

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin

Institut für Humangenetik

Institutsdirektor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

Mutations- und Funktionsanalyse von Proteinen aus dem RAS- MAPK-Signalweg, die im Zusammenhang mit den neuro-kardio- fazio-kutanen Syndromen stehen

Dissertation

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

vorgelegt von:

Sybille Lorenz

aus Lörrach

Hamburg 2013

**Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 08.08.2013**

**Veröffentlicht mit Genehmigung der
medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.**

Prüfungsausschuss, der/die Vorsitzende: Prof. Dr. Kerstin Kutsche

Prüfungsausschuss, zweite/r Gutachter/in: Prof. Dr. Manfred Jücker

Prüfungsausschuss, dritte/r Gutachter/in: PD Dr. Jonas Denecke

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	V
I. Arbeitshypothese und Fragestellung	1
II. Einleitung	3
1 Der RAS-MAPK-Signalweg.....	3
2 „RASopathien“: Erkrankungen, die durch Mutationen in für Proteine des RAS-MAPK-Signalwegs kodierenden Genen verursacht werden ..	5
2.1 Erkrankungen aus dem neuro-kardio-fazio-kutanen (NCFC)-Spektrum	5
2.1.1 Das Noonan-Syndrom	5
2.1.2 Das kardio-fazio-kutane (CFC)-Syndrom	7
2.1.3 Das Costello-Syndrom	8
2.2 Die hereditäre Gingivafibromatose	10
3 Suche nach neuen Krankheitsgenen und möglichen Patho- mechanismen	12
3.1 Neue Kandidatengene für Syndrome aus den NCFC-Spektrum- erkrankungen	12
3.2 Möglicher Pathomechanismus der hereditären Gingivafibromatose	14
III. Material und Methoden	18
1 Material	18
1.1 Patientenkollektive und DNAs	18
1.2 Chemikalien und Lösungsmittel.....	22
1.3 Gerätschaften.....	23
1.4 Medien, Zusätze, Puffer und Lösungen	24
1.4.1 Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten.....	24
1.4.1.1 Lösungen für Mini-DNA-Präparation aus <i>E.coli</i>	25
1.4.2 Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten	25
1.4.3 PCR-Puffer.....	25
1.4.4 Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese	26
1.4.5 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten.....	26
1.4.6 Puffer und Medien für die Aufreinigung von GST-Proteinen	27
1.4.7 Sonstige Puffer	28
1.5 Enzyme	28

1.6 Kits und Längenstandards	28
1.7 Zelllinien	28
1.8 <i>E. coli</i> -Bakterienstämme	29
1.9 Oligonukleotide.....	29
1.9.1 Oligonukleotide für die Mutationsanalyse der Gene <i>SHOC2</i> , <i>GNAI2</i> und <i>ERBB4</i> .	29
1.9.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung der <i>SOS1</i> -Plasmide.....	30
1.9.3 Oligonukleotide für die Mutationseinführung und Herstellung der <i>SOS1</i> - und <i>HRAS</i> -Konstrukte.....	30
1.9.4 Mikrosatelliten-Marker.....	30
1.10 Plasmide	31
1.10.1 Ausgangskonstrukte	31
1.10.2 Ausgangsvektoren für Klonierungen.....	31
1.10.3 Mithilfe der GATEWAY™-Technologie hergestellte Konstrukte für die eukaryotische Expression.....	31
1.10.4 Nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Konstrukte	32
1.11 Antikörper.....	32
1.11.1 Primärantikörper.....	32
1.11.2 Sekundärantikörper und konjugierte Primärantikörper	33
1.12 Datenbanken und Computerprogramme.....	33
2 Methoden	34
2.1 Molekularbiologische Methoden	34
2.1.1 Anzucht von <i>E.coli</i>	34
2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen für die Transformation	34
2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus <i>E.coli</i>	35
2.1.3.1 Minipräparation	35
2.1.3.2 Maxi-Präparation	35
2.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA	36
2.1.5 Restriktionsanalyse von DNA	36
2.1.6 Agarosegelelektrophorese	37
2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	37
2.1.7.1 PCR-Mutagenese	40
2.1.8 Aufreinigung von PCR-Produkten.....	43
2.1.9 DNA-Sequenzierung	43
2.1.10 Mikrosatellitenanalyse für Elternschaftsnachweis	44
2.1.11 Amplifikation von genomischer DNA	45
2.2 Klonierungen	46
2.2.1 Klonierung mittels der TOPO™-Klonierungs-Technologie als Basis für das GATEWAY-System.....	46

2.2.2	Klonierung mittels GATEWAY™- Technologie	46
2.2.3	Transformation kompetenter <i>E.coli</i> -Zellen mit Plasmid-DNA	47
2.3	Proteinbiochemische Methoden.....	47
2.3.1	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)	47
2.3.2	Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Western-Blot)	48
2.3.3	Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf Membranen	48
2.3.4	Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen	49
2.3.5	Zellyse und GST-Pull-Down-Experimente	50
2.4	Zellbiologische Methoden.....	52
2.4.1	Zellkultur	52
2.4.1.1	Allgemeine Kulturbedingungen.....	52
2.4.1.2	Passagieren von Zellen	52
2.4.1.3	Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen.....	52
2.4.2	Stimulation der Zellen mit Anisomycin.....	53
IV.	Ergebnisse	54
1	Mutationsanalyse der Gene <i>SHOC2</i>, <i>GNAI2</i> und <i>ERBB4</i> bei Patienten mit Verdacht auf eine Erkrankung aus dem Spektrum der NCFC-Erkrankungen.....	54
1.1	Vorbemerkungen.....	54
1.2	PCR-Amplifikation eines Teils des Exons 2 von <i>SHOC2</i> und Nachweis der Mutation c.4A>G mittels Restriktionsspaltung.....	54
1.3	PCR-Amplifikation ausgewählter Exons des <i>GNAI2</i> -Gens und anschließende direkte DNA-Sequenzierung	57
1.4	PCR-Amplifikation ausgewählter Exons des <i>ERBB4</i> -Gens und anschließende direkte DNA-Sequenzierung	58
2	Funktionsanalyse der bei einer Patientin mit Costello-Syndrom identifizierten HRAS^{E63_D69dup}-Mutation	59
2.1	Vorbemerkungen.....	59
2.2	Analyse der Aktivierung und Effektorenbindung von HRAS mittels GTPase-Kopräzipitation	60
2.3	Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener HRAS-Varianten auf RAS-abhängige Signalkaskaden	62
3	Untersuchungen zur Aufklärung eines möglichen intrazellulären Signalweges von SOS1 zur MAP-Kinase MKK6	63

3.1	Vorbemerkungen.....	63
3.2	Herstellung der SOS1-Konstrukte und Nachweis der SOS1-Expression	64
3.3	Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung des Phosphorylierungszustands von MKK6	67
3.3.1	Auswahl einer geeigneten Zelllinie	67
3.3.2	Untersuchungen zum Einfluss von Anisomycin auf den Phosphorylierungszustand von MKK6.....	68
3.3.3	Analyse der Phosphorylierung von MKK6 nach Überexpression von SOS1-Varianten in HeLa-Zellen	69
3.4	Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2	70
V.	Diskussion.....	72
1	Keine pathogene Mutation in den Kandidatengen <i>GNAI2</i> und <i>ERBB4</i> bei Patienten mit Noonan-, CFC- oder Costello-Syndrom.....	72
2	Sechs Patienten mit Noonan-Syndrom und der pathogenen c.4A>G (p.S2G)-Mutation in <i>SHOC2</i>.....	74
3	Gesteigerte HRAS-Aktivität und ERK1/2-Phosphorylierung bei unveränderter AKT-Phosphorylierung durch die p.E63_D69dup-Mutation in <i>HRAS</i>.....	77
4	Kein nachweisbarer Zusammenhang zwischen der c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation in <i>SOS1</i> und einer erhöhten Phosphorylierung von MKK6 bzw. ERK1/2	80
4.1	Sind andere Gene aus der Region 17q24.2-q24.3 mit der Entstehung einer Gingivahyperplasie in Verbindung zu bringen?	82
4.2	Die dreifache Kopie des <i>MAP2K6</i> -Gens - doch Ursache der Gingivahyperplasie?	86
VI.	Zusammenfassung	91
	Literaturverzeichnis	VIII
	Publikationen und Präsentationen	XXI
	Danksagung.....	XXII
	Lebenslauf	XXIII
	Eidesstattliche Erklärung	XXIV

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
μ	mikro
A	Adenin
AA	Acrylamid
Abb.	Abbildung
ad	addieren (auffüllen auf die angegebene Menge)
AG	Arbeitsgemeinschaft
Amp	Ampicillin
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua bidest.	Aqua bidestillata (zweifach destilliertes Wasser)
Aqua dest.	Aqua destillata (destilliertes Wasser)
AS	Aminosäure(n)
ASD	Vorhofseptumdefekt
ARAF	<i>v-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>
Array-CGH	Microarray-basierte comparative genomische Hybridisierung
BAA	Bisacrylamid
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
Bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>bovine serum albumine</i>
BRAF	<i>v-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
c.	Nukleotidposition in der Kodierregion eines Gens (<i>coding sequence</i>)
CBL	<i>Cas-Br-M (murine) ecotropic retroviral transforming sequence</i>
cDNA	copy-Desoxyribonukleinsäure
CFC-Syndrom	<i>cardio-facio-cutaneous</i> (kardio-fazio-kutanes) Syndrom
CNV	<i>copy number variation</i>
COOH-Terminus	Carboxyterminus eines Proteins
CRAF/RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
CREB1	<i>cAMP response element-binding protein 1</i>
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> (Zellkulturmedium)
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNAse	Desoxyribonuklease
dNTP, ddNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, Didesoxy-Nukleosid-Triphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	<i>epidermal growth factor</i>
ERBB4	<i>v-erb-a erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 4</i>
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	„et altera“ (und Andere)
EtOH	Ethanol
FBS	<i>fetal bovine serum</i>
FS	Fail Safe
fs	<i>frameshift</i>

g, mg, µg	Gramm, Milligramm, Mikrogramm
G	Guanin
GAP	<i>GTPase activating protein</i> (GTPase aktivierendes Protein)
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
GDP	Guanosin-5'-diphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GNAI2	<i>guanine nucleotide binding protein, alpha inhibiting activity polypeptide 2</i>
G-Protein	Guaninnukleotid-bindendes Protein
GRB2	<i>growth factor receptor bound protein 2</i>
GTP	Guanosin-5'-triphosphat
GTPase	GDP/GTP-bindendes Protein mit GTPase-Aktivität
h	<i>hour</i> , Stunde
HA	Humanes Hämagglutinin
HCM	Hypertrophe Kardiomyopathie
HeLa	Humane Zelllinie, Cervixkarzinom
HPLC	<i>high pressure liquid chromatography</i> (Chromatographieverfahren)
HRAS	<i>v-ha-ras harvey-rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
HRP	<i>horseradish peroxidase</i> (Meerrettich-Peroxidase)
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
JMML	Juvenile Myelomonozytäre Leukämie
Kb	Kilobase
KDa	Kilodalton
Km	Kanamycin
KRAS	<i>v-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LB	Luria-Broth-Medium
cm, mm, µm, nm	Zentimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
mA	Milli-Ampère
M	Mol
MAP-Kinase/MKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase
MAPKKK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase-Kinase-Kinase
MEK1/2	Mitogen-aktivierte ERK-Kinase 1/2
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
min	Minute
mol, mmol, µmol	Mol, Millimol, Mikromol
Mut	Mutation
NCFC-Syndrom	<i>neuro-cardio-facio-cutaneous</i> (neuro-kardio-fazio-kutanes) Syndrom
NF1	Neurofibromin 1
NH ₂ -Terminus	Aminoterminus eines Proteins
NRAS	<i>neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
OD	Optische Dichte
o.e.	oben erwähnt
p38	p38 Mitogen-aktivierte Proteinkinase
PAA	Polyacrylamid
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PD	Privatdozent

PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIK3CA	Katalytische Einheit von PI3K
PLC	Phospholipase C Typ
PTPN11	<i>protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11</i>
PVDF	Polyvinylidendifluorid
Rac1	<i>Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1</i>
RAF1	<i>v-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RALGDS	<i>Ral Guanine nucleotide Dissociation Stimulator</i>
RAS	<i>rat sarcoma</i>
Rem	<i>ras exchanger motif</i>
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SHOC2	<i>soc-2 suppressor of clear homolog (C. elegans)</i>
SHP2	Src-Homologieregion 2 beinhaltende Phosphatase 2
SNP	<i>single nucleotide polymorphisme</i>
SOS1	<i>son of sevenless, homolog 1, Drosophila</i>
SP1	<i>specific-protein 1</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Tabl.	Tablette
TBS	<i>Tris-buffered saline</i>
TBS-T	TBS + Tween 20
TE	Tris-EDTA
TEMED	N'-N'-N'-N'-Tetramethylethylendiamin
TGF	<i>transforming growth factor</i>
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
Tween 20	Polyoxyethylensorbitan-Monolaurat
U	<i>Units</i>
u.a.	unter anderem
Upm	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
VSD	Ventrikelseptum-Defekt
v/v	<i>volume per volume</i>
WB	Western-Blot
wt	Wildtyp
w/v	<i>weight per volume</i>
z. B.	zum Beispiel

I. Arbeitshypothese und Fragestellung

Im Mittelpunkt dieser Arbeit steht der RAS-MAPK-Signalweg, der eine wichtige Rolle beim Zellwachstum und der Zelldifferenzierung spielt. Konstitutionelle, zu einer Überaktivität in diesem Signalweg führende genetische Veränderungen sind mit Erkrankungen vergesellschaftet, die unter dem Begriff der neuro-kardio-fazio-kutanen (*neuro-cardio-facio-cutaneous*; NCFC)-Syndrome oder RASopathien zusammengefasst werden. Hierzu zählen u. a. das Noonan-Syndrom, das Costello-Syndrom und das kardio-fazio-kutane (CFC)-Syndrom. Phänotypisch gibt es Überschneidungen zwischen diesen drei Erkrankungen, zu denen Kleinwuchs, variable Intelligenzminderung, angeborene Herzfehler, kraniofaziale Auffälligkeiten sowie ektodermale Veränderungen gehören. Bei etwa 70-80% der Betroffenen kann eine pathogene Mutation nachgewiesen werden, so dass von weiteren kausalen Genen für diese Krankheitsgruppe auszugehen ist. Kurz vor Beginn dieser Arbeit wurde bei Patienten mit Noonan-Syndrom eine wiederkehrende pathogene Mutation [c.4A>G (p.S2G)] im *SHOC2*-Gen beschrieben. Daher sollten DNAs eines Kollektivs aus 186 mutationsnegativen Patienten mit RASopathie-Phänotyp mittels Restriktionsverdau auf diese Mutation hin untersucht werden, um eine präzisere Genotyp-Phänotyp-Korrelation herauszuarbeiten. Von zwei neuen funktionellen Kandidatengenen (*GNAI2* und *ERBB4*) wurden einige Exons ausgewählt, die bei 219 bzw. 19 mutationsnegativen Patienten mittels PCR und anschließender direkter Sequenzierung auf Mutationen hin untersucht werden sollten.

Neben dem Nachweis krankheitsrelevanter Mutationen sollten in dieser Arbeit die funktionellen Auswirkungen der neuen, bei einer Patientin mit Costello-Syndrom identifizierten *HRAS*-Mutation c.187_207dup (p.E63_D69dup) analysiert werden. Mittels GTPase-Pulldown-Experimenten und Western-Blot-Analyse wurden die Auswirkungen der Duplikation von sieben Aminosäuren im *HRAS*-Protein auf die Aktivierung der kleinen GTPase selbst, *HRAS*-abhängige Signalwege sowie auf die Interaktion mit deren Effektoren untersucht.

Interessanterweise zeigt die hereditäre Gingivafibromatose ebenfalls eine Verbindung zum RAS-MAPK-Signalweg. Die bei mehreren Betroffenen einer großen Familie gefundene c.3248dupC (p.R1084Kfs*22)-Mutation im *SOS1*-Gen (kodiert für einen Guaninnukleotidaustauschfaktor für RAS) führt ebenfalls zu einer verstärkten Signalweitergabe in dieser Kaskade. Die Befunde, dass sowohl Patienten mit der o. g. *SOS1*-Mutation, als auch Patienten mit *gain-of-function*-Mutationen in *HRAS* und Patienten mit einer das *MAP2K6*-Gen (kodiert für die MAP Kinase-Kinase 6; MKK6) umfassenden Duplikation eine Gingivafibromatose aufweisen, führte zu der Hypothese,

dass ein noch nicht beschriebener Signalweg von SOS1 über HRAS zur MKK6 existieren könnte, dessen Überaktivität ursächlich für die Gingivafibromatose sein könnte. Zum Nachweis einer SOS1-HRAS-MKK6-Signalkaskade sollte ein Zellsystem etabliert werden, in welchem nach ektopischer Expression von SOS1-Wildtyp bzw. – Mutante (p.R1084Kfs*22) der Aktivitätszustand von MKK6 mittels proteinbiochemischer Methoden untersucht werden konnte.

II. Einleitung

1 Der RAS-MAPK-Signalweg

Durch aktive RAS (*rat sarcoma*)-Proteine kommt es in der Zelle zur Aktivierung einer Signalkaskade aus Mitogen-aktivierten Protein-Kinasen (MAPK). Dieser sogenannte RAS-MAPK-Signalweg spielt eine wesentliche Rolle beim Zellwachstum, bei der Zelldifferenzierung und der Apoptose (Bardwell 2006). Die Aktivierung dieses Signalweges erfolgt über unterschiedliche extrazelluläre Stimuli (Qi und Elion 2005), wie die Ligandenbindung an einen Tyrosinkinase-Rezeptor, z. B. den epidermalen Wachstumsfaktor (*epidermal growth factor*, EGF)-Rezeptor. Hierbei kommt es zu einer Dimerisierung des Rezeptors und zur Autophosphorylierung von Tyrosinresten am intrazellulären Rezeptoranteil. Daraufhin werden verschiedene Adapterproteine an den Rezeptor rekrutiert, an welche u. a. die Protein-Tyrosin-Phosphatase SHP2 (Src-Homologieregion 2 beinhaltende Phosphatase 2) bindet. SHP2 wird vom *PTPN11* (*protein tyrosine phosphatase, non-receptor type 11*)-Gen kodiert. Diese Phosphatase aktiviert auf bisher noch nicht ganz verstandene Art und Weise RAS-GTPasen, zu denen u. a. NRAS, KRAS und HRAS zählen. RAS-Proteine gehören zur Familie der kleinen G-Proteine und können in zwei verschiedenen Aktivitätszuständen vorliegen. Im inaktiven Zustand ist GDP gebunden. Mithilfe von Guaninnukleotid-Austauschfaktoren (GEFs) kommt es zum Austausch von GDP nach GTP und somit zur Aktivierung. Einer dieser GEFs ist das SOS1 (*son of sevenless, homolog 1, Drosophila*)-Protein, das über ein Adapterprotein (GRB2) an die dimerisierten Tyrosinkinase-Rezeptoren bindet. Durch Hydrolyse und Abspaltung eines Phosphatrestes entsteht die inaktive, GDP-gebundene Form der RAS-Proteine. Dieser Vorgang wird durch GTPase-aktivierende Proteine (GAPs) beschleunigt. Hierzu zählt u. a. das Neurofibromin, welches durch das *NF1*-Gen kodiert wird (Feig und Buchsbaum 2002, Bardwell 2006).

Im aktiven, GTP-gebundenen Zustand sind RAS-Proteine in der Lage, unterschiedliche intrazelluläre Signalwege zu aktivieren, u. a. den RAS-MAPK-Signalweg. Hierbei kommt es über eine Kinase-Kaskade zur Signalweitergabe bis in den Zellkern. Die am besten untersuchte Kaskade ist die RAF (*rapidly accelerated fibrosarcoma*)-MEK (Mitogen-aktivierte ERK-Kinase)-ERK (extrazellulär regulierte Kinase)-Kaskade. Hierbei aktiviert GTP-gebundenes RAS eine RAF-Kinase (ARAF, BRAF oder CRAF), die wiederum die Kinasen MEK1 und MEK2 phosphoryliert und somit aktiviert. MEK1 und MEK2 aktivieren ihrerseits durch Phosphorylierung ERK-Kinasen, die dann in den Zellkern translozieren und dort durch Phosphorylierung verschiedene Transkriptionsfaktoren aktivieren (Bardwell 2006, Feig und Buchsbaum 2002).

Aktive RAS-Proteine sind in der Lage, neben den RAF-Kinasen auch andere Effektor-Proteine zu aktivieren. Hierzu zählen die Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K), RALGDS (*Ral guanine nucleotide dissociation stimulator*)-Proteine und die Phospholipase C (PLC). Die RAS-Proteine spielen somit eine zentrale Rolle im intrazellulären Netzwerk der Signalwege (Qi und Elion 2005). Die nachfolgende Abbildung gibt einen schematischen Überblick über den RAS-RAF-MAPK-Signalweg.

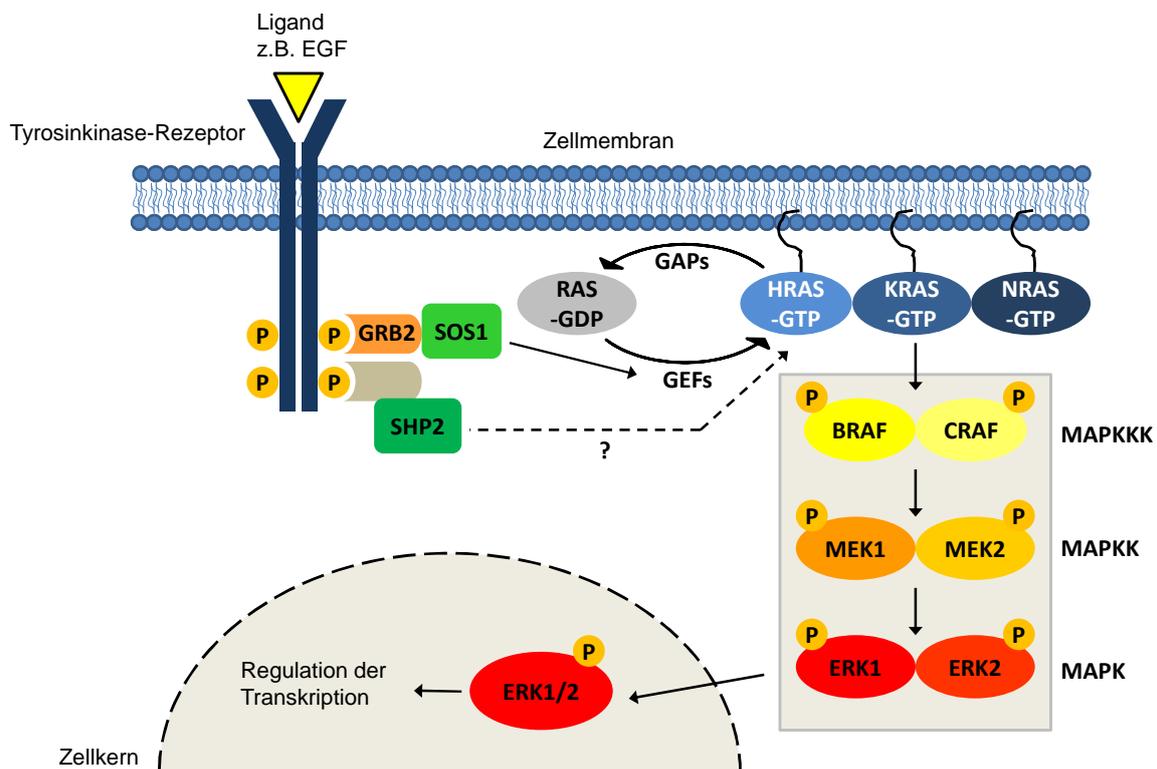


Abb. 1: Schematische Darstellung des RAS-RAF-MAPK-Signalweges

Die Bindung eines Liganden (z. B. EGF) an einen Tyrosinkinase-Rezeptor führt zur Dimerisierung und Autophosphorylierung intrazellulärer Rezeptoranteile. Diese phosphorylierten Domänen des aktivierten Tyrosinkinase-Rezeptors fungieren als Bindedomänen für Adapterproteine (GRB2). Dadurch wird SOS1 an die Zellmembran rekrutiert, wo es als GEF RAS-Proteine (HRAS, KRAS, NRAS) in den GTP-gebundenen, also aktiven Zustand überführt. RAS-GTP aktiviert die Kinase-Kaskade, die aus einer MAPK-Kinase-Kinase (MAPKKK), in diesem Fall BRAF/CRAF, einer MAPK-Kinase (MAPKK), in diesem Fall MEK1/2, und einer Mitogen-aktivierten Kinase (MAPK), hier ERK1/2, besteht. Phosphoryliertes ERK1/2 transloziert in den Zellkern, um verschiedene Transkriptionsfaktoren zu regulieren. Über diese wird die zelluläre Antwort auf den extrazellulären Stimulus kontrolliert. P: Phosphatrest, GRB2: *growth factor receptor bound protein 2*.

2 „RASopathien“: Erkrankungen, die durch Mutationen in für Proteine des RAS-MAPK-Signalwegs kodierenden Genen verursacht werden

Aufgrund der wichtigen Rolle der RAS-Proteine für das normale Zellwachstum ist es nicht überraschend, dass Mutationen in den entsprechenden Genen Krankheiten verursachen. Etwa 20-30% aller menschlichen Tumore weisen eine *gain-of-function*-Mutation in einem der *RAS*-Gene auf (Bos 1989). Die letzten Jahre brachten dann die zunächst erstaunliche Erkenntnis, dass heterozygote Keimbahn-Mutationen in Genen, die für Proteine des RAS-MAPK-Signalwegs kodieren, zu multisystemischen Krankheitsbildern führen. Hierzu zählen die im Folgenden näher beschriebenen Syndrome aus dem neuro-kardio-fazio-kutanen (*neuro-cardio-fazio-cutaneous*, NCFC)-Spektrum und die hereditäre Gingivafibromatose (HGF) (Häkkinen und Csiszar 2007, Denayer et al. 2008b, Tartaglia et al. 2011, Zenker 2011). Alle bisher bekannten Mutationen führen zu einer Funktionsveränderung des jeweiligen Proteins, die in einer verstärkten Signalweiterleitung innerhalb des RAS-MAPK-Signalwegs resultiert (Schubbert et al. 2007, Aoki et al. 2008, Tartaglia et al. 2011).

2.1 Erkrankungen aus dem neuro-kardio-fazio-kutanen (NCFC)-Spektrum

Die Hauptgruppe der „RASopathien“ umfasst Erkrankungen aus dem NCFC-Spektrum. Unter diesem Begriff werden mehrere Krankheitsbilder zusammengefasst, die gewisse phänotypische Überschneidungen aufweisen. Hierzu zählen u. a. die Neurofibromatose Typ I, die durch Mutationen im für ein GAP kodierenden *NF1*-Gen verursacht wird (Wallace et al. 1990, Cawthon et al. 1990, Viskochil et al. 1990), das LEOPARD-Syndrom, welches durch verschiedene Missense-Mutationen im *PTPN11*- oder *RAF1*-Gen hervorgerufen wird (Digilio et al. 2002) und das Legius-Syndrom, das durch heterozygote Mutationen im *SPRED1*-Gen bedingt wird. *SPRED1* hemmt die Interaktion zwischen aktiviertem RAS und RAF-Proteinen (Brems et al. 2007). Diese Arbeit beschäftigt sich mit drei Erkrankungen aus dem NCFC-Spektrum, dem Noonan-Syndrom (NS), dem kardio-fazio-kutanen (CFC)-Syndrom und dem Costello-Syndrom (CS), weswegen diese im Folgenden genauer erläutert werden.

2.1.1 Das Noonan-Syndrom

Das Noonan-Syndrom (MIM 163950) wurde erstmals 1963 von den beiden Ärztinnen Dr. Noonan und Dr. Ehmke beschrieben (Noonan und Ehmke 1963). Es handelt sich hierbei um eine klinisch heterogene Entwicklungsstörung, die an das Ullrich-Turner-Syndrom erinnert (Noonan 1968). Die Prävalenz dieses Krankheitsbildes wird mit

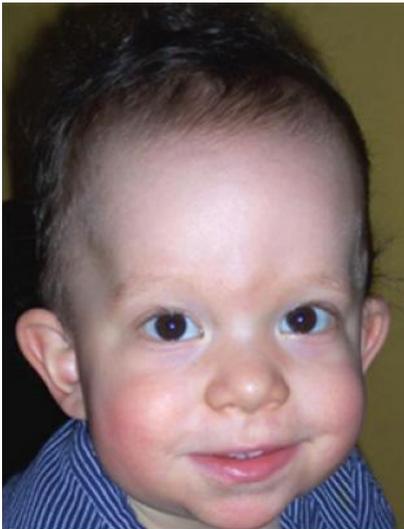


Abb. 2: Foto eines Patienten mit Noonan-Syndrom

Das Foto zeigt einen Patienten mit Noonan-Syndrom mit den klassischen fazialen Dysmorphien wie Hypertelorismus, eine breite Nasenwurzel sowie tief sitzende und nach hinten rotierte Ohren (Abbildung aus Mautner et al. 2010).

1:1000 bis 1:2500 angegeben (Allanson 1987, Mautner et al. 2010). Das klinische Bild ist geprägt von Kleinwuchs, angeborenen Herzfehlern, Brustfehlbildungen und Lernschwierigkeiten; bei männlichen Patienten tritt gehäuft ein Kryptorchismus auf (Noonan 1968, Cole 1980, Allanson 1987). Als typische faziale Auffälligkeiten findet man bei Patienten mit Noonan-Syndrom ein eher dreieckig wirkendes Gesicht, einen Hypertelorismus, eine Ptosis, nach außen unten abfallende Lidachsen, einen hohen Gaumen, tief ansetzende und nach hinten rotierte Ohren und einen breiten Nasenrücken (s. Abb. 2) (Mendez et al. 1985, Allanson 1987, Jorge et al. 2009, Tartaglia et al. 2010). Der am häufigsten auftretende Herzfehler ist die Pulmonalklappenstenose. Es finden sich auch eine hypertrophe Kardiomyopathie (HCM), Septierungsdefekte wie Atriumseptumdefekt (ASD) und Ventrikelseptum-

defekt (VSD) sowie andere Herzfehler, z. B. eine Fallot-Tetralogie (Zenker 2009, Mautner et al. 2010). Als weitere klinische Auffälligkeiten können Lymphödeme und eine erhöhte Blutungsneigung auftreten. Es besteht außerdem ein erhöhtes Risiko für die Entwicklung von Leukämien, insbesondere für die juvenile myelomonozytäre Leukämie (JMML) (Allanson 1987, Zenker 2009, Mautner et al. 2010).

Bisher sind Mutationen in sieben verschiedenen Genen als Ursache für das Noonan-Syndrom bekannt. Da bisher alle in den entsprechenden Krankheitsgenen gefundenen Mutationen in heterozygotem Zustand vorliegen, handelt es sich um einen autosomal-dominanten Vererbungsmodus. Meist handelt es sich um Neumutationen, es sind aber auch familiäre Fälle bekannt (Schollen et al. 2003, Bertola et al. 2004). Als erstes konnten Tartaglia und Kollegen (2001) heterozygot vorliegende Missense-Mutationen im *PTPN11*-Gen bei ungefähr 50% der untersuchten Patienten feststellen (Tartaglia et al. 2001). *PTPN11* kodiert wie oben bereits erwähnt für SHP2. Durch die Mutationen kommt es zur Hemmung der autoinhibitorischen Funktion des SHP2-Proteins, was in einer verstärkten Aktivierung von RAS und damit in einer erhöhten Aktivität des RAS-MAPK-Signalwegs resultiert (Tidyman und Rauen 2009). Am zweithäufigsten finden sich bei Patienten mit Noonan-Syndrom Mutationen in *SOS1* und zwar in 15-20% aller Fälle. Auch hierbei handelt es sich um heterozygot vorliegende *gain-of-function*-Mutationen, die in einer erhöhten Aktivität des Signalwegs resultieren (Roberts et al.

2007, Tartaglia et al. 2007). Missense-Mutationen im *RAF1*-Gen, das für CRAF kodiert, wurden bei etwa 10% der Patienten mit Noonan-Syndrom identifiziert (Pandit et al. 2007, Razzaque et al. 2007). Bei etwa 2% aller Betroffenen finden sich Mutationen im *KRAS*-Gen (Schubbert et al. 2006). Des Weiteren konnten in wenigen Fällen, bei vier von 917 untersuchten Patienten, auch Mutationen im *NRAS*-Gen gefunden werden (Cirstea et al. 2010). Ebenfalls sehr selten (<1%) können Mutationen im *CBL*-Gen vorliegen, das für ein Adapter-Protein mit Ubiquitin-Ligase Aktivität kodiert. CBL vermittelt die Ubiquitinierung von aktiven Tyrosinkinase-Rezeptoren. Dies führt zur Degradierung der Rezeptoren und damit zu einem Stopp des Signalfusses. Für die betroffenen Patienten wird ein erhöhtes Risiko für myeloproliferative Erkrankungen angenommen, da diese mit Mutationen im *CBL*-Gen assoziiert sind (Martinelli et al. 2010, Niemeyer et al. 2010, Pérez et al. 2010). Für eine kleine Patienten-Subgruppe mit Noonan-Syndrom, bekannt unter der Bezeichnung *Noonan-like syndrome with loose anagen hair* (MIM 607721), konnte die Arbeitsgruppe um Dr. Tartaglia eine wiederkehrende Missense-Mutation im *SHOC2*-Gen identifizieren. SHOC2 reguliert die Aktivierung der Kinase RAF1 (CRAF). Durch die c.4A>G (p.S2G)-Mutation kommt es zu einer cotranslationalen Modifizierung des SHOC2-Proteins, die in einer verstärkten Aktivierung des RAS-MAPK-Signalwegs resultiert (Cordeddu et al. 2009).

2.1.2 Das kardio-fazio-kutane (CFC)-Syndrom

Das kardio-fazio-kutane (CFC)-Syndrom (MIM 115150) wurde erstmals 1986 bei acht Patienten beschrieben, die als phänotypische Gemeinsamkeiten angeborene Herzfehler, typische faziale Dysmorphien, ektodermale Auffälligkeiten und Kleinwuchs aufwiesen (Reynolds et al. 1986). Weitere wichtige klinische Merkmale sind die bei fast allen Patienten vorkommende Intelligenzminderung und motorische Entwicklungsverzögerung (Roberts et al. 2006). Häufig auftretende angeborene Herzfehler bei diesen Patienten sind eine Pulmonalklappenstenose und eine HCM, ebenfalls kommen septale Defekte und andere Herzfehler vor (Roberts et al. 2006). Auch die fazialen Dysmorphien weisen Überschneidungen zum Noonan-Syndrom auf. Das Gesicht von Patienten mit CFC-Syndrom ist charakterisiert durch eine hohe prominente Stirn mit bitemporalen Einziehungen, weit auseinanderstehenden Augen mit nach außen abfallenden Lidachsen, eventuell vorhandenem Epikanthus, eine eingesunkene Nasenwurzel, eine kurze, relativ breite Nase und tief ansetzende und nach hinten rotierte Ohren (s. Abb. 3). Hinzu kommen ektodermale Auffälligkeiten wie kaum vorhandene Augenbrauen, spärliches und meist gelocktes Kopfhaar sowie ein insgesamt trockenes, hyperkeratotisches Hautbild. Bei normaler Geburtsgröße und

normalem Geburtsgewicht tritt postnatal häufig eine Gedeihstörung auf (Niihori et al. 2006, Roberts et al. 2006).

