die mich seit Jahren auf meinem Weg begleitet und die ich von ganzem Herzen liebe.

X. Eidesstattliche Versicherung

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

Unterschrift:

Max Flindt

Große Teile dieser Arbeit wurden bereits in der Publikation: **Kortüm, F.; Das, S.; Flindt, M.; Morris-Rosendahl, D. J.; Stefanova, I.; Goldstein, A. et al. (2011):** The core FOXP1 syndrome phenotype consists of postnatal microcephaly, severe mental retardation, absent language, dyskinesia, and corpus callosum hypogenesis. In: J Med Genet, Jg. 48, H. 6, S. 396-406. veröffentlicht.