Bei 40-80% der Patienten mit CFC-Syndrom finden sich heterozygote Mutationen im *BRAF*-Gen (Niihori et al. 2006, Rodriguez-Viciano et al. 2006a). Auch Mutationen in *MEK1* und *MEK2* konnten in einigen Fällen (5-10%) als krankheits-



Abb. 3: Portrait einer Patientin mit CFC-Syndrom

Das Foto zeigt eine Patientin mit CFC-Syndrom mit den typischen fazialen Auffälligkeiten wie den tief sitzenden, nach hinten rotierten Ohren, den nach außen hin abfallenden Lidachsen, einer Ptosis und vollen Lippen. Außerdem fallen das lockige Haar und die kaum vorhandenen Augenbrauen auf (Abbildung aus Mautner et al. 2010).

verursachend identifiziert werden (Rodriguez-Viciano et al. 2006a). In sehr seltenen Fällen wurde auch von *KRAS*-Mutationen berichtet (Niihori et al. 2006). Es handelt sich stets um heterozygote Missense-Mutationen, die *de novo* vorliegen und zur verstärkten Aktivität des RAS-MAPK-Signalwegs führen.

2.1.3 Das Costello-Syndrom

Das klinische Bild des 1977 erstmals von Dr. Costello beschriebenen Syndroms (MIM 218040) ist gekennzeichnet durch charakteristische kraniofaziale Auffälligkeiten, eine Entwicklungsverzögerung und Gedeihstörung sowie durch angeborene Herzfehler und die Prädisposition für die Entwicklung von Tumoren (Costello 1977). Die Betroffenen haben eine mittelschwere bis schwere Intelligenzminderung. Die fazialen Dysmorphien sind denen des Noonan- und CFC-Syndroms sehr ähnlich. Patienten mit Costello-Syndrom haben eine relative Makrozephalie, eine hohe prominente Stirn, seitlich abfallende Lidachsen, einen Epikanthus, eine kleine Nase mit flachem Nasenrücken und tief ansetzende, nach hinten rotierte Ohren (s. Abb. 4). Vergleichbar mit dem CFC-Syndrom tritt auch bei Patienten mit Costello-Syndrom eine postnatale Gedeihstörung auf. Außerdem finden sich typische ektodermale Veränderungen, wie sehr weiche und überschüssig wirkende Haut, vor allem an den Handrücken, und meist lockiges, spärliches Kopfhaar (s. Abb. 4) (Hennekam 2003, Kerr et al. 2008). Ungefähr 60% der Patienten haben einen angeborenen Herzfehler. Meist handelt es sich hierbei um eine Pulmonalstenose oder eine HCM. Oft treten auch Herzrhythmusstörungen auf (Lin et al. 2002). Für die Betroffenen besteht ein erhöhtes Risiko Neoplasien zu entwickeln. Am häufigsten treten benigne Papillome auf. Aber auch maligne Rhabdomyosarkome,

Neuroblastome und Urothelkarzinome werden überdurchschnittlich häufig beobachtet (Gripp 2005).



(Foto aus Rauen 2007)



(Foto aus Aoki et al. 2005)

Abb. 4: Fotos von Patienten mit Costello-Syndrom

Das Portrait zeigt einen Patienten mit Costello-Syndrom mit den dafür typischen fazialen Dysmorphien wie grobe Gesichtszüge, spärliches, lockiges Haar, breiter Nasenrücken und tief sitzende Ohren. Im rechten Bild ist die überschüssige Haut an den Händen mit tiefen Palmarfurchen gezeigt.

Dem Costello-Syndrom liegen in der Mehrzahl der Fälle (>90%) heterozygote *de novo* Mutationen im *HRAS*-Gen zugrunde. Dabei handelt es sich fast ausschließlich um Missense-Mutationen, welche die Aminosäure Glycin an Position 12 oder 13 des Proteins betreffen und zu einem Funktionsgewinn des vom *HRAS*-Gen kodierten Proteins führen (Aoki et al. 2005, Gripp et al. 2006, Estep et al. 2006, Rauen 2007, Denayer und Legius 2007, Schulz et al. 2008, Gripp und Lin 2012). In einzelnen Fällen wurden auch Mutationen beschrieben, die andere Codons des *HRAS*-Gens betreffen: p.T58I (Gripp et al. 2008), p.K117R (Kerr et al. 2006, Denayer et al. 2008a), p.A146T/V (Zampino et al. 2007, Gripp et al. 2008), p.E37dup (Gremer et al. 2010). Diese Veränderungen scheinen mit einem milderem Phänotyp assoziiert zu sein. Während die Mutationen, welche die Aminosäurepositionen 12 und 13 betreffen, zu einer Resistenz gegenüber GAPs führen, wird die verstärkte Aktivität des HRAS-Proteins bei der p.K117R-Mutation durch einen erhöhten Austausch von GDP nach GTP erklärt (Scheffzek et al. 1997, Ahmadian et al. 1999, Denayer et al. 2008a). Bei der p.E37dup-Mutation konnte neben der vollständigen Resistenz gegenüber dem GAP Neurofibromin 1 und dem schnelleren Austausch von GDP zu GTP auch eine leicht verminderte intrinsische GTPase-Aktivität des HRAS-Proteins festgestellt werden (Gremer et al. 2010). Dies führt zu einem erhöhten Vorkommen von HRAS in aktivem Zustand. Da es aber aufgrund der p.E37dup-Mutation auch zu einer deutlichen Abnahme der Affinität von HRAS zu seinen Effektoren kommt, führt diese Mutation insgesamt eher zu einer schwachen Überaktivität des RAS-MAPK-Signalwegs und dadurch zu einem etwas milderem Phänotyp bei den Betroffenen (Gremer et al. 2010). Dies zeigt, dass das phänotypische Spektrum von den molekularen Konsequenzen der jeweiligen *HRAS*-Mutation abhängig ist. Bei einer türkischen Patientin mit klinischen Merkmalen des CS wurde die noch nicht beschriebene c.187_207dup-Mutation im

HRAS-Gen gefunden. Um detailliertere Kenntnisse über die molekularen Konsequenzen dieser Mutation zu erlangen und ggf. eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation etablieren zu können, sollten im Rahmen dieser Arbeit die funktionellen Auswirkungen dieser Mutation untersucht werden.

In der folgenden Abbildung sind die mit den drei Syndromen assoziierten Proteine aus dem RAS-RAF-MAPK-Signalweg dargestellt.

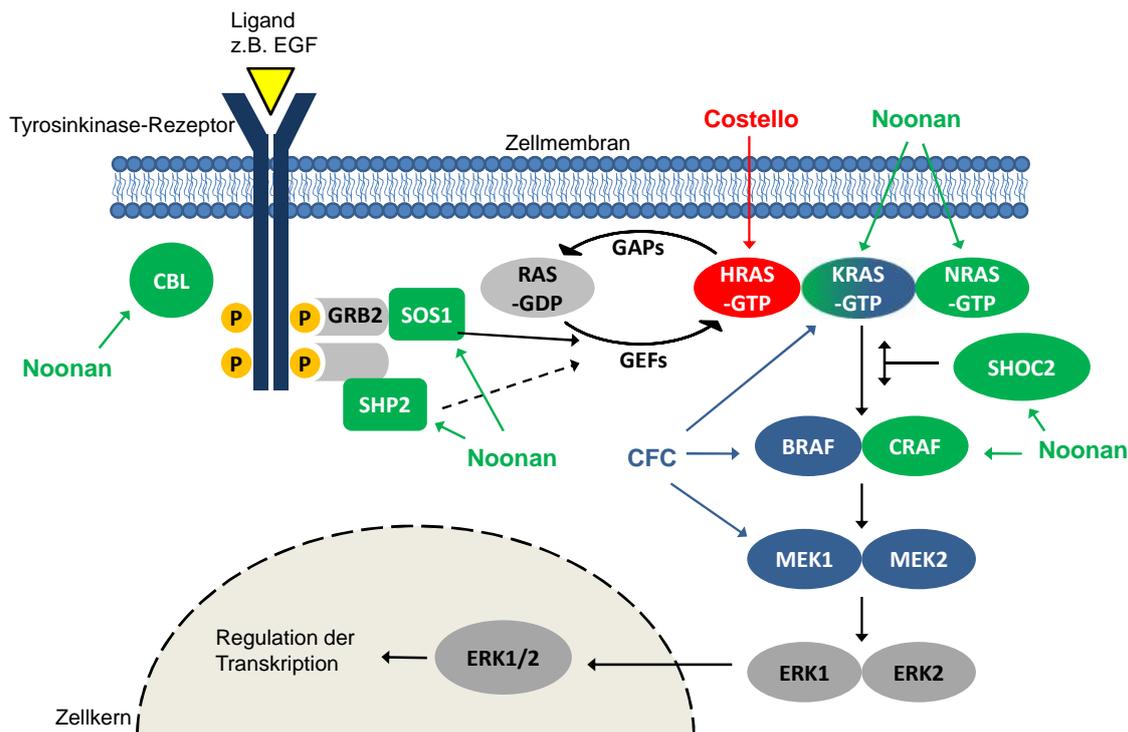


Abb. 5: Schematische Darstellung des RAS-RAF-MAPK-Signalwegs, inklusive der beim Noonan-, CFC- und Costello-Syndrom veränderten Proteine

In der Abbildung sind einige am RAS-RAF-MAPK-Signalweg beteiligte Proteine dargestellt. Grün sind die Proteine dargestellt, die nach Mutation in den kodierenden Genen das Noonan-Syndrom zur Folge haben. Mutationen in Genen, die für die blau dargestellten Proteine kodieren, führen zum CFC-Syndrom, während das Costello-Syndrom durch Mutationen im *HRAS*-Gen (rot) verursacht wird.

2.2 Die hereditäre Gingivafibromatose

Die Gingivafibromatose, auch bekannt unter dem Begriff der Gingivahyperplasie, tritt meist als Nebenwirkung von Medikamenten auf. In seltenen Fällen ist diese abnorme Wucherung des Zahnfleisches erblich bedingt und wird dann als hereditäre Gingivafibromatose (HGF) (MIM 135300) bezeichnet. Sie kann in Zusammenhang mit Syndromen, wie z. B. dem Zimmermann-Laband-Syndrom (MIM 135500) und dem Costello-Syndrom, auftreten oder mit anderen klinischen Merkmalen, wie einer

Hypertrichose oder Intelligenzminderung, kombiniert sein. Es wurden auch Fälle von isoliert auftretender HGF beschrieben (Häkkinen und Csiszar 2007, Gorlin et al. 1990).

Klinisch äußert sich die HGF als gutartige, meist generalisierte Wucherung des Zahnfleisches, die knotige Veränderungen aufweisen kann und häufig ab dem Durchbruch der bleibenden Zähne auftritt. Je nach Ausprägung bekommen die Patienten Schwierigkeiten beim Essen und Sprechen (Lynch et al. 1994). Histologisch finden sich Zeichen einer Fibrose (Hart et al. 2000, Häkkinen und Csiszar 2007).

Die isoliert auftretende HGF folgt einer autosomal-dominanten Vererbung. Es besteht vermutlich eine große genetische Heterogenität, da bereits drei chromosomale Regionen mit der HGF in Verbindung gebracht werden konnten. In zwei dieser Regionen (2p22.3-p23.3 und 5q13-q22) konnte bisher noch kein ursächliches Krankheitsgen gefunden werden (Ye et al. 2005, Xiao et al. 2001). Hart und Kollegen (2002) gelang es dagegen mithilfe einer großen brasilianischen Familie in der zuvor eingegrenzten Region in 2p21-p22 *SOS1* als Krankheitsgen zu identifizieren. Sie fanden bei allen betroffenen Familienmitgliedern die heterozygote c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation im *SOS1*-Gen (Hart et al. 2002). Diese führt zu einer Leserasterverschiebung und einem verkürzten *SOS1*-Protein, das vermutlich aufgrund des fehlenden autoinhibitorischen COOH-Terminus verstärkt aktiv ist (Corbalan-Garcia et al. 1998) und somit zu einer erhöhten Aktivität des RAS-MAPK-Signalwegs führt (Hart et al. 2002, Jang et al. 2007). Warum allerdings nur das Gewebe der Gingiva betroffen ist, ist noch nicht geklärt. Es scheint an noch unbekanntem Signalwegen zu liegen, die spezifisch im einzigartigen Gewebe der Mundschleimhaut vorkommen (Gao und McKenzie 1992, Hart et al. 2002).

In Kombination mit einer HGF tritt gehäuft eine Hypertrichosis terminalis auf, die sich in einem ungewöhnlich starken Haarwuchs am ganzen Körper äußert (MIM 135400). Hierfür konnten Veränderungen in einer Region auf Chromosom 17 (17q24.2-q24.3) als mögliche Ursache identifiziert werden. Sun und Kollegen (2009) beschreiben vier Patienten, bei denen in dieser Region so genannte *copy number variations* (CNVs) gefunden wurden. Drei dieser Patienten weisen eine Deletion in dieser Region auf und haben eine isolierte Hypertrichose. Beim vierten Patienten wurde dagegen eine 1,43 Mb große Duplikation identifiziert. Phänotypisch weist dieser Patient neben einer sehr stark ausgeprägten Hypertrichose auch eine Gingivahyperplasie auf (Sun et al. 2009). Allerdings konnte weder für die Hypertrichose noch für die HGF mithilfe dieser Befunde bisher ein eindeutiges Krankheitsgen beschrieben werden.

3 Suche nach neuen Krankheitsgenen und möglichen Pathomechanismen

3.1 Neue Kandidatengene für Syndrome aus den NCFC-Spektrum-erkrankungen

Alle bisher beschriebenen Krankheitsgene für Erkrankungen aus dem NCFC-Spektrum kodieren für Proteine aus dem RAS-MAPK-Signalweg. Außerdem resultieren alle bekannten Mutationen in einer erhöhten Aktivität dieses Signalwegs. Ein Ansatz für die Suche nach neuen Kandidatengenen, um die 20-30% mutationsnegativen Patienten aufzuklären, ist daher, funktionell ähnliche Proteine zu identifizieren, um die entsprechenden Gene dann bei diesen Patienten auf Mutationen hin zu untersuchen. Dieses Vorgehen war z. B. bei der Identifizierung von *SOS1* und *RAF1* als Krankheitsgene für das Noonan-Syndrom erfolgreich (Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007, Pandit et al. 2007, Razzaque et al. 2007).

Durch statistische Auswertung von Protein-Protein-Interaktionen innerhalb des RAS-MAPK-Signalwegs gelang es Cordeddu und Kollegen (2009), *SHOC2* als neues Kandidatengen zu benennen. Bei der anschließenden Analyse des *SHOC2*-Gen bei insgesamt 506 mutationsnegativen Patienten wurde bei 25 Patienten in Exon 2 die wiederkehrende Missense-Mutation c.4A>G (p.S2G) festgestellt (Cordeddu et al. 2009). So konnte *SHOC2* als neues Krankheitsgen für einen Subtyp des Noonan-Syndroms identifiziert werden.

Eine andere Herangehensweise für die Identifizierung neuer Kandidatengene für Erkrankungen aus dem NCFC-Spektrum besteht in der Suche nach Tiermodellen, die phänotypische Ähnlichkeiten mit den Patienten haben. Huang und Mitarbeiter beschrieben bereits 2006 ein *knock-in*-Mausmodell, bei welchem in der α -Kette des G-Proteins G_{12} , die durch das *Gnai2*-Gen kodiert wird, eine Mutation eingeführt wurde (Huang et al. 2006). Diese resultiert in einem Aminosäureaustausch von Glycin nach Serin an der Position 184 [c.550G>A (p.G184S)]. Das G_{12} -Protein gehört zur Gruppe der heterotrimeren Guaninnukleotid-bindenden Proteine (G-Proteine). Diese bestehen aus einer mit GTP oder GDP beladenen α -Untereinheit (G) und einer β -Untereinheit. Ist an G GDP gebunden, bilden alle Untereinheiten einen inaktiven Komplex. Durch den Austausch von GDP nach GTP an G kommt es zur Aktivierung des G-Proteins. Daraufhin lösen sich die α - und β -Untereinheit voneinander und sind nun in der Lage verschiedene Effektor-Proteine zu aktivieren. Die wichtigsten Effektormoleküle der G-Proteine sind die Adenylatzyklase und die Phospholipase C β (Rassow 2006). Das G_{12} -Protein scheint sowohl mit seiner α - als auch β -Untereinheit positiven Einfluss auf den

Aktivitätszustand von ERK1/2 zu nehmen (Mochizuki et al. 1999, Huang et al. 2009), wobei die MAPK-Kaskade sowohl über RAS-Proteine als auch unabhängig von diesen aktiviert werden kann (Pace et al. 1995).

Grundlage für die Herstellung des oben beschriebenen Mausmodells war eine in der Hefe *Saccharomyces cerevisiae* identifizierte Mutation (p.G302S) im *gna12*-Gen (DiBello et al. 1998). An die β -Untereinheit des G_{12} -Proteins binden normalerweise sogenannte Regulatoren der G-Protein-Signalweitergabe (RGS), die als GAPs die Inaktivierung des G-Proteins beschleunigen (Ross et al. 2000). Die in der Hefe gefundene Mutation führt sowohl in der Hefe als auch in der *knock-in*-Maus zu einer Blockierung der RGS-Bindungsstelle, so dass es zu einer verstärkten Aktivität der β -Untereinheit des G_{12} -Proteins kommt, was wiederum zur erhöhten Aktivität von Effektor-Proteinen und der darauffolgenden Signalkaskaden führt (DiBello et al. 1998, Huang et al. 2009).

Homozygote $Gnai2^{G184S}$ *knock-in*-Mäuse zeigen eine erhöhte prä- und neonatale Letalität, Kleinwuchs, vermindertes Körpergewicht, Splenomegalie, hämatologische Veränderungen, ein vergrößertes Herz und eine Hyperaktivität (Huang et al. 2009). Außerdem ist der Schädel etwas breiter und verkürzt (s. Abb. 6). Als faziale Auffälligkeit zeigen sich weit auseinander liegende Augen und Ohren (s. Abb. 6). Allerdings ergibt sich nur für das Verhältnis von Augen- bzw. Ohrenabstand zur Schädelgröße ein signifikanter Unterschied zu Wildtyp-Mäusen, nicht jedoch für den absoluten Abstand (Huang et al. 2009).



Abb. 6: Foto der $Gnai2^{G184S}$ *knock-in*-Maus im Vergleich zur Wildtyp-Maus

Das Foto zeigt links eine Wildtyp-Maus (WT) und rechts eine Maus mit der homozygoten p.G184S-Mutation in *Gnai2*. Man erkennt, dass die rechte Maus kleiner ist und einen verkürzten, gedrunghenen Schädel hat. Außerdem fallen die weiter auseinanderliegenden Augen auf (Abbildung aus Huang et al. 2009).

In der Summe erinnert dieser Phänotyp an das klinische Erscheinungsbild des Noonan-Syndroms (Huang et al. 2009). Auch wenn die Aktivierung von ERK durch heterotrimere G-Proteine nicht dem klassischen RAS-MAPK-Signalweg entspricht, so ist doch denkbar, dass eine verstärkte Aktivität dieser G-Proteine zum Noonan-Syndrom führen könnte. In endokrin-aktiven Tumoren der Hypophyse, der Nebenniere und des Ovars wurden zwei somatische Mutationen [c.535C>T (p.R179C) und

c.615A>T (p.Q205L)] im *GNAI2*-Gen entdeckt, die in einer dauerhaften Aktivität des G₁₂-Proteins resultieren und so zum abnormen Wachstum und zur Malignität der betroffenen Zellen führen (Lyons et al. 1990).

Für fast alle Gene, die mit Erkrankungen aus dem NF1-Spektrum in Zusammenhang stehen, konnte auch eine Beteiligung an der Tumorentstehung gezeigt werden. Zwei Krankheitsgene für das Noonan-Syndrom, *KRAS* und *CBL*, wurden beispielsweise folgendermaßen identifiziert: Es war bekannt, dass Mutationen in beiden Genen zur juvenilen myelomonozytären Leukämie (JMML) führen. Diese tritt gehäuft bei Patienten mit Noonan-Syndrom auf. Bei Patienten mit einer im Blut nachweisbaren Mutation in *KRAS* oder *CBL* wurde daher auch anderes Gewebe (z. B. Wangenschleimhaut) auf das Vorliegen derselben Mutation hin untersucht. Bei einigen, die auch klinisch dem Bild des Noonan-Syndroms entsprechen, konnte auch dort die entsprechende Mutation in *KRAS* oder *CBL* nachgewiesen werden, so dass tatsächlich Keimbahn-Mutationen vorlagen (Schubbert et al. 2006, Martinelli et al. 2010, Niemeyer et al. 2010, Pérez et al. 2010). Daher ist eine weitere Möglichkeit für die Suche nach neuen Kandidatengen die Mutationsanalyse von Genen, in denen bereits somatische Mutationen in Tumorgewebe gefunden wurden.

Von *BRAF*, einem Krankheitsgen für das NF1-Syndrom, ist bekannt, dass es in 27-70% aller malignen Melanome mutiert ist (Garnett und Marais 2004). Nun konnten Prickett und Kollegen (2009) das Auftreten von somatischen Mutationen im *ERBB4*-Gen in 19% aller malignen Melanome nachweisen (Prickett et al. 2009). Das *ERBB4*-Gen kodiert für einen Tyrosinkinase-Rezeptor, der zur gleichen Gruppe gehört wie der EGF-Rezeptor (auch *ERBB1* genannt). Auch durch die Bindung eines Liganden an den *ERBB4*-Rezeptor kann es zu Aktivierung des RAS-MAPK-Signalwegs kommen (Fuller et al. 2008).

Aufgrund dieser Ausführungen sind die Gene *GNAI2* und *ERBB4* als vielversprechende Kandidatengene für Krankheiten aus dem NF1-Spektrum anzusehen.

3.2 Möglicher Pathomechanismus der hereditären Gingivafibromatose

Für heterozygote Mutationen im *SOS1*-Gen besteht sowohl eine Assoziation mit dem Noonan-Syndrom als auch der HGF. Es handelt sich dabei nicht, wie man leicht vermuten könnte, in dem einen Fall um Funktionsgewinn- und in dem anderen Fall um Funktionsverlust-Mutationen, wodurch die unterschiedlichen Phänotypen gut erklärbar wären. Vielmehr wird sowohl bei den das Noonan-Syndrom verursachenden Missense-Mutationen in *SOS1*, als auch bei der mit der HGF assoziierten c.3248dupC

(p.R1084Kfs*23)-Mutation von einem Funktionsgewinn ausgegangen (Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007, Hart et al. 2002). Die c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation führt zu einer Leserasterverschiebung ab dem Codon 1084 und zu 22 proteinfremden AS am COOH-Terminus (s. Abb. 19 in IV.3.1). Dieses verkürzte SOS1-Protein führt zu einer erhöhten Aktivität im RAS-MAPK-Signalweg und damit zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2 (Corbalan-Garcia et al. 1998, Jang et al. 2007). Auch für die im Rahmen des Noonan-Syndroms beschriebenen Missense-Mutationen in *SOS1* konnte eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 nachgewiesen werden (Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007). Klinisch weisen diese Patienten allerdings keine Gingivahyperplasie auf und die Erkrankung ist auch nicht, wie bei der HGF, auf ein Gewebe beschränkt (Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007). So kann vermutet werden, dass nur im Zahnfleisch andere, vielleicht bisher unbekannte Signalwege durch die c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation in *SOS1* beeinflusst werden.

Welche Anhaltspunkte für neue Signalwege gibt es, die in Zusammenhang mit dem Pathomechanismus der HGF stehen könnten? In der Literatur wurde ein Patient mit HGF und Hypertrichose beschrieben (Sun et al. 2009). Durch eine Microarray-basierte komparative genomische Hybridisierung (Array-CGH) wurde eine 1,43 Mb große Duplikation in 17q24.2-q24.3 festgestellt (Sun et al. 2009) (Abb. 7). In der gleichen Arbeit werden außerdem drei Familien beschrieben, innerhalb derer betroffene Personen in der gleichen Region auf Chromosom 17 eine Deletion von 964 Kb, 678 Kb bzw. 555 Kb aufweisen (Sun et al. 2009). Klinisch präsentieren diese Patienten eine isolierte generalisierte Hypertrichose (Sun et al. 2009) (Abb. 7).

Obwohl in der gemeinsamen duplizierten bzw. deletierten Region einige Gene (*ABCA5*, *ABCA6*, *ABCA10*, *MAP2K6*) liegen (Abb. 7), wird von den Autoren ein Positionseffekt auf das etwa 2 Mb entfernt liegende *SOX9*-Gen als Ursache für die Hypertrichose angenommen (Sun et al. 2009). Dieses kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der regulatorischen Einfluss auf die Haarfollikel-Stammzellen hat (Vidal et al. 2005). Es wird vermutet, dass es durch die CNVs zu einer erhöhten oder aber zeitlich und örtlich veränderten Expression von *SOX9* in Haarfollikel-Stammzellen kam und dies zum abnormen Haarwuchs führte (Sun et al. 2009).

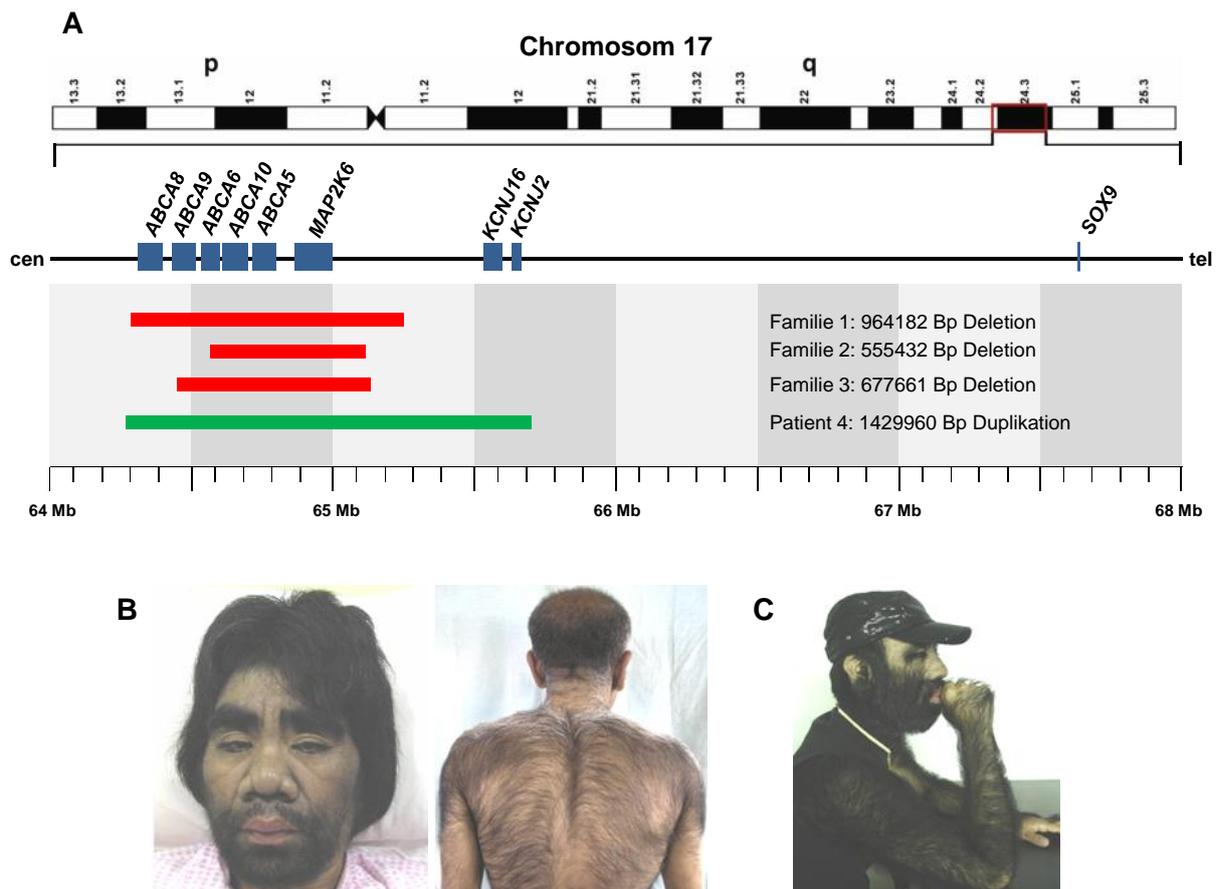


Abb. 7: Schematische Darstellung der 17q24.2-q24.3-Region mit den von Sun und Mitarbeitern (2009) beschriebenen CNVs und den entsprechenden Phänotypen

(A) In der vergrößert dargestellten 17q24.2-q24.3-Region sind die enthaltenen Gene durch blaue Kästen gekennzeichnet. Darunter sind die bei den Familien 1-3 bzw. bei Patient 4 gefundenen CNVs mit ihrer entsprechenden Größe dargestellt. Die Deletionen sind mithilfe roter Balken, die Duplikation durch einen grünen Balken gekennzeichnet (Abbildung nach Sun et al. 2009, chromosomale Lokalisationsangabe in Mb gemäß NCBI 36/hg18). (B) Das linke Foto zeigt eine Patientin aus Familie 2. Auf dem rechten Foto sieht man ein betroffenes Mitglied der Familie 1. Bei beiden Patienten ist die am ganzen Körper stark ausgeprägte Hypertrichose zu sehen (Fotos aus Sun et al. 2009). (C) Dieses Foto zeigt den Patienten 4. Auch hier ist die starke Hypertrichose gut zu erkennen. Die ebenfalls vorhandene Gingivahyperplasie ist auf diesem Foto dagegen nicht sichtbar (Foto aus Sun et al. 2009).

Wie kommt es aber aufgrund der Duplikation zu HGF und Hypertrichose? Hierzu stellten Sun und Kollegen (2009) keine Hypothese auf. Zur Beantwortung dieser Frage rückt das *MAP2K6*-Gen in 17q24.3 in den Mittelpunkt des Interesses. Neben den Patienten mit der oben beschriebenen Mutation in *SOS1* haben auch Patienten mit Costello-Syndrom eine Gingivahyperplasie (Digilio et al. 2008). Hier führt die p.G12S-Mutation in *HRAS* zu einer verstärkten Aktivierung des RAS-MAPK-Signalwegs (Aoki et al. 2005, Rauen 2007). Das *MAP2K6*-Gen kodiert für die MAPK-Kinase MKK6. Diese Kinase wird durch GTP-gebundenes *HRAS* über die GTPase Rac1 aktiviert und führt zu einer Phosphorylierung der MAPK p38 (Han et al. 1996, Shin et al. 2005). Aktives p38 hat Einfluss auf den Zellzyklus, die Zelldifferenzierung und die Apoptose (Zarubin und Han 2005). Bei den oben beschriebenen Patienten mit CNVs in 17q24.3

tritt eine Gingivahyperplasie nur bei einer Duplikation auf, also wenn das *MAP2K6*-Gen in drei Kopien vorhanden ist.

Zusammengefasst wurden also drei verschiedene genetische Veränderungen, die vermutlich zur HGF führen, beschrieben: die c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation in *SOS1*, Funktionsgewinn-Mutationen in *HRAS* und möglicherweise eine erhöhte Kopienanzahl und damit Expression von *MAP2K6*. Betrachtet man den RAS-MAPK-Signalweg, wäre es durchaus möglich, dass es eine Signalweitergabe von *SOS1* über *HRAS* zur Kinase *MKK6*, wie sie in Abbildung 8 schematisch gezeigt ist, gibt. Wenn dieser hypothetische Signalweg nachgewiesen werden könnte und die beschriebenen Mutationen zu einer verstärkten Aktivität von *MKK6* führen würden, könnte dieser hyperaktive Signalweg an der Entstehung der HGF beteiligt sein.

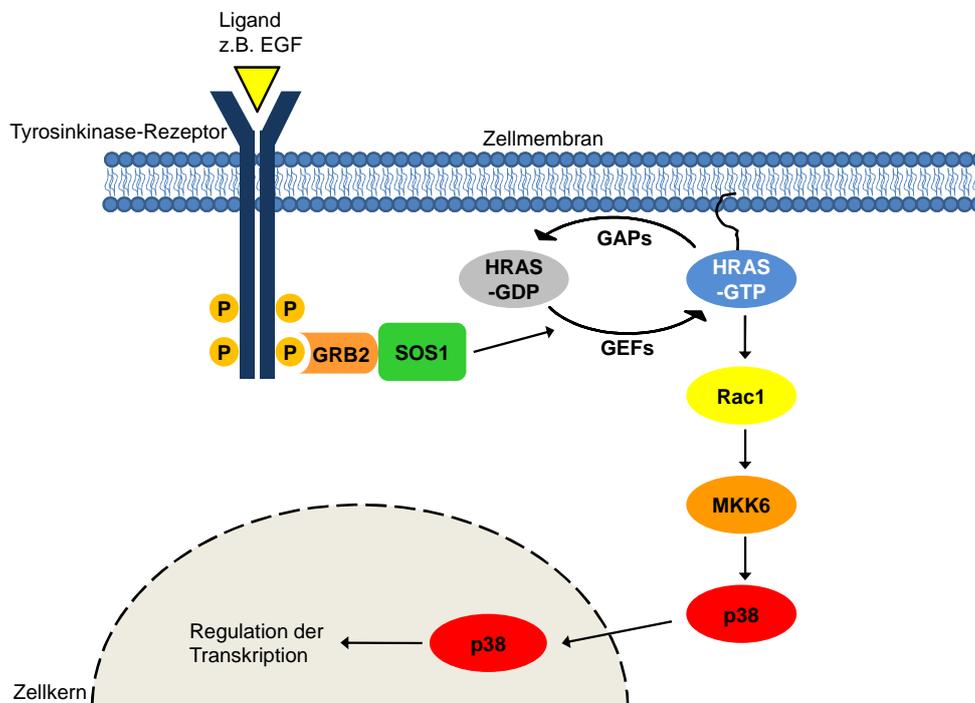


Abb. 8: Ein möglicher Signalweg von SOS1 über HRAS zu MKK6

Die Abbildung zeigt die schematische Darstellung eines möglichen Signalwegs von *SOS1* zu *MKK6*, der schlussendlich zu einer *p38*-vermittelten Regulation von Transkriptionsfaktoren führt. Eine verstärkte Aktivität in diesem Signalweg könnte zum klinischen Bild der HGF führen.

III. Material und Methoden

1 Material

1.1 Patientenkollektive und DNAs

Für die Mutationsanalyse neuer Kandidatengene für Erkrankungen aus dem NCFC-Spektrum standen verschiedene Patientenkollektive zur Verfügung. Eine große Patientengruppe von 98 Patienten, bei denen der klinische Verdacht auf ein NCFC-Syndrom besteht, war im Rahmen einer wissenschaftlichen Zusammenarbeit mit Frau PD Dr. Stephanie Spranger (Praxis für Humangenetik, Bremen) verfügbar. Hierzu zählen die Patienten N01-11, N13-18, N20-24, N26-30, N32-88, N90-99, N105-108. Bei diesen Patienten-DNAs wurden sowohl Exon 2 des *SHOC2*-Gens als auch die Exons 5-7 des *GNAI2*-Gens analysiert. Zu diesem Patientenkollektiv liegen keine klinischen Daten vor.

Im Rahmen einer langjährigen Kooperation mit Herrn Professor Dr. Martin Zenker (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Erlangen bzw. Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Magdeburg) konnte die Analyse der ausgewählten Exons 5-7 des *GNAI2*-Gens auch bei 50 klinisch gut charakterisierten Patienten aus dem Spektrum der NCFC-Erkrankungen durchgeführt werden. Bei diesen wurde im Rahmen seiner diagnostischen Tätigkeit für Krankheitsgene des Noonan-, CFC- und Costello-Syndroms keine pathogene Mutation gefunden. Diese Patienten werden im Folgenden mit den Abkürzungen E01-50 bezeichnet.

Ein weiteres Kollektiv setzt sich aus 92 Patienten zusammen, deren DNAs aufgrund des klinischen Verdachts auf eine Erkrankung aus dem NCFC-Spektrum zur molekulargenetischen Diagnostik an das Institut für Humangenetik in Hamburg gesandt wurden. Bisher konnte bei diesen Patienten in den als krankheitsverursachend geltenden Genen *PTPN11*, *MAP2K1*, *MAP2K2*, *BRAF*, *RAF1*, *KRAS*, *HRAS*, *NRAS* und *SOS1* keine pathogene Mutation nachgewiesen werden. Für 51 dieser 92 Patienten liegen detaillierte klinische Daten vor. Die folgende Tabelle (Tab. 1) fasst die wichtigsten klinischen Merkmale dieser 51 Patienten zusammen. In dieser Arbeit werden diese Patienten wie folgt bezeichnet: 1, 2, 4, 6-27, 29, 31, 34-98.

Alle Patienten bzw. deren Eltern waren über Art und Ziel der Untersuchung aufgeklärt und nahmen freiwillig an der Untersuchung teil. Die verwendete genomische DNA stand mir zur Verfügung und war aus EDTA-Blut gewonnen worden.

Tab. 1: Tabellarische Zusammenfassung der klinischen Merkmale von 51 Patienten aus dem Hamburger Kollektiv

Patient	2	4	6	7	8	9	10	11	12	13	14a+b	15	16	18	20	21	22	23	24	
Klinisches Merkmal																				
Geschlecht	m	m	m	m	w	m	w	m	m	w	m	m	m	w	m	m	m	w	m	
Wachstum und Entwicklung																				
Kleinwuchs	-	n.d.	+	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	
Postnatale Gedeihstörung	-	n.d.	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	
Motorische Entwicklung verlangsamt	-	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	-	
Intelligenzminderung	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	-	+	-	-	+	-	+	+	
Kraniofaziale Charakteristika																				
Lateral abfallende Lidachse	+	n.d.	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	
Epikanthus	-	n.d.	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	
Hypertelorismus	-	n.d.	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	
Ptosis	-	n.d.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	+	+	+	-	+	
Tief ansetzende, dorsal rotierte Ohren	+	n.d.	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	
Flache/r Nasenwurzel/-rücken	-	n.d.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	
Hoher Gaumen	-	n.d.	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	
Vorgewölbte/hohe Stirn	-	n.d.	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
Makrozephalus	-	n.d.	-	+	-	-	-	-	-	-	rel	-	-	-	-	rel	-	-	-	
Muskuloskelettale Charakteristika																				
Überstreckbare Finger	-	n.d.	-	+	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	+	-	+	n.d.	
Muskuläre Hypotonie	+	-	-	-	n.d.	+	+	-	-	-	-	+	+	n.d.	-	+	-	-	n.d.	
Haut/Haarcharakteristika																				
Spärliches und/oder lockiges Haar	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
Pigmentstörungen der Haut	-	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	+	-	-	n.d.	
Trockene Haut	-	n.d.	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
Tiefe plantare/palmare Furchen	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	
Angeborene Herzdefekte	-	PDA	-	ASD	PS	PS+VSD	PS+MKI	FOA	HY	PS	PS+FOA	PS	FOA+ASD	CM	PS	PS+ASD	PS	PS	PS u.a.	
Andere Anomalien																				
Augenanomalien (Myopie, Glaukom)	-	n.d.	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	
Brustanomalien	-	n.d.	+	-	-	-	+	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	
Kryptorchismus	+	n.d.	-	-	x	-	x	-	+	x	-	+	+	x	-	+	-	x	-	
Zerebrale Auffälligkeiten	-	n.d.	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	

Folgende Zeichen und Abkürzungen wurden verwendet: m, männlich; w, weiblich; +, klinisches Merkmal vorhanden; -, Merkmal nicht vorhanden; n.d., keine Daten vorhanden; x, kein Kryptorchismus möglich, da Pat. weiblich ist; rel, relativer Makrozephalus; PS, Pulmonalstenose; PDA, persistierender Ductus arteriosus; ASD, Vorhofseptumdefekt; VSD, Ventrikelseptumdefekt; FOA, Foramen ovale apertum; HCM, hypertrophe Kardiomyopathie; CM, Kardiomyopathie; HY, Hypertrophie; MKI, Mitralklappeninsuffizienz; Fal, Fallot-Tetralogie; u.a.. und andere. Die Patienten 14a+b sind eineiige Zwillinge.

Tab.1: Tabellarische Zusammenfassung der klinischen Merkmale von 51 Patienten aus dem Hamburger Kollektiv (Fortsetzung)

Klinisches Merkmal \ Patient	25	26	27	29	31	36	37	38	39	40	42	43	45	46	48	49	50	52	54
Geschlecht	m	m	w	w	w	m	w	m	m	m	w	m	m	m	w	m	w	w	m
Wachstum und Entwicklung																			
Kleinwuchs	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-
Postnatale Gedeihstörung	-	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	-	-
Motorische Entwicklung verlangsamt	-	-	-	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+	+
Intelligenzminderung	-	-	+	+	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	+	+
Kraniofaziale Charakteristika																			
Lateral abfallende Lidachse	+	-	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Epikanthus	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-
Hypertelorismus	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Ptosis	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-
Tief ansetzende, dorsal rotierte Ohren	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-	-	+	-	+	+	+	-
Flache/r Nasenwurzel/-rücken	-	-	-	-	-	+	+	-	-	+	+	-	-	+	+	+	+	+	+
Hoher Gaumen	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-
Vorgewölbte/hohe Stirn	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	+
Makrozephalus	-	-	-	-	-	rel	-	-	-	-	rel	+	-	-	-	-	-	-	rel
Muskuloskelettale Charakteristika																			
Überstreckbare Finger	-	-	-	n.d.	-	+	-	-	-	-	-	n.d.	-	+	+	-	-	-	-
Muskuläre Hypotonie	-	-	-	n.d.	-	+	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	-	-	+	+
Haut/Haarcharakteristika																			
Spärliches und/oder lockiges Haar	-	-	-	-	-	+	-	-	+	n.d.	-	-	-	+	-	-	-	+	+
Pigmentstörungen der Haut	-	-	-	n.d.	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-
Trockene Haut	-	-	-	n.d.	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	-	-	-	n.d.	+	-
Tiefe plantare/palmare Furchen	-	-	-	-	-	-	+	-	-	n.d.	-	-	-	+	-	+	-	-	+
Angeborene Herzdefekte	PS	PS	-	PS u.a.	-	PS	+	VSD	PS	PS+Fal	PS+HCM	PS	-	-	VSD	-	PS+ASD/VSD	PS	PDA
Andere Anomalien																			
Augenanomalien (Myopie, Glaukom)	-	-	-	-	-	+	-	-	-	n.d.	-	-	+	-	-	-	+	-	+
Brustanomalien	-	+	-	-	+	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Kryptorchismus	+	+	x	x	x	-	x	-	-	n.d.	x	-	-	-	x	-	x	x	-
Zerebrale Auffälligkeiten	-	-	-	-	-	+	-	-	-	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	-	+

Folgende Zeichen und Abkürzungen wurden verwendet: m, männlich; w, weiblich ; +, klinisches Merkmal vorhanden; -, Merkmal nicht vorhanden; n.d., keine Daten vorhanden; x, kein Kryptorchismus möglich, da Pat. weiblich ist; rel, relativer Makrozephalus; PS, Pulmonalstenose; PDA, persistierender Ductus arteriosus; ASD, Vorhofseptumdefekt; VSD, Ventrikelseptumdefekt; FOA, Foramen ovale apertum; HCM, hypertrophe Kardiomyopathie; CM, Kardiomyopathie; HY, Hypertrophie; MKI, Mitralklappeninsuffizienz; Fal, Fallot-Tetralogie; u.a., und andere.

Tab.1: Tabellarische Zusammenfassung der klinischen Merkmale von 51 Patienten aus dem Hamburger Kollektiv (Fortsetzung)

Patient	55	56	57	59	60	63	66	67	72	73	76	77	84	gesamt	
Klinisches Merkmal															
Geschlecht	m	w	w	m	m	w	w	w	m	w	w	m	m	31(m)/20(w)	
Wachstum und Entwicklung															
Kleinwuchs	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	21 (51)	
Postnatale Gedeihstörung	+	-	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-	22 (51)	
Motorische Entwicklungsverzögerung	+	+	-	-	+	+	-	+	-	+	+	+	-	26 (51)	
Intelligenzminderung	+	+	-	-	+	+	-	-	n.d.	+	+	+	-	30 (51)	
Kraniofaziale Charakteristika											+				
Lateral abfallende Lidachse	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	19 (51)	
Epikanthus	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	12 (51)	
Hypertelorismus	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	27 (51)	
Ptosis	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	20 (51)	
Tief ansetzende, dorsal rotierte Ohren	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	30 (51)	
Flache/r Nasenwurzel/-rücken	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	28 (51)	
Hoher Gaumen	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	6 (51)	
Vorgewölbte/hohe Stirn	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	+	+	+	13 (51)	
Makrozephalus	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	+	+	-	9 (51)	
Muskuloskelettale Charakteristika															
Überstreckbare Finger	n.d.	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	6 (51)	
Muskuläre Hypotonie	n.d.	+	-	+	-	+	-	-	n.d.	-	-	-	-	12 (51)	
Haut/Haarcharakteristika															
Spärliches und/oder lockiges Haar	-	+	+	-	+	+	-	-	-	-	+	+	+	15 (51)	
Pigmentstörungen der Haut	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	3 (51)	
Trockene Haut	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	5 (51)	
Tiefe plantare/palmare Furchen	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	+	11 (51)	
Angeborene Herzdefekte	PS+ASD/VSD	-	-	-	-	ASD/VSD	HCM	PS	-	-	HCM+MKI	PS	-	37 (51)	
Andere Anomalien															
Augenanomalien (Myopie, Glaukom)	-	-	-	-	+	-	-	-	n.d.	-	-	n.d.	n.d.	9 (51)	
Brustanomalien	-	-	-	-	-	-	-	-	n.d.	-	-	-	n.d.	8 (51)	
Kryptorchismus	+	x	x	+	-	x	x	x	n.d.	x	x	-	-	9 (31)	
Zerebrale Auffälligkeiten	-	-	-	-	+	+	-	+	n.d.	-	-	n.d.	-	7 (51)	

Folgende Zeichen und Abkürzungen wurden verwendet: m, männlich; w, weiblich; +, klinisches Merkmal vorhanden; -, Merkmal nicht vorhanden; n.d., keine Daten vorhanden; x, kein Kryptorchismus möglich, da Pat. weiblich ist; rel, relativer Makrozephalus; PS, Pulmonalstenose; PDA, persistierender Ductus arteriosus; ASD, Vorhofseptumdefekt; VSD, Ventrikelseptumdefekt; FOA, Foramen ovale apertum; HCM, hypertrophe Kardiomyopathie; CM, Kardiomyopathie; HY, Hypertrophie; MKI, Mitralklappeninsuffizienz; Fal, Fallot-Tetralogie; u.a., und andere.

1.2 Chemikalien und Lösungsmittel

Acrylamid/Bisacrylamid (AA/BAA, 30%/0,8%)	BioRad (München)
Agar (select)	Invitrogen (Karlsruhe)
Agarose (Ultra Pure Agarose)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Anisomycin	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Blotting Grade Blocker Non-Fat Dry Milk	BioRad (München)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Bromphenolblau	Merck (Darmstadt)
Calciumchlorid (CaCl_2)	Merck (Darmstadt)
Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	Roche (Mannheim)
Coomassie-Färbelösung (SimplyBlue™ Safe Stain)	Invitrogen (Karlsruhe)
Di-Kaliumhydrogenphosphat (K_2HPO_4)	Merck (Darmstadt)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
Dithiothreitol (DTT)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
ECL™ Western Blotting Detection Reagenzien	Millipore (Billerica, USA)
Epidermal growth factor (EGF)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Essigsäure 100%	Merck (Darmstadt)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, NL)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendinitrietetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Formamid, deionisiert	Qbiogene (Heidelberg)
Glukose	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycerin wasserfrei	Roth (Karlsruhe)
Glycerol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Glycin	Roth (Karlsruhe)
Hefeextrakt	Oxoide (Wesel)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid (IPTG)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumacetat	Merck (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck (Darmstadt)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH_2PO_4)	Merck (Darmstadt)
Kaliumhydroxid (KOH)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Lipofectamin™ 2000 Reagenz	Invitrogen (Karlsruhe)
Magnesiumchlorid (MgCl_2)	Roth (Karlsruhe)
Magnesiumsulfat (MgSO_4)	Merck (Darmstadt)
Manganchlorid (MnCl_2)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Methanol	J.T. Baker (Deventer, NL)
MOPS (3-Morpholino-Propansulfonsäure)	Roth (Karlsruhe)
N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamine (Temed)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumacetat (NaAc)	Merck (Darmstadt)
Natriumcarbonat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	J.T. Baker (Deventer, NL)
Natriumdihydrogenphosphat (NaH_2PO_4)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Natriumhydroxid (NaOH)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Nonident P 40 Substitute (NP-40)	Fluka Chemie (Buchs, CH)

Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Phosphorsäure (H ₃ PO ₄)	Merck (Darmstadt)
PhosStop Tabletten	Roche (Mannheim)
Polyoxyethylensorbitan Monolaurat (Tween 20)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Protino [®] Glutathione Agarose 4B	Macherey-Nagel (Düren)
RIPA-Puffer	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Rubidiumchlorid (RbCl)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Saccharose	Riedel-de Ha n (Seelze)
Salzsäure (HCl)	Merck (Darmstadt)
Sodium-Dodecylsulfat (SDS)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Triton X-100	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
TRIZMA [®] Base [Tris(hydroxymethyl)-amoniummethan]	Merck (Darmstadt)
Trypton	BD (Heidelberg)
Trypton	Difco (Kansas, USA)
TurboFect [™]	Fermentas (St. Leon-Rot)
Wasser für Chromatographie (HPLC)	Merck (Darmstadt)

1.3 Gerätschaften

100 mm Polystyrol-Zellkulturschalen	Sarstedt (Nürnbrecht)
6-Loch Platten für Zellkultur	Sarstedt (Nürnbrecht)
ABI3130 Sequenzer	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Agarplatten	Greiner (Kremsmünster, AUT)
Autoklav	Tecnomara (Fernwald)
Brutschrank	Heraeus (Hannover)
Certomat [®] R/Certomat [®] H	B.Braun Biotech (Melsungen)
Digitalkamera	OLYMPUS (Hamburg)
Drucker Digital Graphic Printer	SONY (Japan)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (München)
Heizblock (Typ: 52526101)	Liebisch (Bielefeld)
Hypercassette [™]	Amersham LifeScience (Illinois, USA)
Inkubator Shaker Model G25	New Brunswick Scientific (Edison, USA)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg)
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf AG (Hamburg)
Kunststoff-Röhrchen Falcon	Becton Dickinson GmbH (Heidelberg)
Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)
Medical X-Ray Film	Agfa (Köln)
PCR-Cycler MJ Research PTC 200	MJ Research, Inc. (Watertown, USA)
PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH (Oldenburg)
Photometer BioPhotometer	Eppendorf AG (Hamburg)
PIPETBOY acu	IBS Integra Biosciences (Fernwald)
Pipetten Finnpietten	Thermo Labsystems (Mannheim)
PVDF Western Blotting Membranen	Roche (Mannheim)
Rocky [®] 3D	Fröbel Labortechnik (Lindau)
SDS-Page-Kammer	BioRad (München)
Semi-Dry Blotter	Biometra (Göttingen)

Spannungsgeber Electrophoresis power supply PS3002	Life Technologies (Karlsruhe)
Spannungsgeber Electrophoresis power supply ST305	Life Technologies (Karlsruhe)
Spannungsgeber Power Pac 300	BioRad (München)
Sterilwerkbank HERA safe Typ 12/2, 1995	Heraeus (Hannover)
Sterilwerkbank Lamin Air Instruments	Heraeus (Hannover)
Thermomixer compact	Eppendorf AG (Hamburg)
Tischzentrifuge „Biofuge Pico“	Heraeus (Hannover)
UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab (Wiesloch)
Vortex-Gerät „Vortex Genie 2 Heidolph REAX 2000“	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Waage “Sartorius ISO 9001”	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad „GFL 1083“	GFL (Burgwedel)
Whatman-Chromatografiepapier	Macherey-Nagel (Düren)
X-Ray-Filmentwickler	MS Laborgeräte (Wiesloch)
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus (Hannover)

1.4 Medien, Zusätze, Puffer und Lösungen

1.4.1 Medien und Zusätze für molekularbiologische Arbeiten

LB-Medium:	10 g Trypton	
	5 g Hefeextrakt	
	10 g Natriumchlorid	
	ad 1000 ml Aqua dest.	
	pH 7,0	
Agar für Festmedien:	15 g/l Agar	
Ampicillin:	150 µg/ml Medium	
Kanamycin:	25 µg/ml Medium	
SOC-Medium:	20 g Trypton	
	5 g Hefeextrakt	
	0,5 g NaCl	
	ad 970 ml Aqua dest.	
	pH 7,0	
	10 ml 1 M MgSO ₄	} steril filtriert
	10 ml 1 M MgCl ₂	
	10 ml 40% Glukose	
B-Medium:	5 g Hefeextrakt	
	20 g Trypton	
	0,75 g KCl	
	pH 7,6 (mit KOH einstellen)	
	ad 1000 ml Aqua dest.	
	34 ml 1M MgSO ₄ (steril filtriert)	

TfB I-Puffer:	6,05 g	RbCl
	4,95 g	MnCl ₂
	1,47 g	Kaliumacetat
	0,74 g	CaCl ₂
	75 ml	Glycerol
	pH	5,8 mit 0,2 M Essigsäure einstellen steril filtrieren und bei 5° C lagern
TfB II-Puffer:	10 ml	MOPS (100 mM, pH 7)
	0,12 g	RbCl
	1,1 g	CaCl ₂
	15 ml	Glycerol
	pH	8 mit KOH einstellen steril filtrieren und bei 5° C im Dunkeln lagern

1.4.1.1 Lösungen für Mini-DNA-Präparation aus *E.coli*

Lösung I:	50 mM	Glukose
	25 mM	Tris-HCl
	10 mM	EDTA
	pH	8,0
Lösung II:	0,2 N	NaOH
	1%	SDS
Lösung III:	4 M	Kaliumacetat
	2 M	Essigsäure

1.4.2 Medien und Zusätze für zellbiologische Arbeiten

Dulbecco´s modifiziertes Eagle Medium (DMEM)	Gibco (Karlsruhe)
Fötales Rinderserum (FBS)	PAA Laboratories (Pasching)
Optimem Transfektionsmedium	Gibco (Karlsruhe)
Penicillin/Streptomycin	Gibco (Karlsruhe)
TrypLE Express	Gibco (Karlsruhe)

1.4.3 PCR-Puffer

10x PCR-Puffer: (Qiagen)	15 mM	MgCl ₂	} [genaue Angaben werden vom Hersteller nicht angegeben]
		Tris-Cl	
		KCl	
		(NH ₄) ₂ SO ₄	
	pH	8,7	
FailSafe PCR PreMix (Epicenter)	100 mM	Tris-HCl (pH 8,3)	
	100 mM	KCl	
	400 µM	eines jeden dNTPs	
	je nach Puffer 3-7 µM	MgCl ₂	
	je nach Puffer 0-8 x	Fail Safe PCR-Enhancer mit Betain (Trimethylglycin)	

1.4.4 Puffer und Lösungen für die Gelelektrophorese

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

1.4.5 Puffer und Lösungen für proteinbiochemische Arbeiten

4x Trenngelpuffer:	2 g	SDS
	91 g	Tris
	ad 500 ml	Aqua dest.
	pH	8,8 (mit H ₃ PO ₄ einstellen)
4x Sammelgelpuffer:	2 g	SDS
	30,3 g	Tris
	ad 500 ml	Aqua dest.
	pH	6,8 (mit H ₃ PO ₄ einstellen)
Lade (Laemmli)-Puffer (4x):	33%	Glycerol
	0,3 M	Dithiothreitol (DTT)
	6,7%	SDS
	0,01%	Bromphenolblau
	80 mM	Tris-HCl
	pH	6,8
10x SDS-Laufpuffer:	40 g	SDS
	60,6 g	Tris
	288,4 g	Glycin
	ad 2000 ml	Aqua bidest.
	pH	8,3
Transferpuffer:	25 mM	Tris
	150 mM	Glycin
	10%	Methanol
	pH	8,3
10x Tris-Puffer mit Tween 20 (TBS-T):	200 mM	Tris/HCl (pH 7,4)
	1,5 M	NaCl
	0,1%	Tween 20
	ad 1000 ml	Aqua dest.
10x Phosphatpuffer (PBS-/-):	80 g	NaCl
	2 g	KCl
	14,4 g	NaH ₂ PO ₄
	2,4 g	KH ₂ PO ₄
	ad 1000 ml	Aqua dest.
	pH	7,4 (mit HCl einstellen)

1x PBS-T:	100 ml	10x PBS -/-	
		0,1% Tween 20	
	ad 1000 ml	Aqua dest.	
1x PBS (+/+):	100 ml	10x PBS -/-	
	9 ml	100 mM CaCl ₂	
	5,2 ml	100 mM MgCl ₂	
	1,6 ml	100 mM MgSO ₄	
	ad 1000 ml	Aqua dest.	
Stripping-Puffer:	1,876 g	Glycin	
	50 ml	20% SDS	
	ad 1000 ml	Aqua dest.	
	pH	2,0 (mit HCl einstellen)	
Zellyse-Puffer:	10 ml	RIPA-Puffer	
	1 Tabl.	Complete Mini	
	1 Tabl.	PhosStop	
GTPase-Pull-Down- Lysepuffer:	10 ml	1 M Tris (pH 8)	
	6 ml	5 M NaCl	
	2 ml	NP-40	
	ad 200 ml	Aqua dest.	
pro 10 ml Puffer je:	1 Tabl.	Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	
	1 Tabl.	Phos Stop	

1.4.6 Puffer und Medien für die Aufreinigung von GST-Proteinen

TB-Medium:

Lösung I:	12 g	Trypton	
	24 g	Hefeextrakt	
	4 ml	Glycerol	
	ad 900 ml	Aqua dest.	autoklavieren
Lösung II:	0,17 M	KH ₂ PO ₄	
	0,72 M	K ₂ HPO ₄	
	ad 100 ml	Aqua dest.	autoklavieren

Lösung I und II werden zusammengeführt und Ampicillin zugegeben.

GTBLI-Puffer:	50 mM	Tris-HCl (pH 8)	
	40 mM	EDTA	
	25% (w/v)	Saccharose	
pro 10 ml Puffer	1 Tabl.	Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	
GTBLII-Puffer:	50 mM	Tris-HCl (pH 8)	
	100 mM	MgCl ₂	
	0,2%	Triton X-100	
pro 10 ml Puffer	1 Tabl.	Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	
Waschpuffer:	50 mM	Tris-HCl (pH 8)	
	50 mM	NaCl	
	5 mM	MgCl ₂	
pro 10 ml Puffer	1 Tabl.	Complete Mini Protease Inhibitor Cocktail	

Lagerungspuffer: 50% Waschpuffer
50% Glycerol

1.4.7 Sonstige Puffer

10x TE Puffer: 100 mM Tris
10 mM EDTA
pH 8,0 mit HCl einstellen

TE/RNase-Puffer: 100 µg/ml RNase in 1xTE

1.5 Enzyme

Fast Digest [®] Restriktionsenzyme (<i>Bam</i> HI, <i>Not</i> I, <i>Sal</i> I, <i>Kpn</i> I, <i>Noc</i> I)	Fermentas (St. Leon-Rot)
<i>Sty</i> I	NE BioLabs (Ipswich, MA, USA)
Herculase [®] Enhanced DNA Polymerase	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
PfuUltra [™] -DNAPolymerase	Stratagene (La Jolla, CA, USA)
<i>Taq</i> -Polymerase	Invitrogen (Karlsruhe)

1.6 Kits und Längenstandards

pENTR [™] Directional TOPO [®] -Cloning Kit	Invitrogen (Karlsruhe)
NucleoBond [®] Xtra Maxi Kit	Macherey-Nagel (Düren)
FailSafe [™] PCR PreMix Selection Kit	Epicenter (Madison, WI, USA)
1 Kb/100 Bp/50 Bp DNA Leiter	Invitrogen (Karlsruhe)
PageRuler [™] Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas (St. Leon-Rot)
GeneScan [™] -500 ROX [™] Size Standard	Applied Biosystems (Darmstadt)
GeneScan [™] -500 TAMRA [™] Size Standard	Applied Biosystems (Darmstadt)

1.7 Zelllinien

Name	Eigenschaften	Herkunft
HeLa	adhärente epithelienähnliche Zellen; Cervix-Karzinom, Mensch	DSMZ, Braunschweig
COS-7	renale Fibroblastenzelllinie, Grüne Meerkatze	DSMZ, Braunschweig
NIH3T3	embryonale Fibroblastenzelllinie, Maus	Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf
A431	epidermoide Karzinomzelllinie, Mensch	
HEK	embryonale Nierenzellen, Mensch	
SKN	Neuroblastom, Mensch	
SH SY5Y	Neuroblastom, Mensch	
HT22	Hippocampus, Mensch	

Tab. 2: Bezeichnung, Eigenschaften und Herkunft der verwendeten Zelllinien

DSMZ: Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH

Sowohl die HeLa-, als auch die COS-7-Zellen wurden kultiviert und für Experimente verwendet. Von allen anderen aufgeführten Zelllinien wurden nur bereits vorhandene Zelllysate eingesetzt.

1.8 *E. coli*-Bakterienstämme

Name	Eigenschaften	Herkunft
DH10B	F- <i>mcrA</i> Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 endA1 araD139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK</i> λ -<i>rpsL</i> (StrR) <i>nupG</i></i>	Invitrogen (Karlsruhe)
BL21	F- <i>ompT hsdSB</i> (rB-mB-) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	Invitrogen (Karlsruhe)
Top10	F- Δ (<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) 80d <i>lacZ</i> Δ M15 Δ <i>lacX74 deoR recA1 araD139 Δ (<i>ara, leu</i>)7697 <i>galU galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i></i>	Invitrogen (Karlsruhe)

Tab. 3: Bezeichnung, Eigenschaften und Herkunft der verwendeten Bakterienstämme

1.9 Oligonukleotide

Bei der Auswahl der in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide für PCR-Analysen wurde auf einen GC-Gehalt von etwa 50% sowie die Vermeidung der Bildung von Primer-Dimeren und Sekundärstrukturen geachtet. Alle Oligonukleotide wurden von der Firma Sigma-Aldrich (Taufkirchen) bezogen. Vor Gebrauch wurden die Primer in 1xTE gelöst, um eine Konzentration von 100 pmol/ μ l zu erreichen. Aliquots dieser Stammlösung wurden anschließend mit HPLC aufgereinigtem H₂O auf 10 pmol/ μ l verdünnt und eingesetzt.

1.9.1 Oligonukleotide für die Mutationsanalyse der Gene *SHOC2*, *GNAI2* und *ERBB4*

Name	Oligonukleotidsequenz 5' 3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5' 3'
SHOC2_F2	GGA ACTCTAATGAATCATTGATTGACC	SHOC2_R2	GGTTTGGCCGTTTGATCGTATTGTC
GNAI2_5F	AGGGCTGTGCTTGAGAAATG	GNAI2_5R	AGGGCAGCTACCTTCTGGAATC
GNAI2_6F	CTCTGTCCTCAGTCAGCCAACCTG	GNAI2_7R	AAGCCTAAGTGAGGCACCAG
ERBB4_8F	CACTATCAATGATGCTAATC	ERBB4_8R	GTAGGTTTGGTTGTGAGAGTGG
ERBB4_12F	CAGATTTATTGATTCAGTTTCC	ERBB4_12R	GAGCAACAATTCTGACCGGAT
ERBB4_14F	GAATTTACTCTGCCAATAGGAC	ERBB4_14R	CCATGGCATCCTGTAAGTAGC
ERBB4_15F	CTGAAGTCTCAGTAACTAAACC	ERBB4_15R	GGTATACATTTTCAGAGATGG
ERBB4_21F	GCACTTCCAACCTGAAGGCTAAG	ERBB4_21R	AATAATCTCCTAAGCTTCAGG
ERBB4_28F	CATAAGACAATGGTGATCCAC	ERBB4_28R	GCATCTCTGTATCTTCCACTG

Tab. 4: Zusammenfassung der im Rahmen der Mutationsanalyse verwendeten Primer

Angegeben sind die Bezeichnung und die zugehörige Sequenz der Oligonukleotide.

1.9.2 Oligonukleotide für die Sequenzierung der *SOS1*-Plasmide

Name	Oligonukleotidsequenz 5' 3'
hSOS1_for1	GACCACCAGGTTTCTGTTTACATAG
hSOS1_for2	GAAGATACAGTAGAAATGACAGATG
hSOS1_for3	GAAGACTGAGTGAATCTGCATGTCCG
hSOS1_for4	CTTTACAGTACCGGAGTACACTGG
hSOS1_for5	AGCTATAGAGAATGGAGATCAAC
hSOS1_for6	GAAATTGCTCGACAACACTCTTAC
hSOS1_for7	GAATTGAGTGAAGATCACTATAAG
hSOS1_for8	ACCCTAAGCCTCTCCCAAGATTTC
hSOS1_for9	GCACTGATGAAGTGCCTGTCCCTC
hSOS1_for10	CCTCAAACACCTTCTCCTCACG
hSOS1_rev1	GCATCAGCTATTGCCATTTATC

Tab. 5: Verwendete Primer für die Sequenzierung der *SOS1*-Plasmide

Angegeben sind die Bezeichnung sowie die zugehörige Sequenz der Oligonukleotide.

1.9.3 Oligonukleotide für die Mutationseinführung und Herstellung der *SOS1*- und *HRAS*-Konstrukte

Name	Oligonukleotidsequenz 5' 3'
hSOS1wt/mut_pEDT_for	CACCATGCAGGCGCAGCAGCTGCCCTAC
hSOS1wt_pEDT_rev	TCAGGAAGAATGGGCATTCTCCAACAG
hSOS1mut_pEDT_rev	TCAAATACACTGCAAACATCTGTGGTACTGGAAGCACCAGAAGCAG GCGGAGGTGTTAACGGTGTCTTGGGAGAATTTGGTGCAGATGC
HRAS_pEDT_for	CACCATGACGGAATATAAGCTGGTGGTGGTGG
HRAS_7AS_dup_for2	AGCGCCATGCGGGACGAGTACAGCGCCATGCGGGACCAGTAC
HRAS_7AS_dup_rev1	CATGGCGCTGTACTCGTCCCGCATGGCGCTGTACTCCTCCTGG
HRAS_pEDT_rev	TTATCAGGAGAGCACACACTTGCAGCTCATG

Tab. 6: Für die primervermittelte Mutagenese verwendete Oligonukleotide

Angegeben sind die Bezeichnung sowie die zugehörige Sequenz der Oligonukleotide.

1.9.4 Mikrosatelliten-Marker

Mikrosatelliten-Marker	Markierung	Standard	Fluoreszenzfarbe	Produktgröße [Bp]
<i>D2S2330</i>	FAM	TAMRA	blau	166-186
<i>D3S1614</i>	NED	ROX	gelb	101-125
<i>D5S2027</i>	FAM	TAMRA	blau	180-202
<i>D5S406</i>	NED	ROX	gelb	164-192
<i>D5S647</i>	NED	ROX	gelb	326-365
<i>D6S1581</i>	FAM	TAMRA	blau	257-271
<i>D8S272</i>	VIC	TAMRA	blau	211-261
<i>D9S1817</i>	FAM	TAMRA	blau	279-315
<i>D12S1659</i>	FAM	TAMRA	blau	290-316

Mikrosatelliten-Marker	Markierung	Standard	Fluoreszenzfarbe	Produktgröße [Bp]
D13S217	FAM	TAMRA	blau	242-262
D14S990	NED	ROX	gelb	148-166
D15S117	NED	ROX	gelb	321-339
DXS990	FAM	TAMRA	blau	122-132

Tab. 7: Auflistung der in dieser Arbeit verwendeten Mikrosatelliten-Marker

Angegeben sind neben der Bezeichnung die Markierung sowie der zugehörige Standard, die Fluoreszenzfarbe und die Produktgröße des jeweiligen Mikrosatelliten-Markers.

1.10 Plasmide

1.10.1 Ausgangskonstrukte

Name	Konstrukt	Kodierregion	Aminosäuren	Herkunft
SOS1	pCGN-SOS1	SOS1	1 - 1333	PD L. Taylor (School of Medicine, New York)
HRAS	HRAS ^{WT} in pMT2-SM-HA-DEST	HRAS	1 -189	AG Rosenberger, UKE, Hamburg

Tab. 8: Angaben zu den Ausgangskonstrukten für die Herstellung von SOS1- bzw. HRAS-Konstrukten

Neben dem Namen des jeweiligen Konstrukts sind die enthaltene Kodierregion sowie die Anzahl der kodierenden Aminosäuren und die Herkunft aufgelistet.

1.10.2 Ausgangsvektoren für Klonierungen

Vektor	Name	Eigenschaften	Herkunft
GATEWAY TM -Vektoren	pENTR/D-TOPO [®]	Km ^r , ccdB	Invitrogen (Karlsruhe)
	pMT2-SM-HA-DEST	Amp ^r , HA-Epitop	AG Rosenberger, UKE, Hamburg

Tab. 9: Zusammenstellung der Ausgangsvektoren

Angegeben sind neben den Namen auch Eigenschaften und Herkunft des jeweiligen Vektors.

1.10.3 Mithilfe der GATEWAYTM-Technologie hergestellte Konstrukte für die eukaryotische Expression

	Konstrukt	Herstellung			AS
		Oligonukleotide	Template	Art	
Eingangskonstrukte	pENTR/D-TOPO [®] -SOS1 ^{WT}	hSOS1wt/mut_pEDT_for hSOS1wt_pEDT_rev	pCGN-SOS1	Topoisomerase-reaktion	1333
	pENTR/D-TOPO [®] -SOS1 ^{Mut}	hSOS1wt/mut_pEDT_for hSOS1mut_pEDT_rev	pCGN-SOS1	Topoisomerase-reaktion	1105 (p.R1084Kfs*23)
	pENTR/D-TOPO [®] -HRAS ^{p.E63_D69 dup}	HRAS_pEDT_for HRAS_7AS_dup_rev1 HRAS_pEDT_rev HRAS_7AS_dup_for2	HRAS ^{WT} in pMT2-SM-HA-DEST	Megaprime-PCR und Topoisomerase-reaktion	196 (p.E63_D69 dup)

	Konstrukt	Herstellung	AS
Zielkonstrukte	pMT2-SM-HA-DEST-SOS1 ^{WT}	Rekombination aus pENTR/D-TOPO [®] -SOS1 ^{WT}	1333
	pMT2-SM-HA-DEST-SOS1 ^{Mut}	Rekombination aus pENTR/D-TOPO [®] -SOS1 ^{Mut}	1105 (p.R1084Kfs*23)
	pMT2-SM-HA-DEST-HRAS ^{p.E63_D69 dup}	Rekombination aus pENTR/D-TOPO [®] -HRAS ^{p.E63_D69 dup}	196 (p.E63_D69 dup)

Tab. 10: Hergestellte Konstrukte für die eukaryotische Expression

Für die Eingangskonstrukte ist jeweils der Name des Konstrukts, die zur Vervielfältigung des zu klonierenden Inserts durch PCR verwendeten Oligonukleotide, das Template für die PCR sowie die Anzahl der kodierten Aminosäuren angegeben. Die PCR-Produkte wurden mittels Topoisomerasereaktion in den gewünschten Eingangsvektor eingebracht. Die Zielkonstrukte wurden über eine LR-Rekombinationsreaktion hergestellt. Es ist jeweils der Name, das Ausgangskonstrukt und die Anzahl der kodierten Aminosäuren angegeben.

1.10.4 Nicht im Rahmen dieser Arbeit hergestellte Konstrukte

Name	Eigenschaften	Insert	Herkunft
pMT2-SM-HA-DEST	Amp ^r , HA-Epitop	HRAS ^{WT}	AG Rosenberger, UKE, Hamburg
		HRAS ^{G12S}	
		HRAS ^{G12V}	
		HRAS ^{S17N}	
pGEX-4T-3	Amp ^r	PI3K[p110]	AG Rosenberger, UKE, Hamburg
		Raf[RBD]	
		RaIGDS[RA]	
		PLC [RA2]	

Tab. 11: Übersicht über die bereits vorhandenen Konstrukte, die in dieser Arbeit verwendet wurden

Angegeben sind jeweils der Name des Vektors sowie dessen Eigenschaften, das enthaltene Insert und die Herkunft.

1.11 Antikörper

1.11.1 Primärantikörper

Antikörper	Antigen	Tier	Verdünnung	Hersteller
anti-GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase (Mensch)	Maus	1:10000 in 0,4% Milch/TBS-T	abcam (Cambridge, UK)
anti-ERK1/2	extrazellulär regulierte Kinase 1/2 (Ratte)	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling (Beverly, USA)
anti-pERK1/2	phosphoryliertes ERK1/2 (Mensch)	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling (Beverly, USA)
anti-MKK6	Mitogen-aktivierte Proteinkinase 6 (Mensch)	Kaninchen	1:300 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling (Beverly, USA)

Antikörper	Antigen	Tier	Verdünnung	Hersteller
anti-pMKK3/MKK6	phosphoryliertes MKK3/MKK6 (Mensch)	Kaninchen	1:300 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling (Beverly, USA)
anti-MEK1/2	Mitogen-aktivierte ERK-Kinase 1/2 (Mensch)	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling (Beverly, USA)
anti-pMEK 1/2	phosphoryliertes MEK1/2 (Mensch)	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling (Beverly, USA)
anti-AKT	Proteinkinase B (Maus)	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling (Beverly, USA)
anti-pAKT	phosphorylierte Proteinkinase B (Mensch)	Kaninchen	1:1000 in 5% BSA/TBS-T	Cell Signaling (Beverly, USA)

Tab. 12: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Primärantikörper

Für jeden Antikörper sind die Bezeichnung, das Immunogen mit seiner Herkunft, das zur Immunisierung verwendete Tier, die eingesetzte Verdünnung sowie die Bezugsfirma angegeben.

1.11.2 Sekundärantikörper und konjugierte Primärantikörper

Antikörper	Antigen	Konjugat	Tier	Verdünnung	Hersteller
anti-HA-HRP High Affinity (3F10)	humanes Hämagglutinin	Meerrettich-Peroxidase	Ratte	50 mU/ml in 0,4% Milch/TBS-T	Roche (Mannheim)
anti-mouse-HRP	Maus IgG	Meerrettich-Peroxidase	Schaf	1:10000 in 4% Milch/TBS-T	GE Healthcare (München)
anti-rabbit-HRP	Kaninchen IgG	Meerrettich-Peroxidase	Esel	1:7000 in 4% Milch/TBS-T	GE Healthcare (München)

Tab. 13: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Sekundär- und konjugierten Primärantikörper

Für jeden Antikörper sind die Bezeichnung, das Immunogen, das Konjugat, das zur Immunisierung verwendete Tier, die eingesetzte Verdünnung sowie die Bezugsfirma angegeben.

1.12 Datenbanken und Computerprogramme

Datenbanken	Anwendung
ENSEMBL (The European Bioinformatics Institute and Genome Research) http://www.ensembl.org/index.html	Auflistung bekannter Variationen (SNPs) in genomischer DNA Darstellung von Genom-Sequenzen Homologievergleiche von Aminosäuresequenzen
NCBI (National Center for Biotechnology Information) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	BLAST (Basic Local Alignment Search Tool): Homologievergleiche von DNA- und Aminosäuresequenzen Vergleich von Sequenzen mit der SNP-Datenbank (BLAST-SNP)

Computerprogramme und „online“-Programme	Anwendung
Chromas Lite 2.01	Visualisieren und Editieren von DNA-Sequenzchromatogrammen
DIGI CAM Digital Camera control	Dokumentation von Agarosegelen
EditSeq (DNastar)	Editieren von DNA-Sequenzen
GeneScan Analysis Software 2.1 (Applied Biosystems)	Mikrosatelliten-Marker Analyse
Image J	Densitometrische Auswertung von Western-Blots
Mutation Taster http://www.mutationtaster.org/index.html	Überprüfung von Sequenzvarianten auf mögliche Pathogenität
NEB Cutter v2.0 (NE BioLabs) (http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php)	Auffinden von Restriktionsenzym-schnittstellen
NetGene2 (Center for Biological Sequence Analysis, DTU) http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/	Erkennung und Voraussage von Spleißstellen
SeqPilot 3.1.0.4 (JSI medical systems GmbH)	Auswertung von Sequenzen
Splice Site Prediction by Neural Network (Berkeley Drosophila Genome Project) http://www.fuitfly.org/seq_tools/splice.html	Erkennung und Voraussage von Spleißstellen
SpliceView (Oriol) http://bioinfo.itb.cnr.it/oriel/splice-view.html	Erkennung und Voraussage von Spleißstellen

2 Methoden

2.1 Molekularbiologische Methoden

2.1.1 Anzucht von *E.coli*

Für die Anzucht von *E.coli* wurden je nach Bedarf unterschiedliche Mengen LB-Medium mit Einzelkolonien von einer Agar-Platte oder mit Aliquots aus einer Flüssig-Vorkultur (1:50 bis 1:100 Verdünnung) beimpft und über Nacht bei 37°C und 220 Upm im Schüttelinkubator inkubiert.

2.1.2 Herstellung chemisch kompetenter *E.coli*-Zellen für die Transformation

Kompetente Bakterien wurden nach der Rubidium-Chlorid Methode erzeugt. Dazu wurden 2 ml B-Medium mit einer Einzelkolonie angeimpft und über Nacht bei 37°C geschüttelt. Von dieser Kultur wurde 1 ml in 100 ml B-Medium verdünnt und bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,3-0,4 bei 550 nm kultiviert. Aus dieser Kultur wurden

5 ml entnommen, damit erneut 100 ml B-Medium angeimpft und bis zu einer $OD_{550} = 0,3-0,4$ bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Danach wurde die Bakteriensuspension für 5 min in Eiswasser abgekühlt und für weitere 8 min bei 4°C und 2500 Upm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Die pelletierten Bakterien wurden in 15 ml eiskaltem TfBI-Puffer resuspendiert und 30 min in Eiswasser inkubiert. Nach einem erneuten Zentrifugationsschritt von 8 min bei 2500 Upm und 4°C wurden die Zellen in 2 ml eiskaltem TfBI-Puffer resuspendiert, auf 200 µl Aliquots aufgeteilt und in flüssigem Stickstoff schockgefroren. Die Lagerung der kompetenten Bakterien erfolgte bei -80°C.

2.1.3 Isolierung von Plasmid-DNA aus *E.coli*

2.1.3.1 Minipräparation

Für analytische Zwecke wurde Plasmid-DNA mittels der Minipräparations-Methode (Birnboim und Doly 1979) isoliert, welche auf dem Prinzip der alkalischen Lyse beruht.

Für die Isolierung der Plasmid-DNA aus *E.coli* wurden über Nacht 2 ml Kultur gezogen. 1,5 ml dieser Kultur wurden bei 8000 Upm für 5 min abzentrifugiert. Die sedimentierten Zellen wurden in 100 µl Lösung I durch Vortexen resuspendiert. Anschließend wurden 200 µl Lösung II hinzugefügt und sofort durch mehrmaliges Invertieren gemischt. Nach der Zugabe von 300 µl Lösung III folgte eine Inkubation auf Eis von 5-10 min. Daraufhin wurde der Ansatz erneut für 5 min bei 14000 Upm zentrifugiert und der die Plasmid-DNA enthaltende Überstand in ein neues Gefäß überführt. In diesem wurde die DNA nun mit 350 µl Isopropanol gefällt und wiederum bei 14000 Upm für 5 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Um die im Plasmid-DNA-Sediment ebenfalls enthaltene RNA abzubauen, wurde dieses mit 100 µl TE/RNase-Puffer versetzt und 10-15 min bei 37°C inkubiert. Durch Zugabe von 120 µl 88% Isopropanol/ 0,2 M K-Acetat, Vortexen und 10 min Inkubation bei Raumtemperatur wurde die Plasmid-DNA erneut gefällt. Der Ansatz wurde noch einmal für 5 min bei 14000 Upm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet 5-10 min bei 37°C getrocknet. Schließlich wurde die isolierte Plasmid-DNA in Aqua dest. aufgenommen und bei -20°C gelagert.

2.1.3.2 Maxi-Präparation

Bei der Maxi-Präparation werden größere und reinere Mengen an Plasmid-DNA gewonnen. Dafür wird ein Kulturvolumen von 200 ml benötigt. Zur Gewinnung der Plasmid-DNA wurde das auf der Ionenaustauschchromatographie beruhende NucleoBond® Xtra Maxi Kit der Firma Macherey-Nagel eingesetzt, wobei streng nach Herstellerangaben verfahren wurde. Nach Trocknung bei Raumtemperatur wurde die

Plasmid-DNA in 100 µl TE-Puffer resuspendiert und die Konzentration photometrisch bestimmt. Die DNA-Lösungen wurden bei -20°C gelagert.

2.1.4 Photometrische Konzentrationsbestimmung der DNA

Die Konzentration einer DNA-Lösung wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt. Die Messung erfolgte in Quarzküvetten der Schichtdicke 1 cm. Eine Absorptionseinheit entspricht dabei 50 mg/ml. Einen Anhaltspunkt für die Reinheit der Präparation erhält man durch die Bestimmung der Absorption bei 280 nm und durch Bildung des Quotienten aus beiden Werten. Eine ausreichend reine Präparation sollte einen Quotienten A260/A280 von 1,8-2,0 aufweisen.

2.1.5 Restriktionsanalyse von DNA

Sowohl die Qualität als auch die Quantität gewonnener DNA kann mittels Restriktionsanalyse überprüft werden (Smith und Birnstiel 1976). Restriktionsenzyme spalten DNA durch Hydrolyse des Desoxyribose-Phosphat-Rückgrats an spezifischen Erkennungssequenzen. Endonukleasen vom Typ II erkennen spezifische palindromische DNA-Sequenzen aus 4-8 Basenpaaren, und schneiden diese. Sie erzeugen dabei enzymabhängig einzelsträngige, überstehende (*sticky*) oder doppelsträngige, glatte (*blunt*) Enden. Die Reaktionsbedingungen für die Restriktionsendonukleasen wurden den Herstellerangaben entsprechend gewählt. Die in dieser Arbeit durchgeführten Doppelrestriktionen erfolgten gleichzeitig.

Für den Nachweis der c.4A>G (p.S2G)-Mutation im *SHOC2*-Gen mittels Restriktionsverdau der zuvor aus Patienten-DNA amplifizierten PCR-Produkten wurde folgender Ansatz verwendet:

4 µl	PCR-Produkt
1 µl	NEB 3 Puffer
2 µl	Styl
3 µl	H ₂ O
10 µl	Gesamtvolumen

Die Restriktion erfolgte für mindestens 2 Stunden bei 37°C.

Der Ansatz für die Analyse von aus *E.coli* aufgereinigter Plasmid-DNA war folgendermaßen:

2 µl	DNA
2 µl	FastDigest® Puffer
2 µl	10x BSA
je 0,5 µl	FastDigest® Restriktionsenzym
13 µl	H ₂ O
20 µl	Gesamtvolumen

Zur Überprüfung der Minipräparation der Plasmid-DNA wurden für die Vektoren pENTR/D-TOPO®-SOS1^{WT} bzw. -SOS1^{Mut} die Restriktionsenzyme *Bam*HI und *Not*I und für pENTR/D-TOPO®-HRAS^{E63_D69dup} die Enzyme *Not*I und *Nco*I eingesetzt. Zur Kontrolle der Maxipräparation kamen dagegen für die Vektoren pMT2-SM-HA-DEST-SOS1^{WT} bzw. -SOS1^{Mut} die Enzyme *Sa*II und *Kpn*I zum Einsatz, während für den Vektor pMT2-SM-HA-DEST-HRAS^{E63_D69dup} das Enzym *Sa*II verwendet wurde. Die Restriktion erfolgte für mindestens 10 min bei 37°C.

2.1.6 Agarosegelelektrophorese

Zur qualitativen und quantitativen Überprüfung von PCR-Produkten und Restriktionsspaltungen wurde eine Agarosegelelektrophorese durchgeführt. Je nach Größe der DNA-Fragmente wurden Agarosegelkonzentrationen von 0,8–2,5% (w/v) verwendet. Die Agarose wurde in 1xTBE-Puffer aufgekocht, anschließend auf etwa 50°C abgekühlt und in einen geeigneten Gelschlitten mit eingesetzten Gelkämmen gegossen. Das auspolymerisierte Gel wurde in einer Gelkammer positioniert, mit Elektrophoresepuffer (1xTBE) überschichtet und von den Kämmen befreit. Die entstandenen Geltaschen wurden nun mit einer Mischung aus den DNA-Proben und DNA-Ladepuffer (Orange G) (im Verhältnis 3:1) beladen. Als Größenstandard wurde ein DNA-Standard-Marker aufgetragen. Eine Spannung, dessen Stärke sich nach der Größe der Ladung der Fragmente richtete, wurde angelegt. Im Fall von PCR-Produkten wurde eine Spannung von 160 V und eine Laufzeit von 30 min gewählt, im Falle von Restriktionsfragmenten der Plasmide eine Spannung von 100 V und eine Laufzeit von 2,5 h. DNA weist aufgrund von Phosphatgruppen im Desoxyribose-Phosphat-Rückgrat eine negative Gesamtladung auf, so dass sie in einem angelegten elektrischen Feld von der Kathode zur Anode wandert. Die Laufstrecke der Fragmente ist dabei dem Logarithmus seines Molekulargewichts umgekehrt proportional, wodurch kleinere Fragmente schneller durch die Gelporen wandern als größere. Nach der Auftrennung wurde das Gel in einer 0,05%igen Ethidiumbromid-Lösung für mindestens 15 min inkubiert. Währenddessen interkaliert der fluoreszierende Farbstoff Ethidiumbromid in die DNA, so dass nach Anregung mit UV-Licht (254 nm) die DNA durch die resultierende Fluoreszenz auf einem Transilluminator-Tisch nachgewiesen und mithilfe des aufgetragenen Längenstandards die Größe der jeweiligen DNA-Fragmente abgeschätzt werden konnte.

2.1.7 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, *polymerase chain reaction*) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten. Unter Verwendung

hitzestabiler DNA-Polymerasen, wie z. B. der *Taq*-Polymerase, die aus *Thermus aquaticus* isoliert wird, sowie zweier Oligonukleotide (Primer), die zu je einem Abschnitt der DNA revers komplementär sind, kann der dazwischenliegende Abschnitt aus genomischer DNA vervielfältigt werden (Mullis und Faloona 1987). Des Weiteren werden für den Reaktionsablauf Desoxynukleotidtriphosphate (dNTPs) und geeignete Pufferbedingungen benötigt.

Es wurde folgender Standard-PCR-Ansatz verwendet:

1,0 µl	DNA (~100 ng/µl)
2,5 µl	PCR-Puffer (10x)
1,0 µl	Primer Fwd (10 pmol/µl)
1,0 µl	Primer Rev (10 pmol/µl)
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,2 µl	<i>Taq</i> -Polymerase (5 U/µl)
18,8 µl	H ₂ O
25,0 µl	Gesamtvolumen

Die im Nachfolgenden erläuterten Amplifikationsreaktionen wurden alle im *PTC-200 Thermocycler* durchgeführt. Die PCR kann dabei in fünf Schritte unterteilt werden, wobei drei Reaktionsschritte repetitive Reaktionszyklen darstellen (Tab. 14).

1. Initiale Denaturierung	95°C	2 min	
2. Denaturierung	95°C	20 s	} 30-35 Zyklen
3. Annealing	50-58°C	10 s	
4. Elongation	72°C	30-90 s	
5. Finale Elongation	72°C	3 min	

Tab. 14: PCR-Programm unter Standardbedingungen

Die initiale Denaturierung dient der vollständigen Auftrennung der DNA in ihre Einzelstränge. In der *Annealing*-Phase kommt es zur komplementären Hybridisierung der eingesetzten Oligonukleotide, wobei die Anlagerungstemperatur von der Schmelztemperatur der jeweiligen Primer abhängig ist. Für die Elongations-Phase wird die Reaktionslösung bis zur optimalen Arbeitstemperatur der thermophilen Polymerase (72°C) erhitzt (Tab. 14). Nun kommt es zur Polymerisation von Desoxynukleotiden komplementär zu der Ausgangs-DNA. Die Elongationszeit richtet sich dabei nach der Länge des zu synthetisierenden Amplikons, wobei Polymerasen 500-1000 Basenpaare (Bp) pro Minute polymerisieren können. Das Prinzip der Kettenreaktion besteht in der Wiederholung der Denaturierung, in der sich die neusynthetisierten DNA-Stränge wieder von der Matrize lösen, des *Annealings* und der Elongation in 30–35 Zyklen. Die

in jedem Zyklus entstehenden neusynthetisierten DNA-Stränge dienen als Matrize im nächsten Zyklus, so dass eine exponentielle Vermehrung des Ausgangsmaterials erreicht wird. Mit einer finalen Elongation wird dann die Polymerisation des DNA-Materials abgeschlossen.

Zur Erhöhung der Spezifität der entstehenden Produkte wurden sogenannte *Touchdown* (TD)-PCR-Reaktionen durchgeführt. Bei diesem Verfahren wird die Anlagerungstemperatur der Primer schrittweise um 2°C erniedrigt, z. B. wurde bei dem TD56-Programm für vier Zyklen mit einer Anlagerungstemperatur von 56°C begonnen, weitere vier Zyklen erfolgten mit einer Anlagerungstemperatur von 54°C und 30 Zyklen dann mit einer von 52°C.

Konnte mit dem angegebenen PCR-Ansatz und unter diversen Amplifikationsbedingungen kein PCR-Produkt erhalten werden, wurde die PCR mit den FailSafe PreMixes A-L des *FailSafe™ PCR PreMix Selection Kit* wiederholt. Die PreMix-Puffer des *FailSafe™ PCR PreMix Selection Kits* enthalten neben den vier Desoxynukleotiden in gepufferter Salzlösung unterschiedliche Konzentrationen an MgCl₂ sowie verschiedene PCR-Verstärker (Enhancer) wie Betain. Betain schützt die Polymerase vor Hitzeinaktivierung und erhöht die Ausbeute und die Spezifität des Produktes.

Für die Amplifizierung der *SOS1*- und *HRAS*-Kodierregion zur Klonierung wurden hitzeresistente DNA-Polymerasen mit Korrektoreigenschaften („proofreading“) verwendet, wie die PfuUltra™-DNA-Polymerase (Stratagene). Alternativ wurde die Amplifikation auch mit der *Herculase^U Enhanced DNA Polymerase* (Stratagene) versucht.

Die PCR-Bedingungen variierten je nach verwendetem Primerpaar. Nachfolgend wird ein Überblick über die PCR-Bedingungen der einzelnen Amplikons der im Rahmen der Mutationsanalyse untersuchten Gene gegeben (Tab. 15).

Gen	Exon	Primerpaar	PCR-Programm	FailSafe Puffer	Produktgröße [Bp]
<i>SHOC2</i>	2	SHOC2_2F + SHOC2_2R	TD56		464
<i>GNAI2</i>	5	GNAI2_5F + GNAI2_5R	TD56		550
	6+7	GNAI2_6F + GNAI2_7R	53°C	E	600
<i>ERBB4</i>	8	ERBB4_8F + ERBB4_8R	TD58		337
	12	ERBB4_12F + ERBB4_12R	TD56		426
	14	ERBB4_14F + ERBB4_14R	TD56		305
	15	ERBB4_15F + ERBB4_15R	TD58		333

Gen	Exon	Primerpaar	PCR-Programm	FailSafe Puffer	Produktgröße [Bp]
ERBB4	21	ERBB4_21F + ERBB4_21R	TD58		358
	28	ERBB4_28F + ERBB4_28R	TD56		743

Tab. 15: Zusammenfassung der PCR-Bedingungen für die jeweiligen Primerpaare

Angegeben sind der Name des Gens, das amplifizierte Exon, das entsprechende Primerpaar, das verwendete PCR-Programm und die Produktgröße. Teilweise wurde auch ein *FailSafe*-Puffer verwendet.

2.1.7.1 PCR-Mutagenese

Das Verfahren der PCR kann nicht nur zur Amplifikation bestimmter DNA-Abschnitte verwendet werden, sondern z. B. auch zur Mutagenese. Hierbei kann mithilfe von mutationstragenden Primern eine bestimmte Mutation in das PCR-Produkt eingeführt werden. Diese Methode wurde für die Herstellung des die c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation tragenden SOS1-Konstrukts (SOS1^{Mut}) angewandt. Hierfür wurde das Primerpaar hSOS1wt/mut_pEDT_for und hSOS1mut_pEDT_rev (mutationstragender Primer) eingesetzt. Der mutationstragende Rückwärts-Primer umfasste in diesem Fall einige Basen vor der einzuführenden Duplikation, die Duplikation des Cytosins sowie alle folgende Nukleotide bis zum vorzeitig entstehenden Stopp-Codon. So entstand die entsprechende cDNA für das durch die *frameshift*-Mutation verkürzte SOS1^{Mut}-Protein (s. Abb. 19, S. 64). In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 16) sind die PCR-Bedingungen sowohl für die Amplifikation der SOS1^{WT}-cDNA, als auch für die mutationstragende Variante (SOS1^{Mut}) angegeben. Als Matrize diente das pCGN-SOS1^{WT}-Konstrukt mit der Wildtyp-cDNA-Sequenz von SOS1. Das durch die PCR entstandene mutationstragende Produkt konnte nach der Aufreinigung zur Klonierung verwendet werden.

Gen	Amplikon	Primerpaar	PCR-Programm	Produktgröße [Bp]
SOS1	WT	hSOS1wt/mut_pEDT_for + hSOS1wt_pEDT_rev	54°C	4006
	Mut	hSOS1wt/mut_pEDT_for + hSOS1mut_pEDT_rev	52°C	3321

Tab. 16: PCR-Bedingungen für die Amplifikation der gewünschten SOS1-cDNA

Angegeben sind der Name des Gens, die Bezeichnung des Amplikons, das entsprechende Primerpaar, das verwendete PCR-Programm und die Produktgröße.

Für die Herstellung des HRAS^{E63_D69dup}-Konstruktes wurde die Megaprime-PCR-Methode eingesetzt. Hierfür sind drei PCR-Reaktionsschritte nötig. Zunächst werden mithilfe von mutationstragenden Primern zwei unterschiedliche PCR-Produkte hergestellt, bei denen jeweils am Ende bzw. Anfang 15 Basenpaare (entsprechend fünf

Aminosäuren) dupliziert sind (Abb. 9). Für die erste PCR wurde das Primerpaar HRAS_pEDT_for und HRAS_7AS_dup_rev1 verwendet. Die zweite PCR wurde mit dem Primerpaar HRAS_7AS_dup_for2 und HRAS_pEDT_rev durchgeführt. Als Matrize diente jeweils der pMT2-SM-HA-DEST-HRAS^{WT}-Vektor mit der Wildtyp-cDNA von HRAS. Beide PCR-Produkte wurden über das *JETquick PCR Product Purification Spin Kit* aufgereinigt.

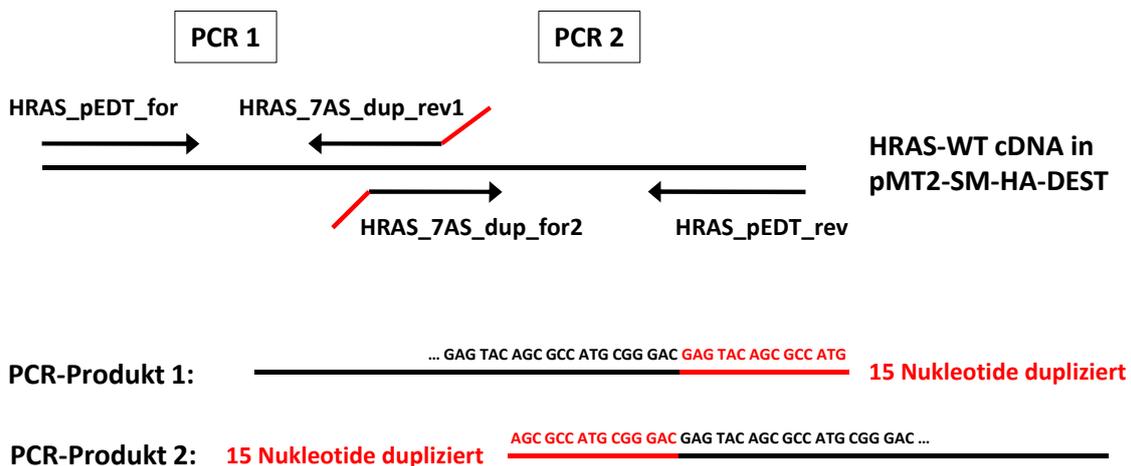


Abb. 9: Schematische Darstellung der ersten beiden PCR-Reaktionen der Megaprime-PCR

Es sind sowohl die verwendeten Primerpaare als auch das entstehende PCR-Produkt schematisch dargestellt. Die duplizierten Nukleotide sind in rot dargestellt. Die PCR-Produkte 1 und 2 überschneiden sich für einen Bereich von 30 Basenpaaren.

Die PCR-Produkte der ersten und zweiten PCR enthalten jeweils einen Teil der gewünschten Mutation. Somit entsteht ein ausreichend großer Bereich, in dem die Sequenzen der beiden generierten PCR-Produkte (1 und 2) identisch sind, so dass die nach Denaturierung erhaltenen DNA-Einzelstränge über einen kurzen DNA-Bereich miteinander hybridisieren können. Die dritte PCR-Reaktion lässt sich in zwei Abschnitte unterteilen: Der erste Reaktionsschritt dient der Herstellung von doppelsträngigen DNA-Fragmenten, welche die komplette 21-Nukleotide-Duplikation-Mutation enthalten. Der nach der Denaturierung und anschließenden Hybridisierung im mutationstragenden Bereich entstandene doppelsträngige Abschnitt und die freien 3'-Enden der DNA-Stränge dienen der *Taq*-Polymerase als Primer. Als DNA-Matrize dienen die 5'-überhängenden Bereiche (Abb. 10). Dadurch kommt es zur Elongation der DNA (DNA-Polymerisation) in 3'-Richtung und zur Entstehung doppelsträngiger DNA-Fragmente (Schritt 1). Im zweiten Schritt erfolgt nun die Zugabe der das komplette gewünschte cDNA-Fragment flankierenden Oligonukleotide (HRAS_pEDT_for und HRAS_pEDT_rev). Die darauffolgende PCR-Reaktion dient der Amplifikation des gewünschten DNA-Fragments.

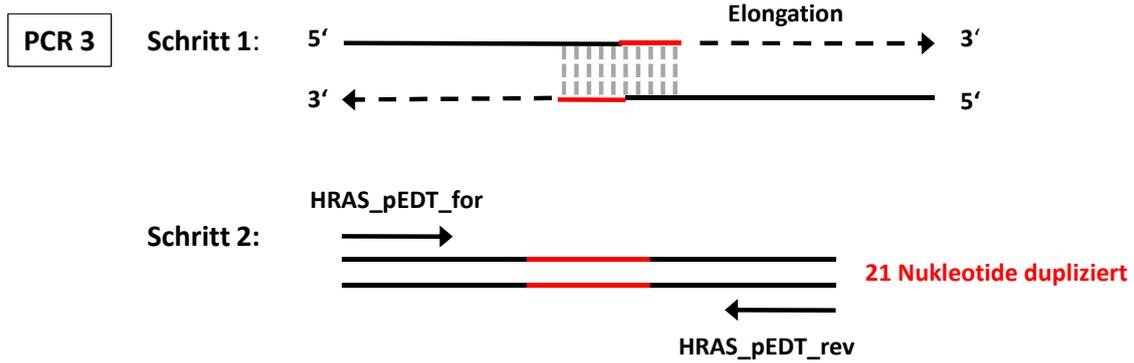


Abb. 10: Ablauf der dritten PCR-Reaktion im Rahmen der Megaprime-PCR

Nach einer Denaturierungsphase kommt es zur Hybridisierung der PCR-Produkte 1 und 2 im überlappenden Bereich. Nun können die DNA-Fragmente mithilfe der *Taq*-Polymerase in 3'-Richtung elongiert werden, wodurch doppelsträngige, mutationstragende DNA-Fragmente entstehen (Schritt 1). Im zweiten Schritt wird nun mithilfe des Primerpaares HRAS_pEDT_for/HRAS_pEDT_rev das gewünschte DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Dieses enthält nun die komplette Duplikation von 21 Basenpaaren (entsprechend 7 Aminosäuren).

In der nachfolgenden Tabelle (Tab. 17) sind alle notwendigen Reaktionsschritte zusammengefasst, die zur Herstellung eines vollständigen, mutationstragenden PCR-Produkts notwendig sind. Nach einer Aufreinigung kann das PCR-Produkt für Restriktionsanalysen und Klonierungen verwendet werden.

PCR-Reaktion 1 und 2:	PCR-Reaktion 3:	
Ansatz:	Ansatz:	
1 µl Plasmid-DNA (1ng/µl) 1 µl Primer for 1 µl Primer rev 0,5 µl dNTPs 0,2 µl PfuUltra-Polymerase 2,5 µl PfuUltra Puffer 18,8 µl HPLC 25 µl Gesamtvolumen	Schritt 1:	je 1 µl PCR-Produkt (1 und 2) 0,5 µl dNTPs 0,2 µl PfuUltra Polymerase 2,5 µl PfuUltra Puffer 17,8 µl H ₂ O 23 µl Gesamtvolumen
	Schritt 2:	Zugabe von je 1 µl Primer for bzw. Primer rev
PCR-Programme:		
PCR 1 und 2:	PCR 3:	
	Schritt 1:	Schritt 2:
95°C für 2min 95°C für 20 s 55°C für 15s 72°C für 1 min 72°C für 4 min } 30 Zyklen	95°C für 3 min 95°C für 15s 40°C für 20s 72°C für 3 min 72°C für 3 min } 3 Zyklen	95°C für 3 min 95°C für 15 s 55°C für 10 s 72°C für 4 min 72°C für 4 min } 20 Zyklen

Tab. 17: Zusammenfassung der PCR-Ansätze und PCR-Programme für die PCR-Mutagenese mittels Megaprime-PCR

Es sind die jeweiligen Ansätze für die PCRs 1-3 mit den dazugehörigen Programmen zusammengefasst. Die erste und zweite PCR wurden separat durchgeführt, mit je einem mutationstragenden Primer. Bei der PCR 3 wurden die Primer erst nach drei PCR-Zyklen (Schritt 1) hinzugefügt und die Amplifikation dann erneut gestartet (Schritt 2).

2.1.8 Aufreinigung von PCR-Produkten

Vor der Sequenzierung wurden die PCR-Produkte mit dem Enzymmix *ExoSAP* aufgereinigt, um die Primer zu entfernen, da diese nachfolgende Arbeitsschritte stören können. Der Enzymmix *ExoSAP* setzt sich aus der *Exonuclease I* aus *E.coli* und der *FastAP™ Thermosensitive Alkaline Phosphatase* der Firma Fermentas im Verhältnis 1:2 zusammen. Für die Reaktion wurde folgender Ansatz verwendet:

0,5 µl	PCR-Produkt
0,5 µl	ExoSAP
6 µl	H ₂ O
7,0 µl	Gesamtvolumen

Die *ExoSAP*-Reaktion erfolgte für 15 min bei 37°C. Im Anschluss wurden die Enzyme für 15 min bei 80°C inaktiviert. Beide Arbeitsschritte wurden im *PTC-200 Thermocycler* durchgeführt.

Zur Aufreinigung der für die Klonierungen amplifizierten PCR-Produkte wurde das *Jetquick PCR Product Purification Spin Kit* nach Herstellerangaben verwendet.

2.1.9 DNA-Sequenzierung

Das Prinzip der durchgeführten DNA-Sequenzierung beruht auf der Kettenabbruchmethode nach Sanger (Sanger et al. 1977) und erfolgte mit dem *ABI Prism BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit* (PE Applied Biosystems, Darmstadt) und dem Sequenzierungsgerät *ABI3130 Sequencer*. Die Methode beruht darauf, dass neben 2'-Desoxyribonukleotiden (dNTPs) auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Dideoxyribonukleotide (ddNTPs) in die zyklische Sequenzierreaktion eines spezifischen PCR-Produktes eingesetzt werden. Wird während der Amplifizierungsreaktion, die im Wesentlichen aus Zyklen von Denaturierung, Annealing und Elongation besteht, ein solches ddNTP in den entstehenden DNA-Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Sequenzierreaktion. Dieser Kettenabbruch erfolgt, da den ddNTPs die 3'-OH-Gruppe fehlt, die für die Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke mit der Phosphatgruppe eines weiteren dNTPs oder ddNTPs notwendig ist. Die so entstehenden DNA-Stränge sind aufgrund des zufälligen Einbaus von ddNTPs unterschiedlicher Länge und je nach Dideoxynukleotid mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Die einzelnen Farbstoffe haben ihre Fluoreszenzmaxima bei unterschiedlichen Wellenlängen. Die Messung erfolgt elektronisch und durch eine Computerverarbeitung der Signale wird ein Chromatogramm erstellt.

Die Amplifikation des Sequenzierproduktes erfolgte linear, da für die Reaktion nur ein Primer verwendet wurde, um nur einen Strang als Matrize für die Sequenzierung zu nutzen. Die Reaktion der DNA-Sequenzierung wurde laut Arbeitsprotokoll (Tab. 18) durchgeführt.

Ansatz für Sequenzierreaktion		Programm	
2 µl	<i>ExoSAP</i> -Produkt	96°C	5 min
0,5 µl	Primer Fwd oder Rev (10 pmol/µl)	96°C	50 sec
1 µl	BigDyeMix	55°C	10 sec
2 µl	BigDye Terminatorpuffer (5x)	60°C	4 min
4,5 µl	HPLC	72°C	4 min
10 µl	Gesamtvolumen		

Tab. 18: Standardbedingungen einer Sequenzierreaktion

Angegeben sind der allgemeine Reaktionsansatz und das Programm für die Sequenzierung.

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

10 µl	Sequenzierprodukt
5 µl	NaAc (3M, pH 5,2)
125 µl	Ethanol (abs.)
40 µl	H ₂ O
180 µl	Gesamtvolumen

Dieser Fällungsansatz wurde kurz mithilfe des Vortex-Gerätes gemischt und anschließend bei 14000 Upm bei 20°C für 20 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Überstandes wurde das DNA-Pellet in 250 µl 70% Ethanol (v/v) gewaschen, erneut wie beschrieben für 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde bei 37°C für ca. 15 min getrocknet und bis zur Sequenzierung im Kapillarsequenzierer bei -20°C gelagert.

2.1.10 Mikrosatellitenanalyse für Elternschaftsnachweis

Der Elternschaftsnachweis erfolgte mithilfe des Größenvergleichs von über das gesamte Genom verteilten Mikrosatelliten-Markern zwischen Eltern und Kind. Bei Mikrosatelliten handelt es sich um kurze, nicht kodierende, repetitive DNA-Sequenzen, die in variabler Länge auftreten und polymorph sind. Aufgrund der mendelnden Vererbung dieser Marker kann eine Elternschaft durch deren Analyse entweder bestätigt oder ausgeschlossen werden. Es wurden zunächst PCRs an genomischer DNA des Eltern-Kind-Trios für verschiedene Mikrosatelliten-Marker durchgeführt (siehe 1.9.3). Die Bedingungen entsprachen dabei einer *Touchdown*-PCR mit einer Anfangstemperatur von 56°C.

PCR-Ansatz für Mikrosatelliten-Marker:

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

Die Überprüfung der PCR-Produkte erfolgte mittels Agarosegelelektrophorese. Je nach Quantität des PCR-Produktes wurden 0,5-1 µl mit 20 µl deionisiertem Formamid und 0,4 µl Standard (TAMRA oder ROX) vermischt. Die anschließende Analyse erfolgte im *ABI Prism™ 310 Genetic Analyzer* und mithilfe der *GeneScan* Software.

2.1.11 Amplifikation von genomischer DNA

Um eine ausreichende Menge an DNA für die Mutationsanalyse zur Verfügung zu haben, wurde ggf. eine *whole genome amplification* (WGA)-Reaktion mit Hilfe des *GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit* nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Zunächst wurde 1 µl der zu amplifizierenden DNA in einem Probenpuffer (Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben) für 3 min bei 95°C denaturiert. Nachdem diese denaturierte Probe auf Eis abgekühlt wurde, wurde dieser anschließend ein Reaktionspuffer (genaue Zusammensetzung vom Hersteller nicht angegeben), der vor allem Random-Hexamernukleotide, dNTPs und Puffer enthält sowie die *Phi29*-DNA-Polymerase zugesetzt. Diese besitzt neben einer hohen Prozessivität und einer korrekturlesenden 3' 5'-Exonuklease-Aktivität auch eine *strand displacement*-Aktivität, wodurch die neu synthetisierten Stränge auch als Matrize für weitere Amplifikationen dienen können und Temperaturzyklen überflüssig werden. Die Reaktion erfolgte isotherm für 90 min bei 30°C, anschließend wurde die Polymerase für 10 min bei 65°C inaktiviert. Die vervielfältigte DNA wurde bei 4°C gelagert.

Mit folgendem Reaktionsansatz war es möglich aus 10 ng eingesetzter DNA 4-7 µg amplifizierte DNA zu erhalten:

	1 µl	DNA (~10ng/µl)	95°C für 3 min
	9 µl	Probenpuffer	Abkühlung auf Eis
Zugabe von:	9 µl	Reaktionspuffer	30°C für 90 min
	1 µl	<i>Phi29</i> -DNA-Polymerase	65°C für 10 min
	20 µl	Gesamtvolumen	

Alle Schritte dieser WGA-Reaktion wurden im *PTC-200 Thermocycler* durchgeführt.

2.2 Klonierungen

2.2.1 Klonierung mittels der TOPO™-Klonierungs-Technologie als Basis für das GATEWAY-System

Die TOPO™-Klonierungs-Technologie der Firma Invitrogen bietet die Möglichkeit der direkten Klonierung von PCR-Produkten, die mit einer Polymerase amplifiziert wurden, welche unabhängig von der Matrize ein Desoxyadenosin an das 3'-Ende des PCR-Produkts anfügt. Dabei macht sich diese Technologie die Eigenschaft des Enzyms Topoisomerase I aus dem *Vaccinia*-Virus zunutze, welches sowohl als Restriktionsenzym als auch als Ligase wirken kann. Es erkennt spezifische Nukleotidabfolgen der Vektor-DNA, spaltet das Phosphodiester-Rückgrat und bindet dabei kovalent an den 3'-Phosphatrest der Vektor-DNA. Die von der Firma Invitrogen bezogenen Vektoren liegen in linearisierter Form vor und haben jeweils am 3'-Phosphatrest der Schnittstelle die Topoisomerase I kovalent gebunden. Zwischen der Topoisomerase I und dem Vektor besteht eine Phosphodiesterbindung, welche durch den nukleophilen Angriff der 5'-Hydroxylgruppe des PCR-Produktes aufgehoben wird, wodurch es zu einer Phosphodiesterbindung zwischen dem PCR-Produkt und dem Vektor und zur Dissoziation der Topoisomerase I vom Vektor kommt (*The Technology behind TOPO® Cloning* auf www.invitrogen.com).

Die Reaktion wurde nach Herstellerangaben mit dem *pENTR™ Directional TOPO®-Cloning Kit* durchgeführt. So erhielt man einen sogenannten Eingangsklon (*entry clone*), der als Ausgangsvektor für verschiedene Zielvektoren (*destination vector*) des GATEWAY™-Systems verwendet werden konnte.

2.2.2 Klonierung mittels GATEWAY™- Technologie

Bei der GATEWAY™-Technologie wird ein DNA-Insert durch eine Rekombinationsreaktion in einen gewünschten Vektor überführt. Diese Rekombination basiert auf der lokusspezifischen Rekombinationsreaktion des Bakteriophagen in *E.coli*, durch die er sich in das bakterielle Genom integrieren kann. Dazu werden zwei spezifische DNA-Sequenzen, so genannte Att-Stellen (*attachment sites*), sowie spezifische Enzyme benötigt. Als Voraussetzung für die Nutzung dieses Systems muss das zu klonierende DNA-Fragment zunächst zwischen zwei Att-Stellen in einen Eingangsvektor eingeführt werden. Dies erfolgte mittels der oben beschriebenen Topoisomerase-Reaktion (2.2.1). Ausgehend von diesem Eingangsklon ist die Rekombination des DNA-Fragments in jeden beliebigen Zielvektor über eine so genannte LR-Reaktion möglich, bei der die Insert-DNA des Eingangsvektors in einen Zielvektor rekombiniert. Zielvektoren besitzen äquivalente Att-Stellen, welche ebenfalls

als Erkennungssequenzen für das Enzym dienen. Es ist möglich, jeden beliebigen Vektor in einen Zielvektor zu überführen indem eine Gateway-Leserahmen-Kassette (*Gateway Reading Frame Cassette*), welche *Att*-Stellen enthält, eingebaut wird. In dieser Arbeit wurde die LR-Rekombination zwischen dem Eingangsvektor pENTRTM/D-TOPO[®] und dem Destinationsvektor pMT2-SM-HA-DEST nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.3 Transformation kompetenter *E.coli*-Zellen mit Plasmid-DNA

Für die Transformation von *E.coli* wurden pro Ansatz 100 µl chemisch kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut und mit 1-5 µg Plasmid-DNA versetzt. Nach einer Inkubation von 30 min erfolgte ein Temperaturschock bei 42°C im Wasserbad für 90 s. Danach wurde der Ansatz wiederum für 5 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe von 700 µl SOC-Medium wurde der Ansatz für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend auf selektiven Agarplatten ausgestrichen. Diese wurden dann über Nacht im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

2.3 Proteinbiochemische Methoden

2.3.1 Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-Page)

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen erfolgte unter denaturierenden Bedingungen mithilfe der diskontinuierlichen, eindimensionalen SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (Laemmli 1970). Durch die Verwendung von Polyacrylamid (PAA) als Trägermedium lässt sich die Porengröße des Gels leicht variieren und somit an die Größe der Proteine anpassen. Der Zusatz von SDS zum Proteingemisch bewirkt, dass praktisch alle nicht kovalent gebundenen Wechselwirkungen in nativen Proteinen zerstört werden und es zur Bildung eines SDS-Protein-Komplexes kommt, dessen stark negative Ladung zum Molekulargewicht des Proteins proportional ist. Die Wanderungsgeschwindigkeit des Proteins in SDS-haltigen Gelen wird somit durch das Molekulargewicht eines unmodifizierten Proteins und durch den Vernetzungsgrad des Gels bestimmt. Zur Gelelektrophorese wurde die Polyacrylamid-Gellösung (Trenngel) nach der unten angegebenen Rezeptur hergestellt, zwischen zwei Glasplatten in eine Mini-Gelapparatur gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach der Polymerisation wurde die überschichtete Flüssigkeit vollständig entfernt und nachfolgend ein Sammelgel mit Geltaschen gegossen, welches der Fokussierung der SDS-Protein-Komplexe vor der eigentlichen Auftrennung im Trenngel dient. Die Proteinproben wurden mit 4x Probenauftragspuffer (Laemmli-Puffer) versetzt, für 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend auf das Gel aufgetragen. Der Gellauf in 1x

SDS-Laufpuffer erfolgte bei 140 V für ca. 2 h. Es wurde immer ein Proteingrößenstandard mit aufgetragen.

	Trenngel			Sammelgel
	15%	12,5%	10%	5%
ddH ₂ O [ml]	2,46	3,3	4,1	3,9
4x Trenngel- bzw. Sammelgel-Puffer [ml]	2,5	2,5	2,5	1,7
30% AA/BisAA (37,5:1) [ml]	5	4,2	3,4	1,2
TEMED [μ l]	6,3	6,3	6,3	6,3
10% (w/v) APS [μ l]	125	125	125	125

Tab. 19: Zusammensetzung der PAA-Gele für die SDS-Page

Angegeben ist jeweils die eingesetzte Menge für 2 PAA-Gele. AA/BisAA Acrylamid/Bisacrylamid, APS Ammoniumpersulfat.

2.3.2 Transfer von Proteinen auf eine Trägermembran (Western-Blot)

Der Transfer der Proteine aus Polyacrylamid-Gelen erfolgte auf eine PVDF (Polyvinylidendifluorid)-Membran, wofür die negative Ladung der durch die SDS-PAGE entstandenen SDS-Proteinkomplexe genutzt wird (Elektro-Blot). Hierfür wurde eine PVDF-Membran auf die Größe des Gels zugeschnitten und für einige Sekunden in 100% Methanol, für 1 min in Aqua bidest. und für ungefähr 3 min in Transferpuffer inkubiert. Vier Blatt Whatman-Papier wurden ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten und in Transferpuffer getränkt. Die Polyacrylamidgele wurden aus der Elektrophoresekammer entnommen und zur Entfernung störender Salze gleichfalls in Transferpuffer äquilibriert. Der Blot wurde wie folgt in der Blot-Apparatur luftblasenfrei aufgeschichtet: Anode - zwei Blatt Whatman-Papier - PVDF-Membran - PAA-Gel - zwei Blatt Whatman-Papier - Kathode. Zusätzlich wurde darauf geachtet, dass dieser Stapel in genügend Transferpuffer getränkt war. Der Transfer der Proteine auf die Membran erfolgte bei konstanter Stromstärke (4-5 mA/cm² Gelfläche) und je nach Proteingröße für 30-60 min. Nach Kennzeichnung der Membran erfolgte die Immundetektion der Proteine.

2.3.3 Immunologische Detektion immobilisierter Proteine auf Membranen

Grundlage für den spezifischen Nachweis immobilisierter Proteine auf Membranen bietet die Reaktion eines primären Antikörpers (AK) mit seinem Antigen. In einer zweiten Reaktion bindet an diesen Komplex ein sekundärer Antikörper, an welchen das Enzym HRP (*horseradish peroxidase*, Meerrettich-Peroxidase) gekoppelt ist. Diese Peroxidase katalysiert eine Lichtreaktion (Chemiluminiszenz), welche mit einem

Röntgenfilm detektiert wird. Dadurch können die gebildeten Protein-Antikörper-Komplexe dargestellt werden.

Nach erfolgtem Semi-Dry-Blot wurden freie Bindungskapazitäten auf der PVDF-Membran mit 4% (w/v) Milchpulver in 1xTBS-T bzw. PBS-T für mindestens 30 min bei RT oder bei 4°C über Nacht abgesättigt. Die Inkubation mit dem primären proteinspezifischen Antikörper erfolgte im jeweiligen Verdünnungs-Puffer bei 4°C über Nacht. Ungebundene Antikörper wurden durch dreimaliges Waschen der Membran mit 1xTBS-T bzw. PBS-T für je 10 min entfernt. Die Detektion des primären Antikörpers erfolgte mit einem gegen diesen gerichteten HRP-konjugierten Sekundärantikörper. Nach einer Stunde Inkubation bei RT wurde die Membran dreimal für 10-15 min mit 1xTBS-T bzw. PBS-T gewaschen. Die Identifikation der vom Antikörper erkannten Proteine erfolgte über die Umsetzung eines Substrates durch HRP, wobei Chemilumineszenz entsteht. Hierfür wurden *ECL™ Western Blotting Detection* Reagenzien nach Anweisung des Herstellers eingesetzt. Die erzeugte Chemilumineszenz schwärzt Röntgenfilme, so dass diese durch Exposition der Membranen an Röntgenfilmen durch deren Entwicklung sichtbar gemacht und dokumentiert werden kann. Falls der primäre Antikörper direkt mit HRP konjugiert war, konnte bereits nach Inkubation mit diesem und Waschen mit TBS-T die Chemilumineszenz-Reaktion durchgeführt werden. In einigen Fällen wurden die Antikörper anschließend durch Inkubation mittels Stripping Puffer für 30 min von der Membran gelöst und es konnte eine erneute Immundetektion mit einem anderen Antikörper durchgeführt werden.

2.3.4 Aufreinigung von Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteinen

Glutathion-S-Transferase (GST)-Fusionsproteine können aufgrund der Affinität zwischen GST und Glutathion mithilfe von Glutathion-Agarosekügelchen immobilisiert werden. Im Rahmen dieser Arbeit wurden, zur Präzipitation von GTP-gebundenen HRAS-Proteinen aus einem Zelllysat, GST-Fusionsproteine verwendet, welche die RAS-Bindedomäne (RBD) oder RAS-assoziierte Domäne (RA) von verschiedenen HRAS-Effektoren beinhalten: RAF1-RBD (Aminosäuren 51-131), PI3K-RBD (PIK3CA, Aminosäuren 127-314), RalGDS-RA (Aminosäuren 777-872) und PLC -RA (Aminosäuren 2130-2240).

Der *E.coli* Stamm BL21 wurde mit dem entsprechenden Konstrukt (pGEX-GST-RAF1[RBD], pGEX-GST-PI3K[RBD], pGEX-GST-RalGDS[RA], pGEX-GST-PLC [RA2]) transformiert und auf eine selektive (Amp^r) LB-Agar-Platte ausplattiert. Am darauffolgenden Tag wurde 2 ml ampicillinhaltiges LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für ca. 7 h bei 37°C und 200 Upm geschüttelt. Diese

Vorkultur wurde anschließend in 50 ml Ampicillin enthaltendes LB-Medium überführt und über Nacht bei 37°C und 200 Upm inkubiert. Diese Kultur wurde in einer 1:100 Verdünnung mit ampicillinhaltigem TB-Medium bis zu einer $OD_{600}=0,6$ bei 37°C und 200 Upm für ca. 4 h kultiviert. In den nächsten 2 h erfolgte bei 30°C und 200 Upm die Expression des GST-Fusionsproteins, welche durch IPTG (Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid, Endkonzentration 0,1 mM) induziert wurde. Daraufhin wurde die Bakterienkultur bei 8000 Upm für 10 min abzentrifugiert und das Pellet in 20 ml 50 mM Tris-HCl (pH 8) resuspendiert. Die Bakterien wurden bei 8000 Upm erneut sedimentiert und nach Entfernung des Überstandes in flüssigem Stickstoff oder auf Trockeneis schockgefroren. Das Pellet wurde bei -80°C gelagert und am nächsten Tag auf Eis aufgetaut. Zu den Bakterien wurden 20 ml GTBL I-Lösung hinzugefügt und die Suspension bei 4°C für 10 min über Kopf geschüttelt. Nach der Zugabe von 8 ml GTBL II-Lösung wurde die Suspension erneut für 10 min über Kopf inkubiert. Anschließend wurde die bakterielle DNA durch Sonifizierung auf Eis zerstört und die Suspension für eine Stunde bei 4°C und 17000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die darin enthaltenen Fusionsproteine über Protino® Glutathione Agarose-Kügelchen aufgereinigt. Dafür wurde 1 ml der Kügelchen zu dem Überstand gegeben und die Lösung für eine Stunde bei 4°C auf einem Überkoprotator rotiert. Die Agarosekügelchen wurden bei 4°C und 2500 Upm sedimentiert und der Überstand verworfen. Das Pellet wurde viermal mit 5 ml eiskaltem Waschpuffer gewaschen. Danach wurden die Kügelchen in 550 μ l Lagerungspuffer aufgenommen. Die Proteinsuspension wurde in Aliquots abgefüllt und bei -80°C gelagert.

Zur Kontrolle wurden jeweils Proben vor und nach der Zugabe der Agarosekügelchen entnommen und auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Das Gel wurde mit Coomassie-Brillant-Blau für 1-3 h bei Raumtemperatur gefärbt und anschließend für mehrere Stunden in destilliertem Wasser wieder entfärbt.

2.3.5 Zellyse und GST-Pull-Down-Experimente

Mit Hilfe der so genannten Pull-Down-Experimente können Proteine aus einem Zellysat präzipitiert und somit Protein-Protein-Interaktionen untersucht werden. Dabei ist das GST-Fusionsprotein an Glutathion-beschichtete Agarosekügelchen immobilisiert (s. 2.3.4). Nach der Inkubation mit einem Zellysat wird das mit dem GST-Fusionsprotein interagierende Protein mit in das Sediment gezogen und kann so detektiert werden (Abb. 11).



Abb. 11: Schematische Darstellung der GTPase-Pull-Down-Experimente

Das ektopisch exprimierte HRAS-Protein ist im aktivem Zustand mit GTP beladen und kann daraufhin mit Effektorproteinen interagieren. Die RAS-Bindedomänen (RBD) der spezifischen Effektorproteine liegen als Fusionsproteine mit der Gluthation-S-Transferase (GST) vor und sind an Gluthation-beschichteten Sepharosekügelchen (S) immobilisiert. Über die spezifische Bindung des aktiven HRAS-Proteins an seinen Effektor kann dieses nun präzipitiert werden und mithilfe eines Hämagglutinin (HA)-Epitops mittels SDS-Page, Western Blot und Immundetektion dargestellt werden.

Für die Pull-Down-Experimente wurden COS-7-Zellen transient mit den pMT2SM-HA-DEST-HRAS-Konstrukten transfiziert und über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wurde das Medium verworfen, die Zellen auf Eis mit eiskaltem PBS (+/+) gewaschen, mit 1 ml eiskaltem GTPase-Pull-Down-Lysepuffer abgeschabt und durch Pipettieren homogenisiert. Die Zelltrümmer wurden für 10 min bei 14000 Upm und 4°C abzentrifugiert und der Überstand in ein neues Gefäß überführt. Von diesem Rohlysate wurden 120 µl zurückbehalten und mit 40 µl 4xSDS-Ladepuffer versetzt. Der Rest wurde zu je 20 µl gereinigter GST-Agarosekügelchen gegeben und für 45 min bei 4°C auf einem Überkopffrotator inkubiert. Im Anschluss wurden die Kügelchen für 2 min bei 2500 Upm und 4°C sedimentiert, der Überstand verworfen und das Pellet dreimal mit 1 ml eiskaltem GTPase-Pull-Down-Lysepuffer gewaschen. Nach dem letzten Zentrifugationsschritt wurde der Überstand bis auf 30 µl abgenommen und der Rest mit 10 µl 4xSDS-Ladepuffer versetzt und für ca. 5 min aufgekocht. Die Rohlysate und die Proben nach dem Pull-Down wurden auf ein SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen und anschließend mittels Western-Blot und Immundetektion untersucht.

Bei allen anderen Experimenten, bei denen nach der Zellyse kein Pull-Down-Experiment durchgeführt wurde, erfolgte die Lyse in einer entsprechenden Menge RIPA-Puffer, dem pro 10 ml je eine Tablette Complete Mini Proteinaseinhibitor und PhosStop zugesetzt wurden. Zur Abtrennung der Zelltrümmer und Zellkerne erfolgte ebenfalls ein Zentrifugationsschritt bei 14000 Upm und 4°C für 10 min. Der Überstand wurde mit 4xSDS-Ladepuffer versetzt und nach fünfminütigem Aufkochen bei 95°C direkt für die SDS-Page weiterverwendet.

2.4 Zellbiologische Methoden

2.4.1 Zellkultur

2.4.1.1 Allgemeine Kulturbedingungen

Für die Zellkulturexperimente wurden HeLa- und COS-7-Zellen verwendet. Sie wurden in einem Begasungsbrutschrank bei 37°C, 95% relativer Feuchte und 5% CO₂ kultiviert. Alle Zellkulturarbeiten wurden unter sterilen Bedingungen an einer sterilen Arbeitsbank durchgeführt. Beide Zelllinien wurden als Adhäsionskulturen auf Polystyrol-Zellkulturschalen gehalten. Für die Experimente wurden sie teilweise auf 6-Loch-Platten passagiert. Die Kultivierung beider Zelllinien erfolgte in Dulbecco's modifiziertem Eagle Medium (DMEM) mit 10% fötalem Rinderserum (*fetal bovine serum*, FBS) und 100 U/ml Penicillin/100 µg/ml Streptomycin.

2.4.1.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen wurden alle zwei bis vier Tage bei einer Konfluenz von etwa 90% auf neue Kulturschalen überführt. Dazu wurde das Kulturmedium abgesaugt und die Zellen einmal mit 5-10 ml 1xPBS gewaschen, um die im Serum enthaltenen Proteaseinhibitoren zu entfernen. Die Zellen wurden dann durch Zugabe von 1 ml Trypsin und 2-5 minütiger Inkubation bei 37°C von der Kulturschale abgelöst und je nach Wachstumsgeschwindigkeit und gewünschter Verdünnung im Verhältnis 1:2 bis 1:20 in eine neue Kulturschale mit 10 ml Vollmedium überführt.

2.4.1.3 Transiente Transfektion von eukaryotischen Zellen

In dieser Arbeit wurde mithilfe des *Lipofetatmin*TM2000-Reagenz transfiziert. Diese Methode beruht auf dem Prinzip der Lipofektion. Es werden kationische Lipide eingesetzt, die über ionische Interaktionen mit der eingesetzten DNA Lipid-DNA-Komplexe bilden. Die Zellen nehmen diese Komplexe durch Endozytose auf, wodurch die Plasmid-DNA in die Zelle gelangt und transkribiert sowie anschließend von dieser translatiert wird.

Für die Transfektion wurden je 400000 Zellen auf 6-Lochplatten bzw. je 1,2 x10⁶ Zellen auf 100 mm-Kulturschalen ausgesät, so dass sie einen Tag später etwa eine Konfluenz von 70-80% erreicht hatten und transfiziert werden konnten. Bei Verwendung des *Lipofectaim*TM2000-Reagenz wurden die Lösung I (je Ansatz 100 µl Optimem + 1 µg Plasmid-DNA) und Lösung II (je Ansatz 100 µl Optimem + 5 µl *Lipofectamin*TM2000-Reagenz) hergestellt, 5 min bei RT inkubiert und dann durch Pipettieren gemischt. Diese Transfektionslösung wurde dann für weitere 20-30 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurden die zu transfizierenden Zellen mit 1xPBS gewaschen und mit

vorgewärmtem Optimum überschichtet. Es folgte eine Inkubation von 5-10 min bei 37°C und 5% CO₂. Danach wurde die Transfektionslösung auf die Zellen aufgetropft, die Kulturgefäße leicht geschwenkt und wiederum bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Nach fünf bis sechs Stunden wurde die Transfektionslösung abgesaugt, die Zellen in Vollmedium (DMEM+10% FBS) bzw. Hungermedium (DMEM+0,1% FBS) für weitere 24-48 h bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und diese dann in den entsprechenden Experimenten eingesetzt.

2.4.2 Stimulation der Zellen mit Anisomycin

Um bestimmte Signalwege in den HeLa-Zellen verstärkt zu aktivieren, wurden diese für einige Experimente dem Zellgift Anisomycin ausgesetzt. Nachdem die Zellen über Nacht in Hungermedium (DMEM+0,1% FBS) bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert wurden, wurde dieses abgesaugt und durch ein Nährmedium (DMEM+10% FBS) ersetzt, welches mit 50 ng/ml Anisomycin versetzt war. Je nach Versuchsansatz wurden die Zellen für 20, 40 bzw. 80 min in diesem Medium bei 37°C und 5% CO₂ kultiviert und anschließend lysiert.

IV. Ergebnisse

1 Mutationsanalyse der Gene *SHOC2*, *GNAI2* und *ERBB4* bei Patienten mit Verdacht auf eine Erkrankung aus dem Spektrum der NCFC-Erkrankungen

1.1 Vorbemerkungen

Für die Mutationsanalysen standen genomische DNAs aus drei unterschiedlichen Kollektiven mit je 98, 50 bzw. 92 Patienten mit klinischem Verdacht auf eine Erkrankung aus dem NCFC-Spektrum zur Verfügung. Im Rahmen dieser Arbeit sollten ausgewählte Exons der Gene *SHOC2*, *GNAI2* und *ERBB4* auf eventuell vorliegende Mutationen hin untersucht werden.

1.2 PCR-Amplifikation eines Teils des Exons 2 von *SHOC2* und Nachweis der Mutation c.4A>G mittels Restriktionsspaltung

Das *SHOC2*-Gen besteht aus 9 Exons, wobei die Exons 2 bis 9 die Kodieregion beinhalten. Bisher konnte nur eine wiederkehrende Missense-Mutation, nämlich der Austausch von Adenin zu Guanin an Position 4 der Kodierregion [c.4A>G(p.S2G)] als krankheitsverursachend für einen Subtyp des Noonan-Syndroms identifiziert werden (Cordeddu et al. 2009, Komatsuzaki et al. 2010, Simsek-Kiper et al. 2012). Daher beschränkte sich diese Arbeit darauf, das Patientenkollektiv auf diese bestimmte Mutation hin zu untersuchen. Dies erfolgte mithilfe von PCR und Restriktionsspaltung. Das amplifizierte PCR-Produkt enthielt eine Schnittstelle für das Restriktionsenzym *StyI*. Das Vorhandensein der o. e. Mutation führt zur Einführung einer weiteren Schnittstelle für *StyI*. So war anhand der erhaltenen Fragmente nach einer Restriktionsspaltung mit *StyI* erkennbar, ob ein mutationstragendes Allel vorlag oder nicht.

Dazu wurde aus der genomischen DNA von insgesamt 186 Patienten (1, 2, 4, 6-22, 24-26, 29, 34, 36-98 und N01-11, N13-18, N20-24, N26-30, N32-88, N90-99, N105-108) mittels PCR ein Teil des Exons 2 amplifiziert. Dieses PCR-Produkt hatte eine Größe von 464 Bp. Die PCR-Bedingung wurde zuvor an genomischen Kontroll-DNAs etabliert. Anhand eines Agarosegels wurden die PCR-Produkte auf Quantität und Qualität hin untersucht. Außerdem wurde je nach Bandenstärke abgeschätzt, wie viel PCR-Produkt für die Restriktionsspaltung eingesetzt werden sollte. Im anschließenden Restriktionsverdau mit dem Enzym *StyI* wurden die PCR-Produkte gespalten und in einem Agarosegel aufgetrennt. Bei Vorliegen der Wildtyp-Sequenz ergaben sich

Fragmente von 302 Bp und 162 Bp. Für das mutationstragende Allel waren dagegen Fragmente von 241 Bp, 162 Bp und 61 Bp zu erwarten. Da die Mutation in der Regel in heterozygotem Zustand vorliegt, konnte ein Patient durch das Auftreten zusätzlicher Banden von 241 Bp und 61 Bp als mutationspositiv identifiziert werden. Abbildung 12 zeigt ein zur Auswertung verwendetes Agarosegel, in welchem sich die nach dem *Styl*-Restriktionsverdau entstandenen DNA-Fragmente darstellen.

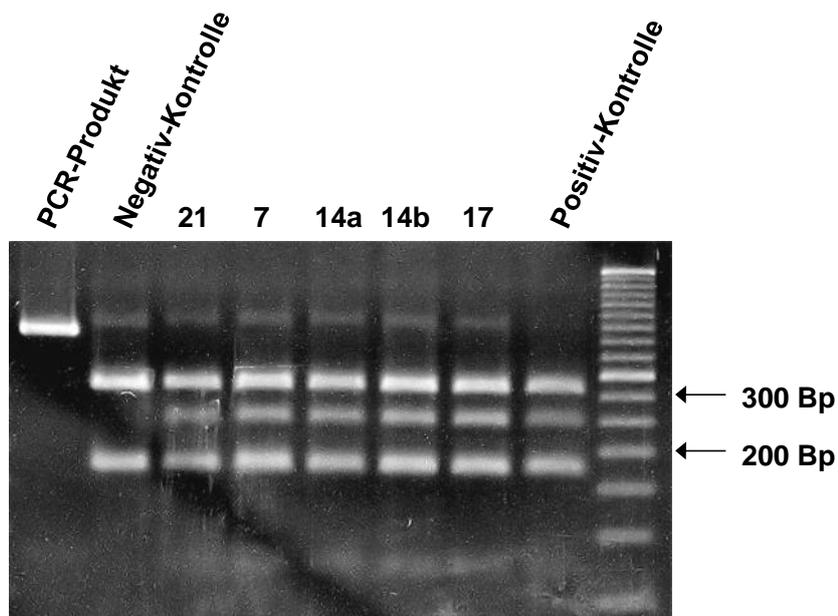


Abb. 12: Darstellung der DNA-Fragmente des *SHOC2*-Exons 2 nach dem Restriktionsverdau mit *Styl*

Die Abbildung zeigt ein 2,5%iges-Agarosegel, auf welchem einige DNA-Fragmente nach dem Restriktionsverdau mit *Styl* aufgetragen wurden. Es handelt sich dabei um die Patienten-Proben 21, 7, 14 a und b sowie 17. Zum Vergleich ist ganz links ein unverdautes PCR-Produkt (464 Bp) aufgetragen. Links und rechts der Patienten-Proben wurden eine Negativ- und eine Positiv-Kontrolle aufgetragen. Bei allen Patienten ließ sich die beschriebene Mutation in *SHOC2* nachweisen, da bei allen, wie bei der Positiv-Kontrolle, die Fragmente von 302 Bp, 241 Bp, 162 Bp und 61 Bp darstellbar waren. Ganz rechts wurde ein 50 Bp-Längenstandard aufgetragen, an dem die 200 Bp- und 300 Bp-Bande jeweils mit einem Pfeil markiert sind.

Bei sechs der insgesamt 186 analysierten Patienten konnte die bekannte pathogene Mutation c.4A>G (p.S2G) nachgewiesen werden. Dabei handelt es sich um die Patienten 7, 14a und b, 17, 21, 76 und 77 (Abb. 12). Die Patienten 14a und b sind eineiige Zwillinge.

Im Falle der Patientin 76 lag auch genomische DNA der Eltern vor. So konnte überprüft werden, ob die Mutation bei dieser Patientin *de novo* vorliegt. Dies wurde nach der Amplifikation der PCR-Produkte mit direkter Sequenzierung überprüft. Abbildung 13 zeigt sowohl das Sequenzchromatogramm der Patientin 76 mit der Mutation c.4A>G (p.S2G) als auch die entsprechenden Ausschnitte der elterlichen Sequenzen. Beide Elternteile weisen die Wildtypsequenz auf.

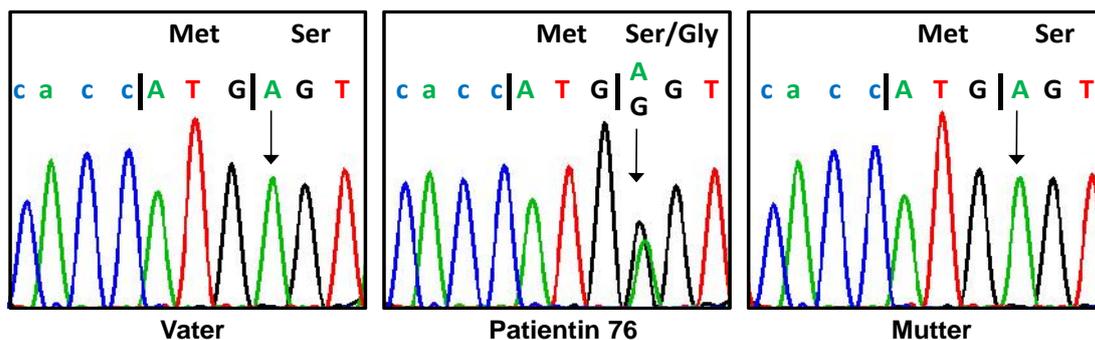


Abb. 13: Ausschnitte aus Sequenzchromatogrammen des Exons 2 des *SHOC2*-Gens von Patientin 76 und ihren Eltern

Die Abbildung zeigt Ausschnitte aus den Sequenzen des *SHOC2*-Exons 2 von Patientin 76 (Mitte), ihrem Vater (links) und ihrer Mutter (rechts). Die Patientin trägt einen heterozygoten Basenaustausch an der Position c.4 von Adenin (A) zu Guanin (G). Die Heterozygotie sowie die Wildtypbasen in den elterlichen Sequenzen sind mit Pfeilen gekennzeichnet. Nicht-kodierende Basen sind in Kleinbuchstaben geschrieben, kodierende Basen in Großbuchstaben (A - Adenin, G - Guanin, C - Cytosin, T - Thymin). Jede Base wird durch eine Kurve in entsprechender Farbe repräsentiert (A – grün, C – blau, G – schwarz und T – rot). Die Aminosäuren-Triplets sind durch senkrechte Striche voneinander getrennt und die entsprechenden Aminosäuren im Drei-Buchstaben-Code angegeben. Bei der Patientin kommt es zu einem Austausch von Serin zu Glycin (Ser/Gly).

Zur Überprüfung der Elternschaft erfolgte daraufhin eine Mikrosatellitenanalyse der DNAs des Eltern-Kind-Trios. Dafür wurden von allen drei DNAs PCRs für 13 verschiedene Mikrosatelliten-Marker durchgeführt. Exemplarisch sind in Abbildung 14 die Ergebnisse für den Mikrosatelliten-Marker *D15S117* gezeigt: Das Kind hat von jedem Elternteil ein Allel geerbt.

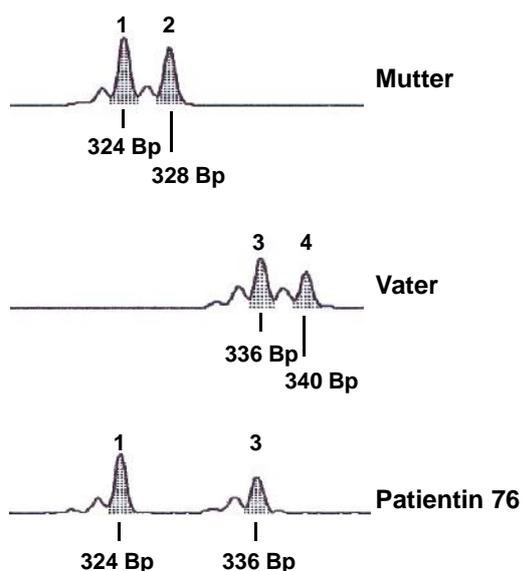


Abb. 14: Darstellung der Chromatogramme des Mikrosatelliten-Markers *D15S117* von Patientin 76 und ihren Eltern

In der Abbildung sind untereinander die Chromatogramme der Mutter, des Vaters und der Patientin 76 abgebildet. Die Allele werden durch die grau unterlegten Peaks repräsentiert. Die Größe der Allele ist unter jedem Peak angegeben. Die Allele wurden der Größe nach nummeriert, beginnend mit dem kleinsten.

Einen Überblick über die Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse gibt die nachfolgende Tabelle (Tab. 20). Bei allen analysierten Mikrosatelliten-Markern konnte bei der

Patientin sowohl ein von der Mutter, als auch ein vom Vater stammendes Allel nachgewiesen werden. Damit gilt die Elternschaft des untersuchten Paares für die Patientin 76 als sehr wahrscheinlich.

Mikrosatelliten-Marker	Mutter	Vater	Patientin 76
D2S2330	1 - 2	3 - 4	1 - 3
D3S1614	2 - 3	1 - 2	2 - 2
D5S2027	2 - 3	1 - 2	1 - 2
D5S406	3 - 3	1 - 2	2 - 3
D5S647	2 - 3	1 - 3	1 - 2
D6S1581	2 - 2	1 - 2	1 - 2
D8S272	2 - 3	1 - 3	3 - 3
D9S1817	1 - 3	2 - 4	2 - 3
D12S1659	2 - 3	1 - 3	1 - 2
D13S217	2 - 4	1 - 3	2 - 3
D14S990	1 - 3	1 - 2	1 - 2
D15S117	1 - 2	3 - 4	1 - 3
DXS990	1 - 2	1	1 - 1

Tab. 20: Auswertung der Mikrosatellitenanalyse für den Elternschaftsnachweis bei Patientin 76

Die Tabelle gibt alle verwendeten Mikrosatelliten-Marker an. Für jede Person der Familie ist die Konstellation der Allele der Größe nach angegeben, wobei die niedrigste Zahl das kleinste Allel repräsentiert. Die mütterlichen Allele sind rot, die väterlichen blau gekennzeichnet.

1.3 PCR-Amplifikation ausgewählter Exons des *GNAI2*-Gens und anschließende direkte DNA-Sequenzierung

Das *GNAI2*-Gen besteht aus 9 Exons, wovon Exon 1 bis 8 kodierend sind. Für zwei Mutationen [c.535C>T (p.R179C), c.615A>T (p.Q205L)] in *GNAI2*, die in endokrinen Tumoren nachgewiesen wurden, konnte eine konstitutive Aktivität des Genprodukts nachgewiesen werden (Lyons et al. 1990). Des Weiteren ist in der Maus eine Punktmutation [c.550G>A (p.G184S)] beschrieben, die zu einer fehlenden negativen Regulierung des *Gnai2*-Genproduktes führt (Huang et al. 2009). Alle drei Mutationen liegen im Bereich der Exons 5 und 6. Diese Arbeit beschränkt sich bei der Mutationsanalyse dieses Gens daher auf die Exons 5 bis 7. Exon 7 wurde mit analysiert, da das Intron 6 sehr klein ist und so die beiden Exons 6 und 7 in einem PCR-Amplikon zusammengefasst wurden.

Die jeweiligen Primerpaare wurden so gelegt, dass zu jeder Seite mindestens noch 40 Bp intronische Sequenz das Exon flankieren. Die Etablierung optimaler PCR-Bedingungen wurde wiederum an Kontroll-DNAs durchgeführt. Daraufhin wurden aus der genomischen DNA von insgesamt 219 Patienten (E01-E50, N01-11, N13-18, N20-24, N26-30, N32-88, N90-99, N105-108 und 1, 2, 4, 6, 8-13, 15-16, 18-20, 22-27, 29, 31, 34-72, 78-98) die o. e. Exons amplifiziert und im Agarosegel überprüft. Die nachfolgende Abbildung zeigt exemplarisch ein Foto eines Agarosegels mit den PCR-Produkten der Exons 6 und 7 des *GNAI2*-Gens.

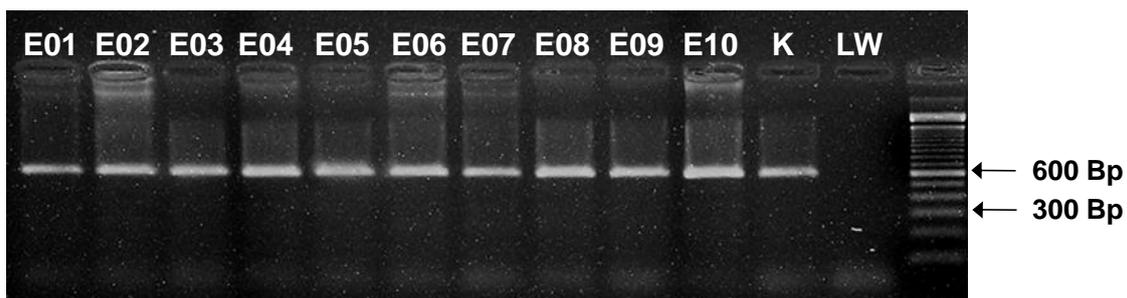


Abb. 15: Darstellung eines Agarosegels mit einigen die Exons 6 und 7 des *GNAI2*-Gens umfassenden PCR-Produkten

Das Bild zeigt ein 2%iges Agarosegel mit den PCR-Produkten der Exons 6 und 7 des *GNAI2*-Gens von 10 Patienten (E01-E10) sowie einer Kontroll-DNA (K). Im Ansatz für den Leerwert (LW) befindet sich keine DNA. Die PCR-Produkte haben eine Größe von 600 Bp. Ganz rechts wurde ein 100 Bp-Längenstandard aufgetragen. An diesem sind die 300 Bp- und 600 Bp-Banden jeweils mit einem Pfeil markiert.

Nach Überprüfung der PCR-Produkte wurden diese enzymatisch aufgereinigt und sequenziert. Dabei konnte bei 21 Patienten die im Intron 6 lokalisierte Sequenzvariante c.877+29A>G festgestellt werden, die jeweils heterozygot vorlag (Daten nicht gezeigt). Diese Variante ist bereits in der NCBI-Datenbank als *single nucleotide polymorphism* (SNP) verzeichnet (*rs9830408*).

1.4 PCR-Amplifikation ausgewählter Exons des *ERBB4*-Gens und anschließende direkte DNA-Sequenzierung

Das *ERBB4*-Gen besteht aus 28 Exons, wovon alle kodierend sind. Diese Arbeit beschränkte sich auf die Analyse von sechs Exons (Exons 8, 12, 14, 15, 21 und 28), in denen am häufigsten Mutationen in malignen Melanomen festgestellt wurden (Prickett et al. 2009). Das Design der Primer sowie das Etablieren von optimalen PCR-Bedingungen erfolgte wie unter 1.3 beschrieben. Mittels PCR wurden die beschriebenen Exons aus 19 ausgewählten genomischen Patienten-DNAs amplifiziert. Dabei handelt es sich um die Patienten 1, 2, 4, 6, 8-10, 12, 15, 16, 20, 22, 36, 39, 45, 47, 59, 66 und 75. Die Auswahl dieser Patienten wurde anhand der klinischen Merkmale vorgenommen. Die Genannten erfüllten am besten die Kriterien für eine

Erkrankung aus dem NCFC-Spektrum. Nach der quantitativen und qualitativen Überprüfung der PCR-Produkte im Agarosegel wurden diese enzymatisch aufgereinigt und anschließend sequenziert. Die folgende Abbildung (Abb. 16) zeigt exemplarisch ein Foto eines Agarosegels mit den PCR-Produkten des Exons 15.

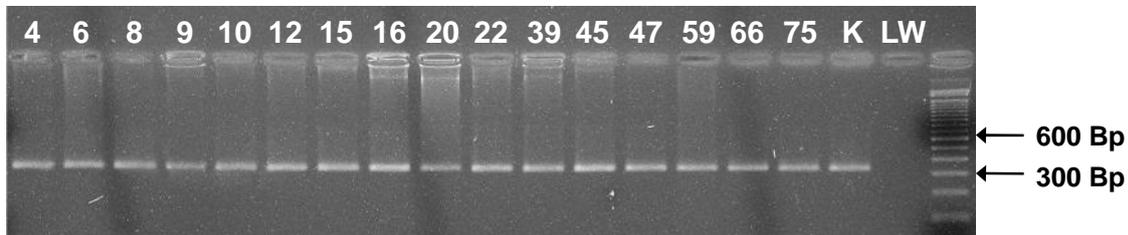


Abb. 16: Darstellung eines Agarosegels mit einigen PCR-Produkten des Exons 15 des *ERBB4*-Gens

Das Bild zeigt ein 2%iges Agarosegel mit den PCR-Produkten des Exons 15 des *ERBB4*-Gens von 16 Patienten (4, 6, 8, 9, 10, 12, 15, 16, 20, 22, 39, 45, 47, 59, 66, 75) sowie einer Kontroll-DNA (K). Im Ansatz für den Leerwert (LW) befindet sich keine DNA. Die PCR-Produkte haben eine Größe von 333 Bp. Ganz rechts wurde ein 100 Bp-Längenstandard aufgetragen. An diesem sind die 300 Bp- und 600 Bp-Banden jeweils mit einem Pfeil markiert.

Bei der Auswertung ergab sich eine Sequenzvariante im Intron 21, die bei insgesamt 12 der Patienten festgestellt wurde und bei allen in heterozygotem Zustand vorlag. Es handelt sich dabei um eine Duplikation eines Adenins an der Position c.2613+79 (Daten nicht gezeigt). Diese Variante ist bisher in keiner Datenbank (NCBI, ENSEMBL) beschrieben. Da die Überprüfung mit den Programmen *Mutation Taster*, *NetGene2*, *Splice Site Prediction* und *SpliceView* keinen Hinweis auf eine Spleißmutation ergab, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei mit großer Wahrscheinlichkeit um einen Polymorphismus handelt.

2 Funktionsanalyse der bei einer Patientin mit Costello-Syndrom identifizierten *HRAS*^{E63_D69dup}-Mutation

2.1 Vorbemerkungen

Um die funktionellen Auswirkungen der c.187_207dup (p.E63_D69dup)-Mutation in *HRAS* zu untersuchen, musste diese zunächst in die *HRAS*-cDNA eingeführt werden. Dies erfolgte mittels PCR-vermittelter Mutagenese (s. III.2.1.7.1). Nach erfolgter Mutagenese und Klonierung in einen eukaryotischen Expressionsvektor konnte das gewünschte Protein mittels transienter Transfektion in COS-7-Zellen exprimiert werden. Anschließend wurde die Auswirkung der Mutation auf die Interaktion von *HRAS* mit einigen Effektoren sowie auf *HRAS*-abhängige Signalkaskaden untersucht.

2.2 Analyse der Aktivierung und Effektorenbindung von HRAS mittels GTPase-Kopräzipitation

Als zentraler Bestandteil vieler Signaltransduktionswege in der Zelle hat HRAS verschiedene Effektoren. Inwiefern die p.E63_D69dup-Mutation die Interaktion von HRAS mit diesen Effektorproteinen beeinflusst, wurde mithilfe von Präzipitationsexperimenten untersucht. Hierbei wird nicht nur der Einfluss der Mutation auf die Interaktion, sondern auch auf die Aktivität von HRAS selbst untersucht, da nur aktives, GTP-gebundenes HRAS an Effektoren bindet. Bei diesen Versuchen, auch GTPase-Pull-Down-Experimente genannt, wurden die RAS-Bindedomänen diverser Effektorproteine verwendet, die in Bakterien als Fusionsproteine mit der Glutathion-S-Transferase (GST) exprimiert und anschließend aufgereinigt wurden. Diese Fusionsproteine werden an Glutathion-beschichteten Sepharosekügelchen immobilisiert und können daraufhin als Köder zur Präzipitation von aktivem HRAS aus Zelllysaten eingesetzt werden.

Um Vergleichswerte zu erhalten, wurde in COS-7-Zellen neben HRAS^{E63_D69dup} in parallelen Ansätzen HRAS^{WT}, das onkogene HRAS^{G12V} (Bos 1989) und die am häufigsten mit dem Costello-Syndrom assoziierte Mutante HRAS^{G12S} (Aoki et al. 2005, Gripp et al. 2006, Gripp und Lin 2012) exprimiert. Als weitere Kontrolle wurde die dominant-negative Mutante S17N eingesetzt (Farnsworth und Feig 1991, Stacey et al. 1991). Zur Präzipitation wurde die RAS-Bindedomäne (RBD) von RAF1 (RAF1::RBD) bzw. PI3K (PIK3CA::RBD) oder die RAS-assoziierte Domäne (RA) von RALGDS (RALGDS::RA) bzw. PLC (PLC ::RA) verwendet.

In den Präzipitaten der HRAS^{G12S}- und HRAS^{G12V}-überexprimierenden Zellen zeigte sich im Vergleich zum Präzipitat der HRAS^{WT}-überexprimierenden Zellen eine deutlich höhere Menge an HRAS in allen vier mit unterschiedlichen Effektordomänen durchgeführten Pull-Down-Experimenten (Abb. 17 A-D, Spalten 2, 4 und 5, Präzipitate). Dagegen zeigte sich für die HRAS-Variante S17N in den Präzipitaten eine verminderte Menge an HRAS, verglichen mit den Wildtyp-überexprimierenden Zellen (Abb. 17 A-D Spalten 2 und 6, Präzipitate). Die Menge an HRAS^{E63_D69dup} entsprach bei den Präzipitationen mit RAF1, PLC und RALGDS in etwa derjenigen von HRAS^{G12V} oder HRAS^{G12S}, während sie bei der Präzipitation mittels PIK3CA geringer war als diejenige von HRAS^{WT} (Abb. 17 A-D, Spalten 2-5, Präzipitate). Diese Ergebnisse führten zu der Annahme, dass HRAS^{E63_D69dup} zum einen vermehrt in einer aktiven Konformation vorliegt, was eine effiziente Interaktion mit RAF1, RALGDS und PLC ermöglicht, und zum anderen, dass die p.E63_D69dup-Mutation die HRAS-Bindung an PIK3CA abschwächt.

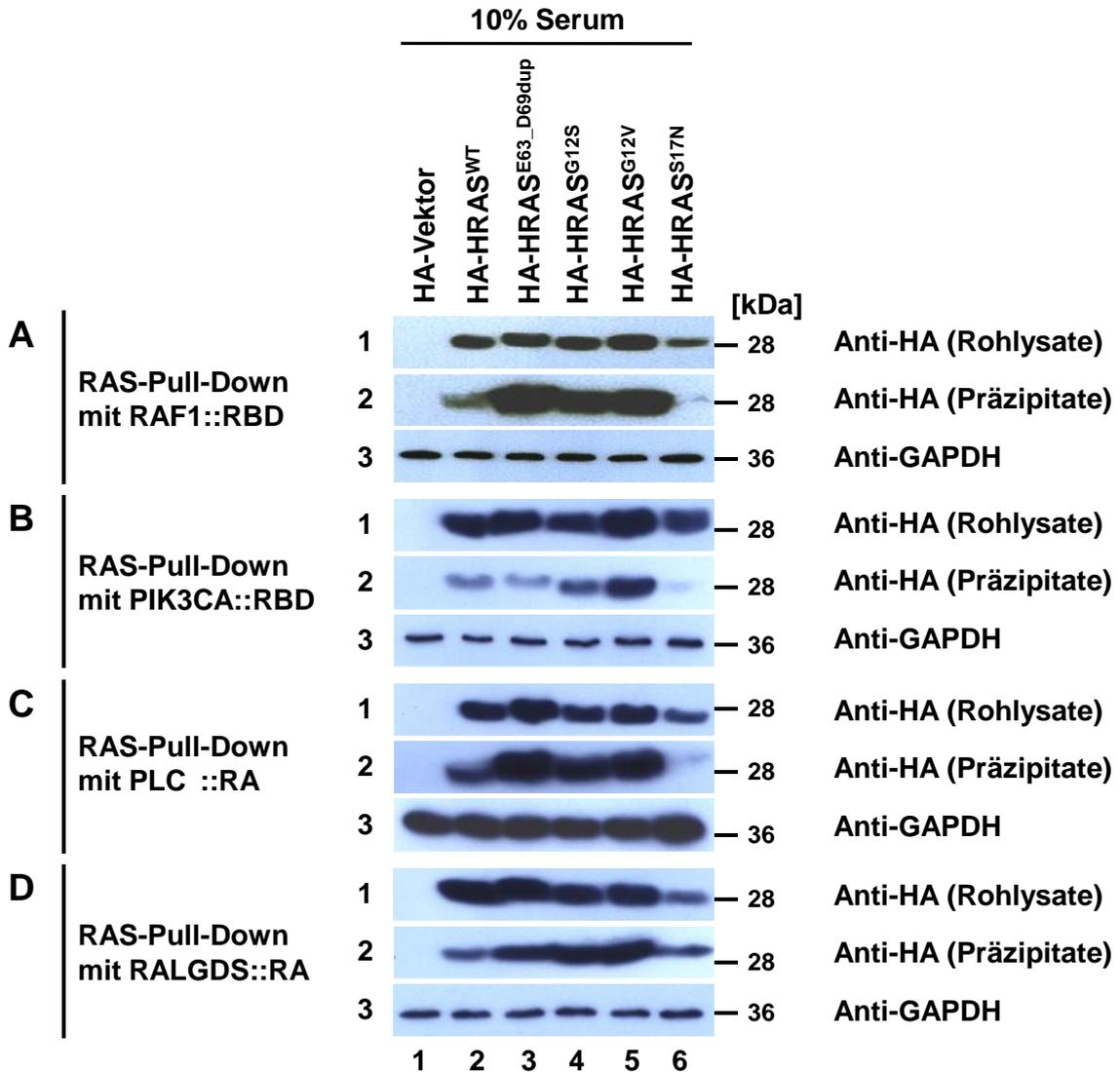


Abb. 17: Darstellung der Interaktion mit verschiedenen Effektoren und des Aktivierungsgrades der unterschiedlichen HRAS-Proteinvarianten

COS-7-Zellen wurden jeweils mit dem über den Blots angegebenen HRAS-Konstrukt transfiziert. Die Lyse der Zellen erfolgte nach ca. 24h Inkubation in Normalmedium (DMEM+10% FBS). Aus den Lysaten wurden die aktiven GTP-gebundenen HA-HRAS-Proteine mit Hilfe von GST-RAF1::RBD- (A), GST-PIK3CA::RBD- (B), GST-PLC ::RA- (C) und GST-RalGDS::RA-Fusionsproteinen (D) präzipitiert (RBD: *RAS binding domain*, RA: *RAS association domain*). Die verschiedenen exprimierten HRAS-Proteinvarianten in den Rohlysaten und Präzipitaten wurden mittels SDS-Page und Western-Blot auf Membranen transferiert und über ihr HA-Epitop mittels anti-HA-Antikörper detektiert (jeweils Zeile 1+2). Zur Ladekontrolle wurde die Menge an GAPDH bestimmt (jeweils Zeile 3). Rechts ist jeweils eine molare Masse des mitaufgetragenen Proteinstandards angegeben.

2.3 Untersuchungen zur Auswirkung verschiedener HRAS-Varianten auf RAS-abhängige Signalkaskaden

GTP-gebundenes HRAS aktiviert u. a. die Signalkaskaden RAF-MEK-ERK und PI3K-AKT. Um herauszufinden, inwieweit die p.E63_D69dup-Mutation in HRAS die Signalweiterleitung innerhalb dieser Signalwege beeinflusst, wurden die Phosphorylierungszustände von beteiligten Protein-Kinasen untersucht. Hierfür wurden wiederum COS-7-Zellen mit den unter 2.2 bereits erwähnten HRAS-Konstrukten transfiziert. Die COS-7-Zellen wurden unter zwei verschiedenen Bedingungen kultiviert, nämlich in Normalmedium (DMEM+10% FBS) und in Hungermedium (DMEM+0,1% FBS). In den Lysaten wurde die Menge an phosphoryliertem MEK, ERK und AKT mittels Western-Blotting und Immundetektion mit phosphospezifischen Antikörpern bestimmt.

Unter beiden Kulturbedingungen führte die Expression sowohl von HRAS^{G12S} als auch HRAS^{G12V} zu einer erhöhten Phosphorylierung von MEK1/2 und ERK1/2 im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 18, Zeilen 3 und 5). Für AKT ließ sich dagegen nur bei einer Kultivierung in Hungermedium eine verstärkte Phosphorylierung nachweisen, während unter Normalmedium kein Unterschied zum Wildtyp sichtbar war (Abb. 18, Zeile 7). Dagegen zeigte sich in allen Versuchen, dass HRAS^{S17N} zu einer verminderten Phosphorylierung der untersuchten Kinasen führt (Abb. 18, Spalten 6 und 12). Die p.E63_D69dup-Mutation führte in beiden untersuchten Signalkaskaden unter Hungerbedingungen (0,1% Serum) zu einer erhöhten Phosphorylierung der beteiligten Kinasen. Allerdings zeigte sich diese viel deutlicher für MEK1/2 und ERK1/2 als für AKT (Abb. 18, Zeilen 3, 5 und 7). Bei der Kultivierung in Normalmedium konnte wiederum nur eine Zunahme an phosphoryliertem MEK1/2 und ERK1/2 beobachtet werden. Bei AKT war kein Unterschied zum Wildtyp zu erkennen (Abb. 18, Zeile 7, Spalten 8 und 9).

Zusammenfassend führt die E63_D69dup-Mutation in HRAS zu einer verstärkten Signaltransduktion, wobei Signalwege über die MAP-Kinasen MEK1/2 und ERK1/2 deutlicher überaktiviert werden als solche über AKT, welche nicht bzw. nur marginal verstärkt zu sein scheinen.

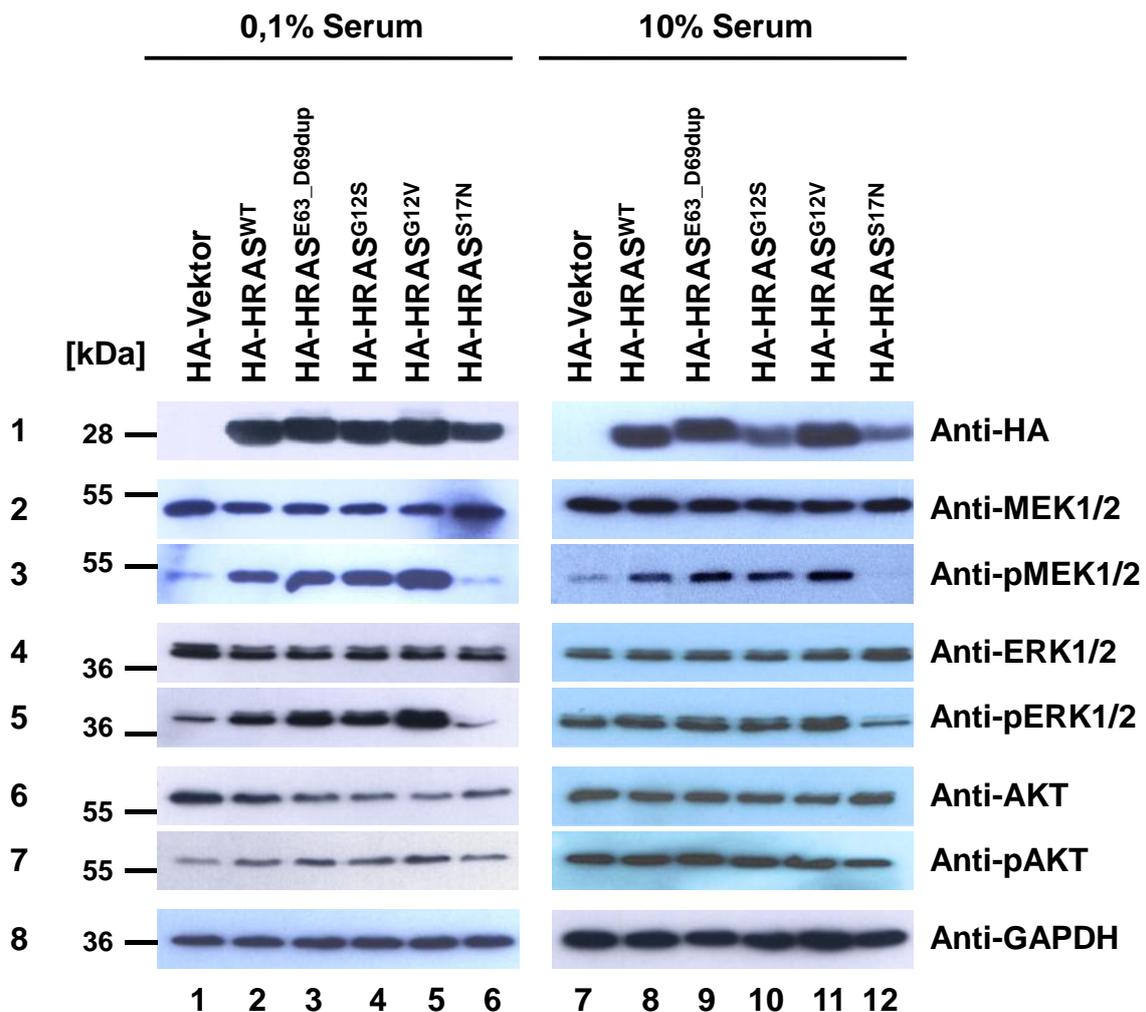


Abb. 18: Analyse des Phosphorylierungszustandes der RAS-abhängigen Kinasen MEK1/2, ERK1/2 und AKT mittels Immunblotting

COS-7-Zellen wurden jeweils mit dem über den Blots angegebenen HRAS-Konstrukt transfiziert und anschließend für 24h entweder in Hungermedium (0,1% Serum) oder Normalmedium (10% Serum) kultiviert. Nach Zellyse, SDS-Page und Western-Blot erfolgte die Detektion mit Antikörpern gegen MEK1/2, phosphoryliertes MEK1/2 (pMEK1/2), ERK1/2, phosphoryliertes ERK1/2 (pERK1/2), AKT sowie phosphoryliertes AKT (pAKT). Die Expression der HA-HRAS-Varianten wurde mittels HA-Antikörper überprüft. Zur Ladekontrolle wurde die Menge an GAPDH bestimmt. Links ist jeweils die molare Masse des mitaufgetragenen Proteinstandards angegeben.

3 Untersuchungen zur Aufklärung eines möglichen intrazellulären Signalweges von SOS1 zur MAP-Kinase MKK6

3.1 Vorbemerkungen

Die Hypothese zur Existenz eines möglichen intrazellulären Signalweges von SOS1 zu MKK6 beruht auf genetischen Erkenntnissen bei Patienten mit Gingivafibromatose. Sowohl die c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation in *SOS1* als auch Mutationen in *HRAS* und das *MAP2K6*-Gen (kodiert für die MAP-Kinase MKK6) einschließende

Duplikationen führen zur Gingivafibromatose (s. II.3.2). Zur Analyse dieser möglichen Signalkaskade wurden zwei verschiedene SOS1-Konstrukte hergestellt: zum einen das für die Expression des SOS1-Wildtyp-Proteins ($SOS1^{WT}$) benötigte und zum anderen das mit der c.3248dupC-Mutation ($SOS1^{Mut}$). Eine schematische Darstellung der diesen Konstrukten entsprechenden Proteine ist in Abbildung 19 gezeigt.

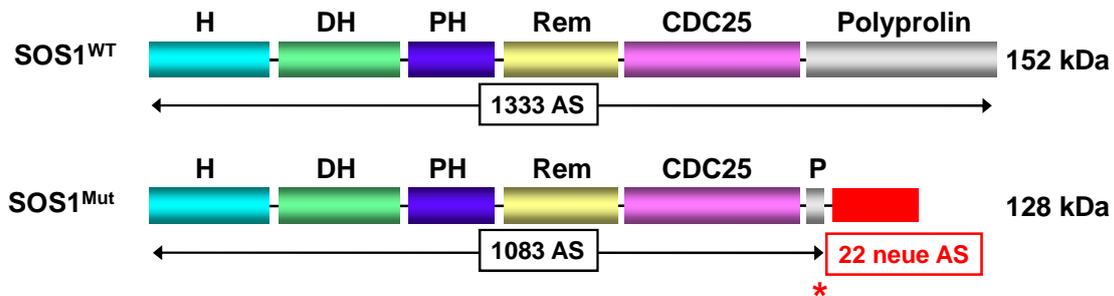


Abb. 19: Schematische Darstellung der SOS1-Proteine $SOS1^{WT}$ und $SOS1^{Mut}$

Schematische Darstellung der Proteinstruktur des SOS1-Wildtyp-Proteins ($SOS1^{WT}$) und des verkürzten mutierten (p.R1084Kfs*23) SOS1-Proteins ($SOS1^{Mut}$). Der Beginn der Leserasterverschiebung ist mit einem roten Stern gekennzeichnet. Rechts ist das jeweilige molekulare Gewicht in kDa angegeben. H: *Histone folds*, DH: *Dbl homology domain*, PH: *pleckstrin homology domain*, Rem: *Ras exchanger motif*, CDC25: *CDC25 homology domain*, Polyprolin: *proline-rich domain*.

Nach erfolgreicher Klonierung der jeweiligen cDNA in einen eukaryotischen Expressionsvektor sollten die Proteine nach transienter Transfektion in einer Zelllinie exprimiert und die Auswirkung der Mutation auf den Aktivitätszustand von MKK6 untersucht werden.

3.2 Herstellung der SOS1-Konstrukte und Nachweis der SOS1-Expression

Zunächst wurden die den unter 3.1 beschriebenen SOS1-Proteinvarianten entsprechenden cDNA-Fragmente mittels PCR hergestellt. Hierfür stand das Plasmid pCGN-SOS1 als Matrize zur Verfügung, welches die SOS1-Kodierregion enthält. Für das $SOS1^{WT}$ -Konstrukt wurde die gesamte Kodierregion unter Verwendung der Primer hSOS1wt/mut_pEDT_for und hSOS1wt_pEDT_rev amplifiziert. Zur Herstellung des $SOS1^{Mut}$ -Konstruktes wurde ein anderer Rückwärts-Primer (hSOS1mut_pEDT_rev) verwendet. Dieser enthält die Duplikation eines Cytosins (c.3248dupC) und endet mit dem durch die Leserasterverschiebung nach 22 neuen Triplets entstehenden, vorzeitigen Stopp-Codon (s. III.2.1.7.1). Die PCR-Produkte wurden mittels Agarosegelelektrophorese überprüft (Abb. 20).

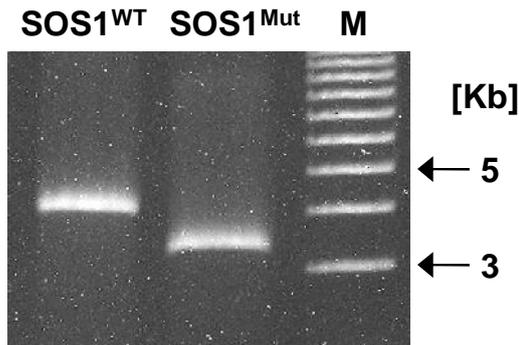


Abb. 20: Analytisches 0,8%iges Agarosegel nach der PCR-Mutagenese

Aufgetragen wurden die PCR-Produkte der Kodierregion für SOS1^{WT} (4006 Bp) und für SOS1^{Mut} (3321 Bp) sowie ganz rechts eine 1 Kb-DNA-Leiter als Marker (M). Hier sind die 3 Kb- und 5 Kb-Bande jeweils mit einem Pfeil markiert.

Die PCR-Produkte wurden über eine Topoisomerasereaktion in den GATEWAY-Eingangsvektor pENTR/D-TOPO kloniert. Nach der Transformation des Reaktionsprodukts in kompetente *E.coli* wurden diese mittels Kanamycin-Resistenz auf das Vorliegen des pENTR/D-TOPO-Vektors selektioniert. Es folgte die DNA-Präparation sowie ein *NotI*-*Bam*HI-Restriktionsverdau, mithilfe dessen die Plasmide auf das Vorhandensein des jeweiligen Inserts hin überprüft wurden. Danach wurden die jeweiligen Inserts sequenziert, um zum einen möglicherweise bei der PCR entstandene Mutationen auszuschließen und zum anderen das Vorliegen der c.3248dupC-Mutation im SOS1^{Mut}-Konstrukt zu überprüfen. Anschließend wurde das jeweilige DNA-Insert mittels einer LR-Rekombinationsreaktion in den eukaryontischen Expressionsvektor pMT2-SM-HA-DEST überführt. Es folgte wiederum eine Transformation von kompetenten *E.coli* mit diesem Reaktionsprodukt. Die *E.coli*-Bakterien wurden mithilfe der Ampicillin-Resistenz auf die Aufnahme von pMT2-SM-HA-SOS1^{WT} bzw. pMT2-SM-HA-SOS1^{Mut} hin selektioniert. Die über Mini-Präparation erhaltene Plasmid-DNA wurde wiederum mittels Restriktionsverdau untersucht (Abb. 21). Nach der Validierung je eines Klons wurde die entsprechende Plasmid-DNA nochmals mittels Maxi-Präparation isoliert, um eine größere und saubere DNA-Menge zu erhalten.

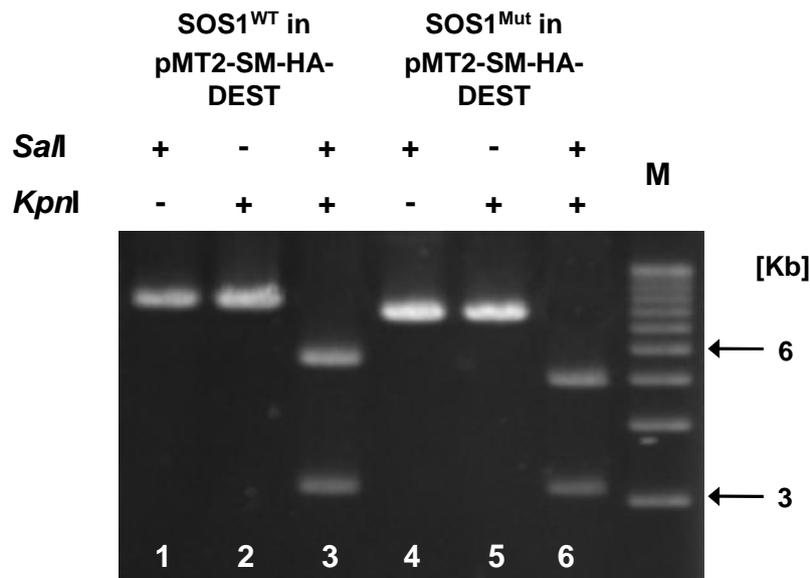


Abb. 21: Agarosegel (0,8%ig) nach der Restriktionsanalyse der extrahierten Plasmide pMT2-SM-HA-SOS1^{WT} und pMT2-SM-HA-SOS1^{Mut}

Es ist exemplarisch die Restriktionsanalyse je eines isolierten pMT2-SM-HA-SOS1^{WT}- (Spalte 1-3) und pMT2-SM-HA-SOS1^{Mut}-Plasmids (Spalte 4-6) dargestellt. Der Vektor enthält eine Schnittstelle für *Sa*II und das Insert eine für *Kpn*I. Nach dem Einzelverdau mit *Sa*II bzw. *Kpn*I ergaben sich Fragmente von 9,1 Kb für pMT2-SM-HA-SOS1^{WT} und 8,4 Kb für pMT2-SM-HA-SOS1^{Mut} (Spalten 1+2 bzw. 4+5). Beim Doppelverdau mit beiden Enzymen betragen die Fragmente 3,1 Kb und 6 Kb für den SOS1^{WT} enthaltenen Vektor (Spalte 3) und 3,1 Kb und 5,3 Kb für die mutationstragende Variante (Spalte 6). Ganz rechts ist eine 1 Kb-DNA-Leiter als Marker (M) aufgetragen, an der die 3 Kb- und 6 Kb-Banden mit Pfeilen markiert sind.

Im nächsten Schritt wurden HeLa-Zellen mit den beiden SOS1-Konstrukten transient transfiziert und nach der Lyse der Zellen die Proteinexpression und damit die Funktionalität der Konstrukte durch SDS-Page und Western-Blot überprüft. Als Negativ-Kontrolle wurden Zellen mit dem Leervektor pMT2-SM-HA-DEST transfiziert. Zur Detektion wurde ein Meerrettich-Peroxidase-gekoppelter HA-Antikörper verwendet, da die exprimierten SOS1-Proteine aufgrund des verwendeten Expressionsvektors mit einem HA-Tag versehen waren. Die beiden überexprimierten Proteine SOS1^{WT} und SOS1^{Mut} konnten in den HeLa-Lysaten nachgewiesen werden (Abb. 22). Dabei wurde weniger SOS1^{WT}-Protein detektiert als SOS1^{Mut} (Abb. 22).

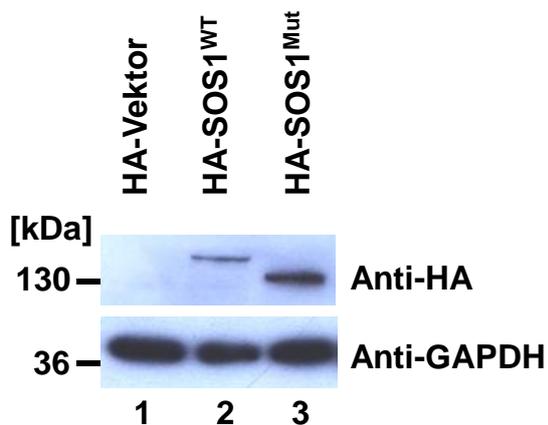


Abb. 22: Überexpression von $SOS1^{WT}$ und $SOS1^{Mut}$ in transient transfizierten HeLa-Zellen

Gezeigt ist der Western-Blot zur Darstellung der Proteinexpression von $SOS1^{WT}$ und $SOS1^{Mut}$ in HeLa-Zellen. Im oberen mit Anti-HA-Antikörpern detektierten Western-Blot kommen die beiden exprimierten $SOS1$ -Proteine zur Darstellung, wobei $SOS1^{WT}$ schwächer exprimiert wird als $SOS1^{Mut}$ (Spalten 2+3). Hier wird der Unterschied der molekularen Masse zwischen $SOS1^{WT}$ (152 kDa) und $SOS1^{Mut}$ (128 kDa) deutlich (Spalten 2+3). Im unteren Western-Blot ist die zur Ladekontrolle durchgeführte Detektion mit Anti-GAPDH-Antikörpern gezeigt. Links steht jeweils eine molekulare Masse des mitaufgetragenen Proteinstandards.

3.3 Etablierung eines Zellsystems zur Untersuchung des Phosphorylierungszustands von MKK6

3.3.1 Auswahl einer geeigneten Zelllinie

Nun galt es ein System zur Untersuchung des Phosphorylierungszustandes von MKK6 zu etablieren, um später den Einfluss der überexprimierten $SOS1$ -Proteine ($SOS1^{WT}$ und $SOS1^{Mut}$) auf diesen untersuchen zu können. Um die geeignete Zelllinie hierfür zu finden, wurden mehrere Zelllinien mittels SDS-Page und Western-Blot auf die endogene Expression von MKK6 hin untersucht. Von diesen Zelllinien lagen bereits Zelllysate vor. Im Einzelnen handelte es sich um folgende: NIH3T3-, A431-, HeLa-, HEK-, SKN-, SH SY5Y- und HT22-Zellen. Zur Detektion wurde ein Antikörper gegen MKK6 verwendet. Als Kontrolle wurde außerdem eine Detektion mit Antikörper gegen GAPDH durchgeführt, um anhand des Ergebnisses die aufgetragenen Gesamtproteinmengen vergleichen zu können. Es stellte sich heraus, dass bei gleicher Gesamtproteinmenge die Expression von MKK6 in den HeLa-Zellen am stärksten war (Abb. 23). Daher wurden diese als Zelllinie für alle weiteren Experimente ausgewählt.

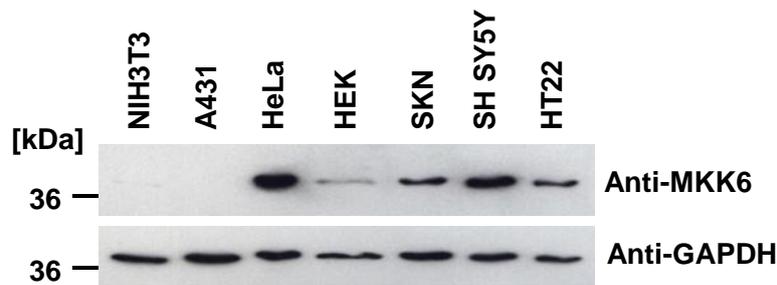


Abb. 23: Nachweis der MKK6-Proteinexpression in verschiedenen Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien (NIH3T3, A431, HeLa, HEK, SKN, SH SY5Y, HT22) sind oberhalb der Western-Blots angegeben. Der obere Western-Blot zeigt die Detektion mit Anti-MKK6-Antikörper, der untere die mit Anti-GAPDH-Antikörper. Links ist jeweils eine molekulare Masse eines mitaufgetragenen Proteinstandards angegeben.

3.3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Anisomycin auf den Phosphorylierungszustand von MKK6

Unter Normalbedingungen ist MKK6 nur sehr schwach phosphoryliert, weshalb ein geeigneter Stimulus benötigt wird, um den Phosphorylierungszustand zu untersuchen. Hierfür eignen sich extrazelluläre Stressfaktoren wie UV-Licht, osmotische Veränderungen und das Zelltgift Anisomycin (Stein et al. 1996). Es wurde daher eruiert, welcher dieser Faktoren die Aktivität von MKK6 in HeLa-Zellen am stärksten steigert. Die besten Ergebnisse konnten hierbei durch den Einsatz von Anisomycin erzielt werden. Hierfür wurden HeLa-Zellen über Nacht in Hungermedium kultiviert und 20 bzw. 40 min vor der Zellyse in Nährmedium mit Anisomycin überführt. Als Trägersubstanz für Anisomycin wurde DMSO (Dimethylsulfoxid) verwendet. Die Zellysate wurden durch SDS-Page aufgetrennt und mittels Western-Blot analysiert. Dabei wurden Antikörper sowohl gegen MKK6 als auch gegen phosphoryliertes MKK6 verwendet. Aufgrund großer Ähnlichkeiten der Oberflächenbeschaffenheit von MKK6 und MKK3 ist der Antikörper gegen die phosphorylierte Form nicht nur spezifisch für MKK6, sondern er erkennt auch phosphoryliertes MKK3 (Anti-pMKK3/6). Wie die folgende Abbildung zeigt, kommt es unter dem Einfluss von Anisomycin zu einer verstärkten Aktivierung von MKK6. Die größte Menge an phosphoryliertem MKK6 fand sich nach einer Anisomycin-Inkubationszeit von 40 min (Abb. 24). Damit konnte die erhöhte Aktivität von MKK6 unter dem Einfluss von Anisomycin (Stein et al. 1996) bestätigt werden.

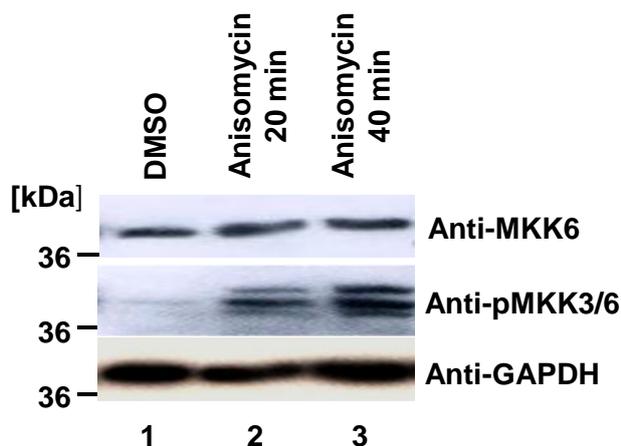


Abb. 24: Nachweis der verstärkten Phosphorylierung von MKK6 unter dem Einfluss von Anisomycin mittels Western-Blot

Oberhalb der Western-Blots sind die verschiedenen Zusätze im Nährmedium angegeben: DMSO (Spalte 1), Anisomycin (Spalten 2+3). Die Zellen wurden 20 min (Spalte 2) bzw. 40 min (Spalte 3) mit Anisomycin inkubiert. Die Detektion erfolgte beim oberen Western-Blot mit Anti-MKK6-Antikörper, beim mittleren mit Anti-pMKK3/6-Antikörper und beim unteren mit Anti-GAPDH-Antikörper. Links ist eine molekulare Masse eines mitaufgetragenen Proteinstandards angegeben.

3.3.3 Analyse der Phosphorylierung von MKK6 nach Überexpression von SOS1-Varianten in HeLa-Zellen

Nachdem nun ein Zellsystem etabliert war, mithilfe dessen durch Anisomycin eine verstärkte Phosphorylierung von MKK6 erreicht wurde, sollte untersucht werden, ob die Überexpression von $SOS1^{WT}$ bzw. $SOS1^{Mut}$ zu einer Aktivierung von MKK6 führt. Hierfür wurden HeLa-Zellen mit den beiden SOS1-Konstrukten transfiziert, mit Anisomycin gestresst und die Expression und der Phosphorylierungszustand von MKK6 mittels SDS-Page und Western-Blot analysiert. Bei etwas stärkerer Expression des $SOS1^{Mut}$ -Proteins und gleicher Proteingesamtmenge ließ sich in den $SOS1^{WT}$ -exprimierenden Zellen im Vergleich zu den $SOS1^{Mut}$ -exprimierenden eine Abschwächung des Phosphorylierungszustands von MKK6 vermuten (Abb. 25 A, Spalten 2 und 3). Allerdings ist im Lysat der $SOS1^{WT}$ -exprimierenden Zellen eine geringere Gesamtmenge an MKK6 vorhanden (Abb. 25 A, Spalte 3). Setzt man die Menge an phosphoryliertem MKK6 ins Verhältnis zur Gesamtmenge an MKK6, ergibt sich für alle drei Zellreihen kein Unterschied im Phosphorylierungszustand von MKK6 (Abb. 25 B).

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass nach Überexpression von $SOS1^{WT}$ und $SOS1^{Mut}$ in HeLa-Zellen keine Veränderung der Phosphorylierung von MKK6 nachgewiesen werden konnte.

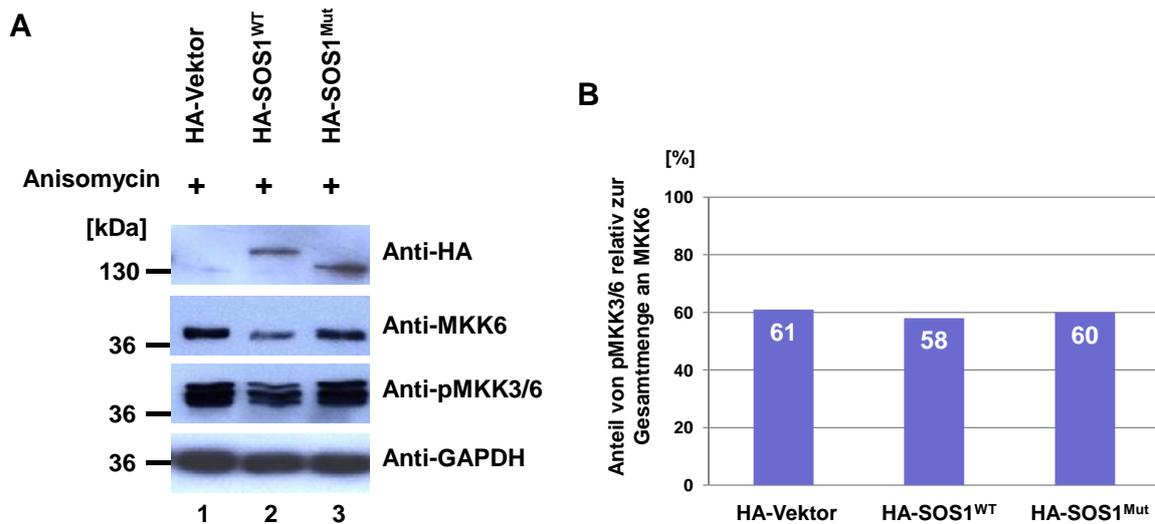


Abb. 25: Darstellung des Phosphorylierungszustandes von MKK6 in SOS1^{WT}- bzw. SOS1^{Mut}-exprimierenden HeLa-Zellen mittels Western-Blot-Analyse

(A) Die Zellen wurden mit den oberhalb des Blots angegebenen entsprechenden Konstrukten transfiziert. Nach Zelllyse, SDS-Page und Western-Blot erfolgte die Detektion von MKK6 mit Anti-MKK6-Antikörper sowie die der phosphorylierten Form mit Anti-pMKK3/6-Antikörper. Als Kontrolle wurden HeLa-Zellen mit dem Leervektor pMT2-SM-HA-DEST transfiziert (Spalte 1). Die Expression von SOS1^{WT} und SOS1^{Mut} wurde mit Anti-HA-Antikörper, die Gesamtproteinmenge mit Anti-GAPDH-Antikörper kontrolliert. Links ist eine molekulare Gewichtsangabe des jeweils mitaufgetragenen Proteinstandards angegeben. (B) In diesem Diagramm ist nach densitometrischer Messung der Western-Blot-Signale der prozentuale Anteil von phosphoryliertem MKK3/6 bezogen auf die Gesamtmenge an MKK3/6 in den unterschiedlichen Zelllysaten dargestellt.

3.4 Analyse der Phosphorylierung von ERK1/2

Durch die Überexpression von SOS1^{WT} bzw. SOS1^{Mut} konnte keine Veränderung im Aktivitätszustand von MKK6 nachgewiesen werden. Daher sollte die Funktionalität der exprimierten SOS1-Proteine (SOS1^{WT} und SOS1^{Mut}) überprüft werden. Es ist bekannt, dass SOS1 eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von RAS und somit auch für den Signalfluss von RAS zu ERK1/2 spielt (Chardin et al. 1993, Corbalan-Garcia et al. 1998). Außerdem konnten Jang und Kollegen (2007) in Fibroblasten von Patienten mit der heterozygoten SOS1-Mutation c.3248dupC (p.R1084Kfs*23) eine erhöhte Aktivität der Kinasen ERK1/2 nachweisen (Jang et al. 2007). Auf Grund dessen sollte der Phosphorylierungszustand von ERK1/2 in SOS1^{WT}- bzw. SOS1^{Mut}-exprimierenden HeLa-Zellen untersucht werden.

Die Expression und der Phosphorylierungszustand von ERK1/2 waren in allen untersuchten Zelllysaten gleich (Abb. 26, Spalten 1-3). Weder die Überexpression von SOS1^{WT} noch von SOS1^{Mut} führte zu einer verstärkten Phosphorylierung von ERK1/2. Die Resultate von Jang und Kollegen (2007) konnten somit in dem verwendeten Zellsystem nicht bestätigt werden.

Die Phosphorylierung von ERK1/2 wurde auch in den Anisomycin ausgesetzten HeLa-Zellen überprüft. Im Vergleich zu den in Normalmedium kultivierten Zellen konnte hierbei eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 festgestellt werden (Abb. 26, Spalten 4-6). Diese Steigerung scheint jedoch unabhängig von der Überexpression der SOS1-Proteine zu sein, da sie auch in den mit dem Leervektor transfizierten Zellen auftrat (Abb. 26, Spalte 4). Auch in diesem Experiment konnte keine Veränderung der ERK1/2-Phosphorylierung in den $SOS1^{WT}$ - und $SOS1^{Mut}$ -exprimierenden Zellen festgestellt werden (Abb. 26, Spalten 5+6).

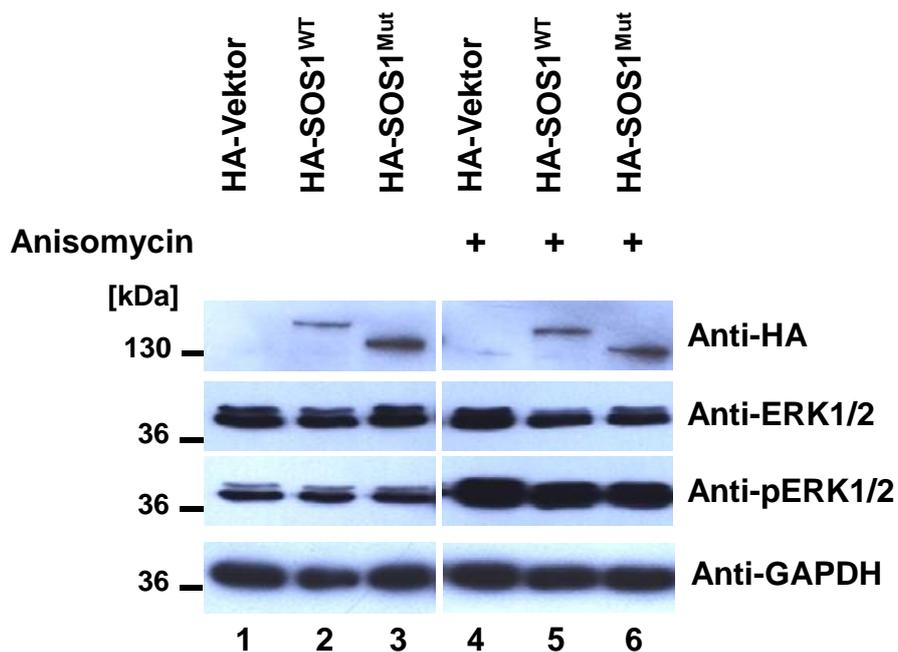


Abb. 26: Darstellung des Phosphorylierungszustandes von ERK1/2 in mit SOS1-Konstrukten transfizierten HeLa-Zellen mittels Western-Blot-Analyse

Die Transfektion der Zellen erfolgte mit den jeweils über den Blots angegebenen Konstrukten. Nach Zelllyse, SDS-Page und Western-Blot erfolgte die Detektion von ERK1/2 mit Anti-ERK1/2-Antikörpern sowie der phosphorylierten Form mit Anti-pERK1/2-Antikörpern. Als Kontrolle wurde der Leervektor pMT2-SM-HA-DEST verwendet (Spalten 1+4). Die Expression von $SOS1^{WT}$ und $SOS1^{Mut}$ wurde mit Anti-HA-Antikörper, die Gesamtproteinmenge mit Anti-GAPDH-Antikörper kontrolliert. Links findet sich jeweils eine molare Masse des mitaufgetragenen Proteinstandards.

V. Diskussion

1 Keine pathogene Mutation in den Kandidatengenen *GNAI2* und *ERBB4* bei Patienten mit Noonan-, CFC- oder Costello-Syndrom

Durch die Mutationsanalyse der Exons 5, 6 und 7 des *GNAI2*-Gens bei 219 mutationsnegativen Patienten mit dem klinischen Bild aus dem Kreis der NCFC-Syndrome konnte nur eine heterozygot vorliegende intronische Sequenzvariante (c.877+29A>G) festgestellt werden. Diese lag bei 21 Patienten vor und ist bereits als SNP verzeichnet (*rs9830408*), weshalb sie als nicht pathogen eingestuft werden kann. Die Mutationsanalyse des zweiten Kandidatengens *ERBB4* beschränkte sich auf die Exons 8, 12, 14, 15, 21 und 28 und wurde bei 19 Patienten durchgeführt. Hier fand sich eine heterozygote intronische Sequenzvariante (c.2613+79dupA) bei 12 Patienten. Diese ist noch nicht in den Datenbanken (NCBI, ENSEMBLE) verzeichnet. Da die in silico-Vorhersage mit diversen Computerprogrammen (s. IV.1.4) keinen Hinweis auf eine pathogene Relevanz ergab, ist davon auszugehen, dass es sich hierbei um einen Polymorphismus handelt.

In beiden analysierten Genen konnte im Rahmen dieser Arbeit somit keine krankheitsursächliche Mutation für Erkrankungen des NCFC-Spektrums identifiziert werden. In letzter Zeit wurden zwei neue Krankheitsgene für das Noonan-Syndrom beschrieben, in denen nur sehr selten (<1%) pathogene Mutationen bei betroffenen Patienten gefunden werden: *NRAS* (Cirstea et al. 2010) und *CBL* (Martinelli et al. 2010, Niemeyer et al. 2010, Pérez et al. 2010). Es wäre möglich, dass krankheitsverursachende Mutationen in *GNAI2* oder *ERBB4* auch nur in einzelnen Patientenfällen auftreten und deshalb die Analyse in einem größeren Patientenkollektiv durchgeführt werden müsste, um pathogene Mutationen in diesen Genen identifizieren zu können.

Ein weiterer Grund könnte die Beschränkung der Mutationsanalyse auf ausgewählte Exons sein. Es kann nicht ausgeschlossen werden, dass in der nicht untersuchten Kodierregion von *GNAI2* und *ERBB4* im analysierten Patientenkollektiv pathogene Mutationen vorliegen. Da aufgrund der bisherigen identifizierten Mutationen eher Missense-Mutationen erwartet wurden, wurden in dieser Arbeit keine Promotoren, 5'- bzw. 3'-untranslatierte Bereiche (UTRs) oder intronische Regionen auf mögliche Mutationen hin untersucht. Pathogene Sequenzvarianten können sich auch in diesen Bereichen befinden.

Eine weitere mögliche Fehlerquelle liegt in den technischen Problemen der PCR-basierten Sequenzanalyse. Es kann zu einer selektiven Amplifikation eines Allels

kommen, wenn in einer Primerbindesequenz ein SNP bzw. Deletions-Insertions-Polymorphismus (DIP) oder eine pathogene Mutation lokalisiert ist. Dies könnte die Hybridisierung des Primers an dieses Allel abschwächen oder verhindern, so dass dieses geringer bzw. überhaupt nicht amplifiziert wird. Dieser so genannte *allelic drop out* (Heinrich et al. 2004, Laios und Glynou 2008) kann nur für PCR-Produkte, die in der Sequenzanalyse eine Heterozygotie aufwiesen, ausgeschlossen werden. Außerdem wurde von einigen DNA-Proben eine *whole genome amplification* (WGA) (s. III.2.1.11) durchgeführt, da nur noch eine sehr geringe Menge an genomischer DNA vorlag. Untersuchungen ergaben, dass die so generierte DNA eine nahezu gleichwertige Qualität zum Ausgangsmaterial aufweist und ein durch WGA bedingter *allelic drop out* somit als unwahrscheinlich postuliert wird, aber natürlich nicht ganz auszuschließen ist (Holbrook et al. 2005).

Zudem muss man neben einer Punktmutation als Krankheitsursache auch die Möglichkeit einer eventuell vorliegenden Deletion oder Duplikation in Betracht ziehen. Umfasst diese nur wenige Basenpaare, würde sie mittels der PCR-basierten DNA-Sequenzanalyse aufgedeckt werden. Zur Detektion größerer Deletionen bzw. Duplikationen müssten jedoch andere Verfahren, wie z. B. die zytogenetische Analyse, die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH), MLPA- (*multiplex ligation-dependent probe amplification*) oder Array-CGH-Analysen eingesetzt werden.

Neben diesen technischen Fehlerquellen besteht auch die Möglichkeit, dass inhaltliche Schlüsse falsch gezogen oder interpretiert wurden. So beschränkte sich die Mutationsanalyse der beiden Gene beispielsweise hauptsächlich auf Bereiche, in denen onkogene Mutationen beschrieben wurden. Möglicherweise führen diese Mutationen aber, wenn sie nicht mehr somatisch, sondern als Keimbahn-Mutation auftreten, zu einer so schweren Beeinträchtigung in der Entwicklung des Menschen, dass sie nicht mit dem Leben vereinbar wären. Außerdem sind Erkrankungen aus dem NCFC-Spektrum mit Mutationen assoziiert, die zu einer erhöhten Aktivität im RAS-MAPK-Signalweg und meistens auch im AKT-Signalweg führen (Tidyman und Rauen 2009, Zenker 2011, Tartaglia et al. 2011). Sowohl für die *Gnai2*-Mutation des *knock-in*-Mausmodells (p.G184S) als auch für die in Melanomen beschriebenen Mutationen in *ERBB4* konnte zwar eine vermehrte Aktivität im AKT-Signalweg, jedoch nicht im RAS-MAPK-Signalweg nachgewiesen werden (Huang et al. 2006, Prickett et al. 2009). Vielleicht liegt darin die Ursache, dass in den analysierten Exons der Gene *GNAI2* und *ERBB4* im Rahmen dieser Arbeit keine pathogene Mutation gefunden wurde. Dies könnte bedeuten, dass eine alleinige Aktivitätssteigerung im AKT-Signalweg nicht ausreicht, um das klinische Bild der NCFC-Syndrome hervorzurufen.

2 Sechs Patienten mit Noonan-Syndrom und der pathogenen c.4A>G (p.S2G)-Mutation in *SHOC2*

Die bekannte c.4A>G (p.S2G)-Mutation im *SHOC2*-Gen konnte bei sechs der insgesamt 186 analysierten Patienten nachgewiesen werden. Diese mutationspositiven Patienten weisen einen recht homogenen klinischen Phänotyp auf. Von fünf der sechs Patienten lagen klinische Daten vor. Alle fünf weisen für das Noonan-Syndrom typische kraniofaziale Auffälligkeiten auf. Dabei handelt es sich im Einzelnen um eine relative Makrozephalie, einen Hypertelorismus, eine Ptosis, tief ansetzende und nach hinten rotierte Ohren sowie ein breite und flache Nasenwurzel. Weitere klinische Merkmale, die in das Bild des Noonan-Syndroms passen, sind Kleinwuchs (n=4), postnatale Gedeihstörung (n=3), motorische Entwicklungsverzögerung (n=5), Intelligenzminderung (n=5) und angeborene Herzfehler (n=5). Bei drei Patienten wurde eine Pulmonalklappenstenose, bei zwei ein atrialer Septumsdefekt und bei einer Patientin eine HCM und eine Mitralklappeninsuffizienz diagnostiziert. Neben dem bei drei mutationspositiven Patienten vorhandenen hyperkeratotischen Hautbild fällt als Gemeinsamkeit das blonde, spärliche, langsam wachsende und leicht ausreißbare Kopfhaar auf. Dies entspricht dem klinischen Erscheinungsbild des sogenannten *loose anagen hair* (LAH) (Tosti und Piraccini 2002). Im Trichogramm von Patienten mit LAH findet sich ein zu hoher Anteil von Haaren in der anagenen Phase des Haarwachstums. Außerdem zeigen sich histologisch bei diesen Haaren das Fehlen von Haarschäften und verformte Haarwurzeln (Cantatore-Francis und Orlow 2009, Tosti und Piraccini 2002). Zusammengefasst entspricht das phänotypische Erscheinungsbild der Patienten dem des bereits beschriebenen *Noonan-like syndrome with loose anagen hair* (MIM 607721, Mazzanti et al. 2003). Somit kann der Befund, dass die c.4A>G (p.S2G)-Mutation ursächlich für das *Noonan-like syndrome with loose anagen hair* ist (Cordeddu et al. 2009), weiter gestützt werden, da auch die im Rahmen dieser Arbeit als mutationspositiv identifizierte Patienten den entsprechenden klinischen Phänotyp aufweisen.

Die Frage ist nun, welche Auswirkung die c.4A>G (p.S2G)-Mutation auf die Funktionsweise des SHOC2-Proteins hat. *SHOC2* kodiert für ein *leucin-rich-repeat* (LRR)-Protein, das aus insgesamt 18 LRR-Domänen besteht, die sowohl NH₂-terminal als auch COOH-terminal von einer Nicht-LRR-Domäne flankiert werden (Sieburth et al. 1998). Es ist als Gerüstprotein essenziell für die Interaktion und Signalweitergabe zwischen aktivem RAS und RAF1 und nimmt auf diese Weise Einfluss auf den Signalfuss im RAS-MAPK-Signalweg (Sieburth et al. 1998, Rodriguez-Viciano et al. 2006b, Matsunaga-Udagawa et al. 2010). Der genaue Mechanismus hierfür ist noch nicht bekannt. Galperin und Mitarbeiter (2012) beobachteten unter EGF-Stimulation

eine Verlagerung von SHOC2^{WT} vom Zytoplasma in perinukleär lokalisierte Vesikel, bei denen es sich um späte Endosomen handelt. Dieser Vorgang scheint von aktiviertem RAS und Clathrin abhängig zu sein (Galperin et al. 2012). Im Gegensatz dazu stellten Cordeddu und Kollegen (2009) unter EGF-Stimulation eine Translokation von SHOC2^{WT} vom Zytoplasma an Plasmamembranen und in den Zellkern fest. Aus diesen widersprüchlichen Beobachtungen lässt sich zumindestens herauslesen, dass zur Signaltransduktion eine Lokalisationsveränderung von SHOC2^{WT} nötig ist. SHOC2^{WT} interagiert sowohl mit RAS als auch mit der Proteinphosphatase 1 (PP1c), wodurch es die Signalweiterleitung von RAS zu RAF1 beeinflusst (Li et al. 2000, Rodriguez-Viciano et al. 2006b). Zum einen scheint SHOC2^{WT} aktivierte RAS-Proteine vor der Inaktivierung durch GAPs zu schützen und so eine Signalweitergabe an RAF1 zu ermöglichen (Matsunaga-Udagawa et al. 2010). Für diese Interaktion mit RAS sind sowohl der NH₂- als auch der COOH-Terminus von SHOC2^{WT} wichtig (Sieburth et al. 1998). Zum anderen spielt die Interaktion zwischen SHOC2^{WT} und PP1c eine wichtige Rolle bei der RAS-abhängigen Aktivierung von RAF1 (Rodriguez-Viciano et al. 2006b). PP1c dephosphoryliert RAF1 an der Serin-Seitenkette an Position 259, wobei es sich um einen wichtigen Schritt im Aktivierungsvorgang von RAF1 handelt (Morrison und Cutler 1997, Dhillon et al. 2007). Dieser Vorgang scheint auch bei mehreren RAF1-Mutationen, die mit dem NS assoziiert sind, zu einem dauerhaft aktiven Zustand von RAF1 zu führen und somit eine entscheidende Rolle in der Pathogenese zu spielen (Kobayashi et al. 2010).

Der durch die oben beschriebene Mutation verursachte Aminosäureaustausch von Serin zu Glycin an Position 2 des Proteins (SHOC2^{S2G}) führt zu einer veränderten kotranslationalen Modifizierung. Die N-Myristoyltransferase (NMT) erkennt SHOC2^{S2G} nun als Substrat und transferiert einen Myristinsäurerest an den NH₂-Terminus des Proteins (Cordeddu et al. 2009). Über diesen Fettsäurerest kommt es zu einer Verankerung des veränderten SHOC2-Proteins in der Zellmembran, wodurch es vermehrt dort lokalisiert ist. Dort ist ebenfalls die höchste RAS-Aktivität innerhalb der Zelle zu verzeichnen (Mochizuki et al. 2001). Unter der Annahme einer so erleichterten Interaktion von aktiviertem RAS und SHOC2^{S2G} postulierten Cordeddu und Mitarbeiter (2009) für die c.4A>G (p.S2G)-Mutation einen *gain-of-function* Effekt. Sie konnten nach Überexpression von SHOC2^{S2G} in Neuro2A-Zellen eine verstärkte EGF-abhängige ERK-Aktivität nachweisen (Cordeddu et al. 2009). Diese Ergebnisse konnten von Galperin und Mitarbeitern (2012) nicht bestätigt werden. Sie stellten bei ihren Experimenten in COS-1-Zellen eher eine abgeschwächte Aktivierung von ERK und somit einen Funktionsverlust von SHOC2^{S2G} im Vergleich zum Wildtyp-Protein fest (Galperin et al. 2012). Der Einfluss von SHOC2 auf den Signalfuss im RAS-MAPK-

Signalweg scheint sehr komplex zu sein, wodurch es bisher noch nicht gelungen ist, eine eindeutige Erklärung für den Pathomechanismus der c.4A>G (p.S2G)-Mutation zu finden. Um weitere Erkenntnisse darüber zu erlangen, untersuchten Ferrero und Mitarbeiter (2012) das mRNA-Expressionsprofil in peripheren Blutzellen von Patienten mit der c.4>G (p.S2G)-Mutation in *SHOC2* (Ferrero et al. 2012). Hierbei zeigten sich deutliche Veränderungen im Vergleich zu gesunden Probanden. Besonders erwähnenswert ist die vermehrte Expression der Transkriptionsfaktoren CREB1 (*cAMP response element-binding protein 1*) und SP1 (*specific protein 1*). Sollte dies auch zu einer verstärkten Aktivität dieser Transkriptionsfaktoren führen, könnte bezüglich CREB1 ein Zusammenhang mit den bei RASopathien oft auftretenden kognitiven Defiziten bestehen, da in Hippocampus-Zellen eines *knock-out*-Mausmodells für Neuro-fibromatose Typ 1 eine erhöhte Aktivität von CREB1 nachgewiesen wurde (Guilding et al. 2007, Ferrero et al. 2012). Eine erhöhte Aktivität des SP1-Transkriptionsfaktors scheint interessanterweise mit dem Auftreten einer kardialen Hypertrophie assoziiert zu sein, wobei es sich ebenfalls um ein häufiges klinisches Merkmal des NS handelt (Hu et al. 2011, Ferrero et al. 2012). Hieraus ergeben sich weitere Ansatzpunkte für die Erforschung des Pathomechanismus der c.4A>G (p.S2G)-Mutation in *SHOC2*, die in der Zukunft weiter verfolgt werden sollten.

Diese Arbeit beschränkte sich bei der Mutationsanalyse von *SHOC2* auf die bereits beschriebene c.4A>G (p.S2G)-Mutation, da Cordeddu und Kollegen (2009) bei insgesamt 506 Patienten alle kodierenden Exons sequenziert hatten und keine andere krankheitsverursachende Mutation identifizieren konnten (Cordeddu et al. 2009). Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass auch andere Mutationen im *SHOC2*-Gen einen klinischen Phänotyp hervorrufen, der in das Spektrum der NCFC-Erkrankungen passt. Bei der Identifizierung von *shoc2* in *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) konnten vier Missense-Mutationen (p.D148N, p.C233Y, p.E430K, p.P483L) nachgewiesen werden (Selfors et al. 1998, Sieburth et al. 1998). Für die p.C233Y-Mutation wurde eine abgeschwächte Bindung von aktivem ras an *shoc2* und damit ein Funktionsverlust von *shoc2* festgestellt (Sieburth et al. 1998). Beim Menschen würden diese Mutationen den Folgenden entsprechen: p.D175N, p.C260Y, p.E457K, p.P510L (Rodriguez-Viciano et al. 2006b). In proteinbiochemischen Experimenten wurde bei ektopischer Expression von SHOC2^{C260Y} und SHOC2^{E457K} in humanen 293-Zellen eine abgeschwächte RAS-vermittelte Aktivierung von ERK1/2 beobachtet (Li et al. 2000). Außerdem konnte für SHOC2^{D175N} und SHOC2^{E457K} eine abgeschwächte Interaktion zwischen SHOC2 und PP1c und eine damit verbundene verminderte RAF1-Aktivierung nachgewiesen werden (Rodriguez-Viciano et al. 2006b). Es lässt sich festhalten, dass die oben beschriebenen Mutationen in *SHOC2* zu einem Funktionsverlust führen, indem sie die

Bindung von SHOC2 an RAS und PP1c abschwächen. Es ist nun durchaus denkbar, dass es im Bereich dieser Bindestellen durch Mutationen sowohl zur Verschlechterung als auch zur Verbesserung der Bindungseigenschaften kommen könnte. Somit könnte neben der durch die c.4A>G (p.S2G)-Mutation verursachten subzellulären Lokalisationsänderung von SHOC2 auch eine modifizierte Struktur des Proteins zu einer veränderten Aktivität im RAS-MAPK-Signalweg und einer damit verbundenen Ausprägung des klinischen Bildes einer Erkrankung aus dem NCFC-Spektrum führen.

3 Gesteigerte HRAS-Aktivität und ERK1/2-Phosphorylierung bei unveränderter AKT-Phosphorylierung durch die p.E63_D69dup-Mutation in HRAS

Um nicht nur theoretisch mögliche Auswirkungen von bekannten pathogenen Mutationen zu diskutieren, wurden im Rahmen dieser Arbeit funktionelle Veränderungen aufgrund der p.E63_D69dup-Mutation in *HRAS* untersucht, die bei einer Patientin mit Costello-Syndrom identifiziert worden war. Die hierbei erhaltenen Daten lassen vermuten, dass die p.E63_D69dup-Mutation zu einer verstärkten HRAS-Aktivität führt, die sich in einer vermehrten Bindung an RAF1, PLC und RALGDS äußert, während die Interaktion mit PIK3CA negativ beeinflusst wird. Des Weiteren konnte in HRAS^{E63_D69dup}-exprimierenden Zellen eine verstärkte Phosphorylierung von *downstream* gelegenen Signalproteinen nachgewiesen werden. Diese war vor allem für MEK1/2 und ERK1/2 nachweisbar, während sie für AKT nur sehr schwach ausgeprägt war. Da Experimente unter gleichbleibenden Zellkulturbedingungen allerdings keine Aussage zur Signalweitergabe nach extrazellulärer Stimulation erlauben, wurden in der AG von Herrn Dr. Rosenberger am Institut für Humangenetik noch weitere Versuche unter EGF-Stimulation durchgeführt. Es wurde die Veränderung des Phosphorylierungszustandes von ERK1/2, MEK1/2 und AKT nach Stimulation mit EGF untersucht. Es zeigte sich bei den HRAS^{WT}-exprimierenden Zellen vor der Stimulation eine niedrige Menge an phosphorylierten Kinasen, welche unter EGF deutlich anstieg. In den HRAS^{G12V}-exprimierenden Zellen konnte kein Unterschied in den Phosphorylierungszuständen vor und nach der EGF-Stimulation festgestellt werden, was sich durch die konstitutionelle Aktivität von HRAS^{G12V} erklären lässt. In HRAS^{E63_D69dup}-exprimierenden Zellen lag der Anteil phosphorylierter Kinasen in Ruhe zwischen jenem in HRAS^{WT}- und HRAS^{G12V}-exprimierenden Zellen. Der Stimulus wurde an MEK1/2 und ERK1/2 weitergegeben, während der Phosphorylierungszustand von AKT unverändert blieb. Diese verminderte AKT-Aktivierung lässt sich durch die abgeschwächte Interaktion von HRAS^{E63_D69dup} mit PIK3CA erklären.

Zunächst stellt sich die Frage, wie es zu einer verstärkten Aktivität von HRAS^{E63_D69dup} kommen kann. Wie bereits erwähnt, wechselt das HRAS-Protein ständig zwischen einem aktiven, GTP-gebundenen und einem inaktiven, GDP-gebundenen Zustand. Der strukturelle Unterschied dieser beiden Aktivitätszustände macht sich hauptsächlich in zwei stark veränderbaren Regionen bemerkbar, die als *Switch I* (AS 30-40)- und *Switch II* (AS 60-67)-Regionen bezeichnet werden (Karnoub und Weinberg 2008). Die Aminosäuren 63-69 sind somit Teil der *Switch II*-Region, die eine wichtige Rolle bei der Bindung verschiedener Regulatoren (GAPs, GEF), Nukleotiden (GDP, GTP) sowie Effektoren (PI3K, PLC) spielt (Scheffzek et al. 1997, Boriack-Sjodin et al. 1998, Vetter und Wittinghofer 2001, Ahmadian et al. 2003, Stieglitz et al. 2008). Als Ursache der festgestellten erhöhten Aktivität von HRAS^{E63_D69dup} kommen mehrere Möglichkeiten in Betracht: eine veränderte Affinität zu GDP bzw. GTP, eine reduzierte GTPase-Aktivität (sowohl intrinsisch als auch GAP-vermittelt), ein veränderter GEF-induzierter Nukleotidaustausch oder eine gestörte Interaktion mit Effektoren bzw. weiteren Regulatoren [GDIs (*guanine nucleotide dissociation inhibitors*)]. Am wahrscheinlichsten liegt eine verminderte GAP-vermittelte GTPase-Aktivität vor, da nachgewiesen wurde, dass die katalytische Untereinheit des GAPs NF1 nicht mehr mit HRAS^{E63_D69dup} interagiert (Lorenz et al. 2013). Dies passt zu den bisherigen Erkenntnissen, nach denen Veränderungen der Aminosäuren im Bereich der *Switch II*-Region (Gln⁶¹, Glu⁶³, Tyr⁶⁴) zu einer abgeschwächten intrinsischen bzw. GAP-vermittelten GTPase-Aktivität führen (Nur-E-Kamal und Matura 1992, Moodie et al. 1995, Sot et al. 2010). Eine abgeschwächte Bindung von GAPs wurde auch schon für die CS-assoziierte p.E37dup-Mutation in HRAS beschrieben (Gremer et al. 2010).

Bemerkenswerterweise wurde in dieser Arbeit nur wenig HRAS^{E63_D69dup} mit der katalytischen Untereinheit von PI3K (PIK3CA) kopräzipitiert (Abb. 17). Es wurde bereits berichtet, dass PI3K mit der *Switch II*-Region interagiert und ein Aminosäureaustausch von Tyrosin nach Glycin an Position 64 in HRAS sowohl diese als auch die Interaktion mit NF1 verhindert (Moodie et al. 1995). Die Effektorproteine RAF1 und RALGDS binden dagegen über die *Switch I*-Region an HRAS (Vetter und Wittinghofer 2001). PLC wiederum bindet an beide *Switch*-Regionen (Bunney und Katan 2006). Unter der Annahme, dass HRAS^{E63_D69dup} eine strukturell stark veränderte *Switch II*-Region aufweist, scheint die Bindung von PLC an die *Switch I*-Region für eine effektive Bindung auszureichen. Zusammengefasst schwächt die p.E63_D69dup-Mutation die Interaktion mit PI3K ab, während sie für RAF1, RALGDS und PLC unverändert bleibt.

Alle bisher funktionell analysierten *HRAS*-Mutationen, die mit dem Costello-Syndrom assoziiert sind, führen zu einer verstärkten Signaltransduktion innerhalb der Kaskaden RAF1-MEK-ERK1/2 und PI3K-AKT (Denayer et al. 2008a, Rosenberger et al. 2009).

Auch HRAS^{E63_D69dup} induziert sowohl unter Normalbedingungen als auch unter Serumentzug eine verstärkte Phosphorylierung der *downstream* Effektoren von RAF1, nämlich MEK1/2 und ERK1/2. Jedoch konnte nur eine marginale Zunahme an phosphoryliertem AKT verzeichnet werden, was höchstwahrscheinlich an der gestörten Interaktion zwischen HRAS^{E63_D69dup} und PI3KCA liegt. Ähnlich dazu zeigt die CS-assoziierte HRAS^{E37dup}-Variante ebenfalls sowohl eine reduzierte Sensitivität gegenüber GAPs als auch eine verminderte Effektorbindung (Gremer et al. 2010). Zusammengefasst führt die E63_D69dup-Mutation demnach zu zwei molekularen Veränderungen: Zum einen kommt es durch eine beeinträchtigte GAP-Bindung zur Akkumulation von aktivem HRAS, was eine verstärkte Signalweitergabe im RAS-MAPK-Signalweg verursacht, zum anderen verhindert die abgeschwächte Interaktion von HRAS^{E63_D69dup} mit PI3K eine erhöhte Signalweitergabe innerhalb der PI3K-AKT-Kaskade. Dies ist überraschend, da man bisher davon ausging, dass CS-assoziierte HRAS-Mutationen eine erhöhte Aktivität sowohl im RAS-MAPK- als auch im PI3K-AKT-Signalweg zur Folge haben (Zampino et al. 2007, Rosenberger et al. 2009, Gremer et al. 2010, Niihori et al. 2011). Bei der Patientin mit der p.E63_D69dup-Mutation in HRAS scheint aber die erhöhte Signaltransduktion über RAF-MEK-ERK auszureichen, um einen CS-Phänotyp hervorzurufen. Als CS-typische Merkmale finden sich bei ihr kraniofaziale Auffälligkeiten, wie etwas grobe Gesichtszüge, Exophthalmus mit Ptosis und Hypertelorismus sowie tief sitzende Ohren, dünnes, spärliches Haar, weiche Handflächen und Fußsohlen mit tiefen Falten sowie Kleinwuchs. Weniger typisch für das CS weist sie eine insgesamt dunkel pigmentierte Haut, multiple Pigmentmale im Gesicht und hyperkeratotische Hautläsionen im Bereich der Fußknöchel auf. Es besteht eine leichte Intelligenzminderung. Die sonst oft bei Patienten mit CS beobachtete postnatale Gedeihstörung wurde nicht beschrieben, und bisher gibt es keine Anzeichen für eine maligne Erkrankung. In letzter Zeit gelang es, eine immer detailliertere Korrelation zwischen Genotyp und Phänotyp der verschiedenen CS-assoziierten HRAS-Mutationen herauszuarbeiten. So zeigen Patienten mit der am häufigsten vorkommenden p.G12S-Mutation einen relativ homogenen Phänotyp (Gripp und Lin 2012). Andere seltener Aminosäureaustausche an Position 12, wie z. B. p.G12C, p.G12D, p.G12E und p.G12V, führen bei den Betroffenen zu einem schwereren Krankheitsbild, bis hin zum frühen Versterben in der Neonatalperiode der Patienten (Lo et al. 2008, Burkitt-Wright et al. 2012, Lorenz et al. 2012). Als funktioneller Mechanismus liegt allen bekannten CS-assoziierten Mutationen an Position 12 und 13 eine Insensitivität gegenüber GAPs zugrunde. Die bekannten Mutationen an Position 13 (p.G13C, p.G13D) sind von der Schwere des Phänotyps mit der p.G12S-Mutation zu vergleichen. Entsprechende Patienten weisen aber teilweise Besonderheiten auf, wie z. B. lange Wimpern und *loose anagen hair* bei der p.G13C-

Mutation (Gripp et al. 2011). Für die p.K117R-Mutation ist bekannt, dass sie funktionell die GDP/GTP-Dissoziation des HRAS-Proteins erhöht, wodurch dieses vermehrt aktiv ist. Die phänotypische Ausprägung entspricht dem typischen Bild des CS. Ein deutlich milderer Phänotyp lässt sich bei Patienten mit der p.T58I-Mutation beobachten (Gripp et al. 2008, Gripp et al. 2012). Die funktionellen Auswirkungen dieser *HRAS*-Mutation wurden nicht analysiert. Im KRAS-Protein führt dieser AS-Austausch neben einer erhöhten GDP/GTP-Dissoziation auch zu einer Abschwächung der Bindung zwischen KRAS und RAF (Gremer et al. 2011). So kommt es trotz der vermehrten Aktivität des RAS-Proteins nur zu einer leichten Steigerung der Signaltransduktion im RAS-MAPK-Signalweg. Ähnliches findet sich auch für die p.E37dup-Mutation in *HRAS*. Auch hier wird die erhöhte HRAS-Aktivität durch verminderte Bindung an Effektoren abgeschwächt (Gremer et al. 2010). Obwohl der Pathomechanismus für p.T58I und p.E37dup ähnlich zu sein scheint, zeigen die beiden Patienten mit der p.E37dup-Mutation einen schwereren Phänotyp als die Patienten mit p.T58I. Wie bereits erwähnt, kommt es bei allen bisher bekannten CS-assoziierten Mutationen zu einem verstärkten Signalfluss sowohl in der RAF-MAPK- als auch der PI3K-AKT-Kaskade. Bei der hier beschriebenen p.E63_D69dup-Mutation ist jedoch nur der Signalfluss in der RAF-MAPK-Kaskade gesteigert, was für die Ausprägung CS-typischer Merkmale scheinbar ausgereicht hat. Insgesamt zeigt die Patientin mit der p.E63_D69dup-Mutation eher einen milderen Phänotyp, da typische Merkmale wie eine postpartale Gedeihstörung und eine Intelligenzminderung nicht bzw. in milder Ausprägung vorhanden sind. Dafür weist sie besondere Hautveränderungen (s. o.) auf. Eine Aussage darüber, inwiefern eine Korrelation zwischen bestimmten klinischen Merkmalen und einer erhöhten Aktivität in einem der beiden Signalwege (RAF-MAPK bzw. PI3K-AKT) besteht, ist anhand dieser Einzelbeschreibung allerdings nicht möglich.

4 Kein nachweisbarer Zusammenhang zwischen der c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation in *SOS1* und einer erhöhten Phosphorylierung von MKK6 bzw. ERK1/2

Aufgrund der Beobachtung, dass sowohl Patienten mit der p.R1084Kfs*23-Mutation in *SOS1* als auch Patienten mit CS-assoziierten Mutationen in *HRAS* und Patienten mit einer das *MAP2K6*-Gen umfassenden Duplikation klinisch eine Gingivahyperplasie aufweisen, entstand die Hypothese, dass möglicherweise ein Signalweg existiert, an welchem die drei kodierten Proteine *SOS1*, *HRAS* und *MKK6* beteiligt sind und der bei verstärkter Aktivität Gingivahyperplasie verursacht. Um dieser Annahme nachzugehen, wurden die Auswirkungen des durch die c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation veränderten *SOS1*-Proteins (*SOS1*^{Mut}) auf den Phosphorylierungszustand von *MKK6*

und ERK1/2 untersucht. Hierzu wurde zunächst ein Zellsystem (HeLa) etabliert, in welchem SOS1^{WT} und SOS1^{Mut} überexprimiert und daraufhin die Phosphorylierungszustände von MKK6 und ERK1/2 detektiert werden konnten. Im Rahmen dieser Arbeit konnte weder eine Beeinflussung des Phosphorylierungszustandes von MKK6 noch von ERK1/2 festgestellt werden. Somit konnten in Bezug auf den Aktivitätszustand von ERK1/2 die Ergebnisse von Jang und Kollegen (2007) nicht bestätigt werden, die zeigten, dass in Wildtyp-Gingiva-Fibroblasten die alleinige ektopische Expression von SOS1^{WT} ausreicht, um eine vermehrte Phosphorylierung von ERK1/2 hervorzurufen (Jang et al. 2007). Möglicherweise existieren in den Gingiva-Fibroblasten zusätzliche Faktoren, die eine Signalweitergabe von SOS1 zu ERK1/2 begünstigen. Dies könnte auch erklären, warum die Klinik der Patienten mit HGF und der c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation auf das Zahnfleisch beschränkt bleibt, während andere, bei Patienten mit NS beschriebene *gain-of-function* Mutationen im SOS1-Gen verschiedene andere klinische Auffälligkeiten bedingen (Roberts et al. 2007, Tartaglia et al. 2007).

Eine Ursache für diese voneinander abweichenden Ergebnisse könnte in der Verwendung unterschiedlicher Zelllinien liegen. In der vorliegenden Arbeit wurde das HeLa-Zellsystem verwendet. In vielen Zelllinien sind zusätzlich zur SOS1-Überexpression entweder eine extrazelluläre Stimulation mit EGF oder eine gleichzeitige Überexpression von ERK1/2 notwendig, um eine verstärkte Phosphorylierung von ERK1/2 zu beobachten (Corbalan-Garcia et al. 1998, Tartaglia et al. 2007, Roberts et al. 2007). In dieser Arbeit wurden bezüglich der Phosphorylierung von ERK1/2 nur Experimente unter gleichbleibenden Kulturbedingungen durchgeführt. Vielleicht hätte unter dem Einfluss extrazellulärer Wachstumsfaktoren (z. B. EGF) eine Veränderung in der Aktivierung von ERK1/2 festgestellt werden können. Die Phosphorylierung von MKK6 stieg in den verwendeten HeLa-Zellen zwar unter dem Stress-Stimulus Anisomycin an, war jedoch unabhängig von ektopisch exprimiertem SOS1. Ein neuer Versuchsansatz könnte darin bestehen, die Zellen mit dem Zytokin TGF β zu stimulieren. Da Gingiva-Fibroblasten von Patienten mit HGF empfindlicher auf TGF β reagieren als die von gesunden Probanden, scheint TGF β an der HGF-Entstehung beteiligt zu sein (Zhou et al. 2009). Möglicherweise zeigt sich verstärkte Phosphorylierung von MKK6 bei ektopischer Expression von SOS1^{Mut} nur unter dem Einfluss extrazellulärer Faktoren, wie TGF β . Es ist aber auch denkbar, dass das in dieser Arbeit verwendete Zellsystem nicht dazu geeignet ist, die Bedingungen in HGF-Fibroblasten nachzuempfinden. Daher sollte der Phosphorylierungszustand von MKK6 entweder direkt in HGF-Fibroblasten oder nach ektopischer Expression von SOS1^{WT} bzw. SOS1^{Mut} in Gingiva-Fibroblasten analysiert

werden, um herauszufinden, ob ein Zusammenhang zwischen der Expression von $SOS1^{Mut}$ und einer vermehrten Aktivierung von MKK6 besteht und diese ggf. eine Rolle beim Pathomechanismus der HGF spielt.

4.1 Sind andere Gene aus der Region 17q24.2-q24.3 mit der Entstehung einer Gingivahyperplasie in Verbindung zu bringen?

Die zu Beginn der Arbeit aufgestellte Hypothese, dass eine erhöhte Aktivität in einem bis dahin noch nicht beschriebenen Signalweg von SOS1 über HRAS und MKK6 zu p38 mit einer Gingivahyperplasie assoziiert ist, beruhte u. a. auf den von Sun und Kollegen (2009) beschriebenen Patienten mit CNVs in der Region 17q24.2-q24.3. Diese Annahme konnte noch dadurch untermauert werden, dass in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche ein Patient mit Hypertrichose und Gingivahyperplasie (im Folgenden als Patient 5 bezeichnet) und einer 1,62 Mb umfassenden Duplikation dieses Bereichs identifiziert worden war (Abb. 27). Die duplizierte Region entspricht nahezu derjenigen, die von Sun und Mitarbeitern (2009) bei Patient 4 beschrieben wurde (Abb. 27).

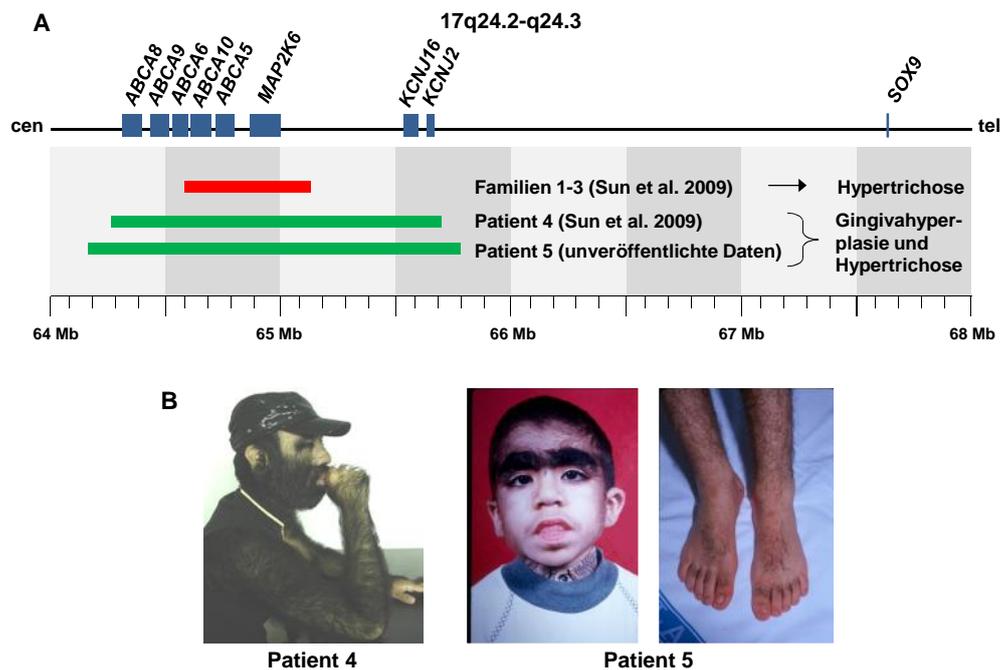


Abb. 27: Überblick über die in der Region 17q24.2-q24.3 liegenden Gene, die Lage der beschriebenen CNVs und den Phänotyp der Patienten mit einer Duplikation

(A) In der vergrößert dargestellten 17q24.2-q24.3 Region sind die dort lokalisierten Gene als blaue Kästchen dargestellt und bezeichnet. Darunter ist die bei den Familien 1-3 gemeinsame Deletion (roter Balken) und die jeweilige bei den Patienten 4 und 5 duplizierte Region (grüne Balken) mit ihrer entsprechenden Größe dargestellt. Die chromosomale Lokalisationsangabe in Megabasen (Mb) erfolgte nach NCBI 36/hg18. (B) Zum Vergleich der Phänotypen sind Fotos vom Patienten 4 (aus Sun et al. 2009) und vom Patienten 5 (bisher unveröffentlichte Daten, Dr. Lapunzina Badia, Institut für Humangentik, Universitätsklinik La Paz, Madrid) dargestellt. Es zeigt sich bei beiden eine ausgeprägte Hypertrichose sowie Gingivahyperplasie (hier nur bei Patient 5 sichtbar).

Da der Nachweis eines direkten Signalweges von SOS1 zu MKK6 bisher nicht gelungen ist, sollen im Folgenden die anderen in dieser Region liegenden Gene noch einmal näher betrachtet werden.

Die Gene *ABCA8*, *ABCA9*, *ABCA6*, *ABCA10* und *ABCA5* kodieren für *ATP-binding cassette* (ABC) Transporter der Subfamilie A, die aus insgesamt 12 verschiedenen Transportern besteht (Kaminski et al. 2006). Einige ABC-Transporter der Subfamilie A sind mit monogenen Erkrankungen assoziiert. Mutationen im *ABCA1*-Gen verursachen z. B. die Tangier Krankheit [familiäres *high-density* Lipoprotein (HDL)-Defizienz Syndrom, MIM 20540] (Rust et al. 1999, Brooks-Wilson et al. 1999, Bodzioch et al. 1999) oder Mutationen im *ABCA3*-Gen das Atemnotsyndrom bei Neugeborenen (Shulenin et al. 2004). Alle bisher beschriebenen Erkrankungen werden durch Funktionsverlust-Mutationen verursacht (Kaminski et al. 2006). Die Funktion der Transporter, die als Cluster in der Region 17q24.2-q.24.3 liegen, ist noch weitgehend unbekannt. Man weiß nur, dass die Expression der Gene *ABCA6*, *ABCA9* und *ABCA10* in Makrophagen durch Cholesterin reguliert wird (Kaminski et al. 2006, Piehler et al. 2012). In den in 17q24.2-q24.3 liegenden *ABCA*-Genen sind bisher noch keine pathogenen Mutationen bekannt. Patienten mit einer Deletion im Bereich der Gene *ABCA5*, *ABCA6* und *ABCA10* sind zudem phänotypisch unauffällig (Lin et al. 2008). Duplikationen, die nur dieses Cluster von *ABCA*-Genen betreffen, wurden bisher noch nicht beschrieben. Nach bisherigen Erkenntnissen gibt es keinen Anhaltspunkt dafür, dass Mutationen in diesen Genen mit Veränderungen am Zahnfleisch assoziiert sind.

Als nächstes sollen die Gene *KCNJ16* und *KCNJ2* näher betrachtet werden. Diese sind bei den beiden Patienten mit Gingivahyperplasie (Patienten 4 und 5) dupliziert, während sie bei den Patienten aus den Familien 1-3 außerhalb der Deletion liegen (Abb. 27). Beide Gene kodieren für Untereinheiten von einwärts gleichrichtenden Kalium (K⁺)-Kanälen (*KCNJ16* Kir5.1, *KCNJ2* Kir2.1). Kir5.1 wird hauptsächlich in Niere und Pankreas exprimiert (Liu et al. 2000). Es ist nicht bekannt, ob die durch *KCNJ16* und *KCNJ2* kodierten Untereinheiten der K⁺-Kanäle im Zahnfleisch exprimiert werden. Während für das *KCNJ16*-Gen bisher keine pathogene Mutationen beschrieben sind, führen *loss-of-function* Mutationen im *KCNJ2*-Gen zum Andersen-Syndrom (MIM 170390) (Abb. 28) (Plaster et al. 2001). Dieses ist durch die Trias aus periodischen Paralyse, ventrikulären Arrhythmien und bestimmten fazialen Dysmorphien gekennzeichnet (Tawil et al. 1994). Zusätzlich kann es zum verspäteten Durchbruch der bleibenden Zähne, einer Persistenz des Milchzahngabisses sowie zu einer Hypoplasie des Zahnschmelzes oder Oligodontie kommen (Tristani-Firouzi und Etheridge 2010). Veränderungen des Zahnfleisches wurden nicht beschrieben.

Allerdings konnte bei einer genomweiten Assoziationsstudie eine Assoziation einer *KCNJ2*-Sequenzvariante mit einem verzögerten Zahndurchbruch und einer verminderten Anzahl von Zähnen nach dem ersten Lebensjahr hergestellt werden (Pillas et al. 2010). Ein direkter Zusammenhang zwischen Veränderungen im *KCNJ2*-Gen und einer Gingivahyperplasie sind nicht bekannt.

Ein weiteres interessantes Gen liegt distal zu den beschriebenen CNVs: *SOX9* (Abb. 27). Sun und Kollegen (2009) postulierten, dass die CNVs im Bereich von regulatorischen Einheiten liegen, die Einfluss auf die Expression von *SOX9* haben. Somit könnte es durch die genetischen Imbalancen zu einer veränderten Expression des *SOX9*-Gens kommen, was wiederum zur Ausprägung einer Hypertrichose führen könnte (Sun et al. 2009). Vielleicht lässt sich auch das klinische Bild der Gingivahyperplasie über einen sogenannten Positionseffekt auf *SOX9* erklären. Die Regulierung des *SOX9*-Gens ist sehr komplex (Gordon et al. 2009). *SOX9* kodiert für einen Transkriptionsfaktor der SOX-Familie, der eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung verschiedener Organe, wie z. B. des zentralen Nervensystems (ZNS), der Hoden, des Knorpels, des Pankreas, des Verdauungstrakts und des Innenohrs, spielt (Kiefer 2007, Gordon et al. 2009). Außerdem ist die Expression von *SOX9* elementar für die Ausbildung und Wanderung von Neuralleisten-Zellen, die u. a. für die Entwicklung des Gesichtsschädels und die Bildung von Neuronen im peripheren Nervensystem (PNS) nötig sind (Cheung et al. 2005, Kiefer 2007). Genetische Veränderungen im Bereich der Kodierregion von *SOX9* oder auch in *upstream* gelegenen regulatorischen Elementen, die einen Funktionsverlust des Transkriptionsfaktors verursachen, führen zum klinischen Bild der Campomelischen Dysplasie (CD) (Wagner et al. 1994, MIM 114290) (Abb. 28). Diese ist klinisch u. a. durch eine Verkrümmung der langen Röhrenknochen und faziale Dysmorphien gekennzeichnet und tritt oft in Verbindung mit Störungen der Geschlechtsentwicklung bei männlichen Betroffenen auf (Wagner et al. 1994, Gordon et al. 2009). Liegt ein Translokationsbruchpunkt oder eine andere genetische Veränderung in einem Bereich, der mehr als 1 Mb *upstream* des *SOX9*-Gens gelegen ist (Abb. 28), kommt es zur Ausprägung einer Pierre-Robin-Sequenz (PRS, MIM 261800), die durch eine Mikrognathie, eine Glossoptosis und eine Gaumenspalte charakterisiert ist (Jakobsen et al. 2007, Benko et al. 2009). Des Weiteren wurden vier Familien mit je einer 1,2-1,9 Mb großen Duplikation im *upstream* zum *SOX9*-Gen gelegenen regulatorischen Bereich beschrieben (Kurth et al. 2009) (Abb. 28). Diese Patienten fallen durch eine symmetrische Kurzfingerigkeit der Hände und Füße (Brachydaktylie) sowie das Fehlen von Nägeln (Anonychie) auf, was dem Phänotyp des Cooks-Syndroms (MIM 106995) entspricht. Diese phänotypische Ausprägung fehlt bei den oben beschriebenen

Patienten 4 und 5 mit einer Duplikation in einem teilweise überlappenden Bereich. Veränderungen in der Expression von *SOX9* führen also, wie man sieht, zu zahlreichen Entwicklungsstörungen. Das Auftreten einer Gingivahyperplasie wurde in diesem Zusammenhang allerdings noch nicht beschrieben.

Die nachfolgende Abbildung fasst alle erwähnten genetischen Imbalancen in der Region 17q24.2-q24.3 zusammen.

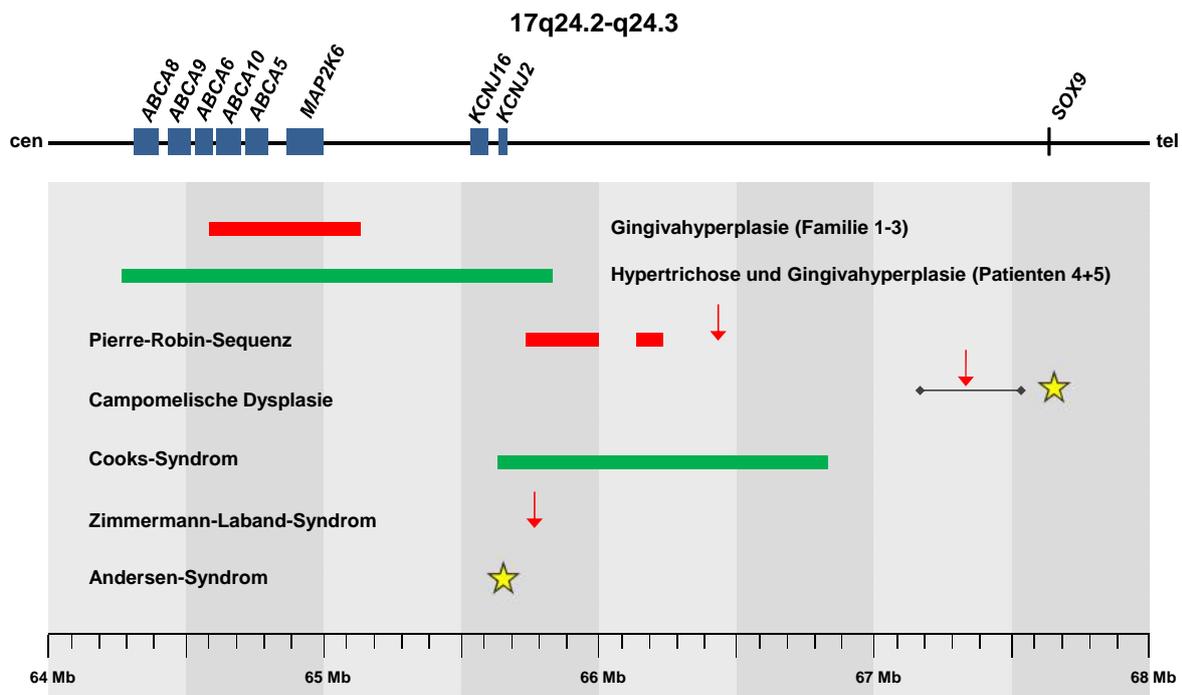


Abb. 28: Schematische Darstellung von Imbalancen in der Region 17q24.2-q24.3 und damit assoziierten Krankheitsbildern

Gene sind als blauen Kästchen dargestellt und bezeichnet. Darunter folgen die beschriebenen genetischen Veränderungen mit dem entsprechenden Phänotyp. Deletionen sind mit einem roten, Duplikationen mit einem grünen Balken dargestellt. Die Pfeile geben den jeweiligen Translokationspunkt bzw. bei der Campomelischen Dysplasie den Bereich der Translokationsbruchpunkte an. Die gelben Sterne kennzeichnen in der Kodierregion der Gene *KCNJ2* (für das Andersen-Syndrom) und *SOX9* (für die Campomelische Dysplasie) gelegene Mutationen. Chromosomale Lokalisationsangabe in Megabasen (Mb) nach NCBI 36/hg18.

Einen Hinweis darauf, dass zumindest das gemeinsame Auftreten von Gingivahyperplasie und Hypertrichose im Zusammenhang mit genetischen Veränderungen im Bereich der regulatorischen Elemente von *SOX9* steht, gibt ein von Kim und Mitarbeitern (2007) beschriebener Patient mit Gingivahyperplasie, Hypertrichose, großen Ohren, hypertropher Nase, großen Kiefer- und Gesichtsknochen, langen Fingern und Zehen, Strabismus und einem großen Penis (Kim et al. 2007). Dieser Phänotyp wurde dem Zimmermann-Laband-Syndrom zugeordnet. Ursächlich scheint bei diesem Patienten eine 3;17-Translokation [t(3;17)(p14.3;q24.3)] zu sein. Der Translokationsbruchpunkt auf Chromosom 17 liegt

im regulatorischen Bereich des *SOX9*-Gens (Kim et al. 2007) und entspricht etwa dem distalen Ende der bei den oben erwähnten Patienten 4 und 5 duplizierten Region. Man müsste dann davon ausgehen, dass in Haarfollikel-Zellen und Zahnfleisch-Fibroblasten unterschiedliche regulatorische Einflüsse auf das *SOX9*-Gen von Bedeutung sind, da eine Hypertrichose bei allen beschriebenen Patienten mit einer Imbalance in der Region 17q24.2-q24.3 auftritt, während die Gingivahyperplasie nur bei den beiden Patienten mit einer Duplikation (Patienten 4 und 5) und dem Patienten mit der 3;17-Translokation vorkommt. Es ist allerdings eine umfassendere Analyse der komplexen Regulationsmechanismen des *SOX9*-Gens notwendig, um in der Zukunft präzisere Aussagen zu möglichen Pathomechanismen von genetischen Veränderungen in dieser Region treffen zu können.

4.2 Die dreifache Kopie des *MAP2K6*-Gens - doch Ursache der Gingivahyperplasie?

Zuletzt bleibt die Möglichkeit, dass doch das Vorhandensein einer zusätzlichen Kopie des *MAP2K6*-Gens die Ursache für das Auftreten der Gingivahyperplasie ist. Wie bereits erwähnt, könnte eine erhöhte Expression des Zytokins TGF β hierbei eine entscheidende Rolle spielen (Häkkinen und Csiszar 2007). TGF β steigert u. a. die Synthese von Kollagen I und weiteren Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), wodurch das vermehrte Vorkommen dieser im betroffenen Zahnfleisch-Gewebe erklärt werden könnte (Coletta et al. 1999, Blobe et al. 2000, Martelli-Junior et al. 2003). Bei einer über längere Zeit bestehenden erhöhten Produktion von TGF β kann es zur Fibrose des betroffenen Gewebes kommen (Border und Noble 1994). Fibroblasten von Patienten mit HGF zeigen im Vergleich zu Kontroll-Fibroblasten eine verstärkte Reaktion auf TGF β -Stimulation (Zhou et al. 2009). Des Weiteren konnte eine erhöhte Expression des Integrins α 2 in diesen Zellen festgestellt werden (Zhou et al. 2009). Bei Integrinen handelt es sich um aus zwei Untereinheiten bestehende Rezeptoren an der Zelloberfläche, welche die Zelladhäsion vermitteln und die Zellproliferation kontrollieren (Hynes 1992). Fibroblasten interagieren mit dem Kollagen der ECM über α 1 β 1- und α 2 β 1-Integrine. Vermutlich kommt es durch die erhöhte Empfindlichkeit der HGF-Fibroblasten gegenüber dem Zytokin TGF β zu einer verstärkten Expression des α 2-Integrins, wodurch es zu einer vermehrten Produktion von Kollagen kommt (Langholz et al. 1995), was wiederum die fibrotischen Veränderungen im Zahnfleisch von betroffenen Patienten erklären könnte (Zhou et al. 2009). Interessanterweise führt die Bindung von TGF β an dessen Rezeptor an der Zelloberfläche u. a. zur MKK6-vermittelten Aktivierung der Kinase p38 (Hanafusa et al. 1999). Dabei wird die TGF β -

aktivierte Kinase 1 (TAK1), die zur Familie der mitogenaktivierten Proteinkinasen-Kinasen-Kinasen (MAPKKK) zählt, aktiviert. Dies führt wiederum über die Phosphorylierung von MKK6 zur Aktivierung der Kinase p38, welche ihrerseits in den Zellkern gelangt und dort den Transkriptionsfaktor 2 (ATF2) phosphoryliert und somit aktiviert (Hanafusa et al. 1999, Adachi-Yamada et al. 1999, Sano et al. 1999). Gleichzeitig wird durch die Bindung von TGF an den Rezeptor die SMAD (*SMAD and MAD related*)-vermittelte Signalkaskade aktiviert (Heldin et al. 1997). Ein wichtiges SMAD-Protein ist SMAD4, das in den Zellkern transloziert und dort die Transkription verschiedener Gene beeinflusst (Heldin et al. 1997, Hanafusa et al. 1999). So kommt es unter Einfluss von TGF zur parallelen Aktivierung des SMAD- und TAK1-MKK6-p38-Signalweges, was in der Bildung eines aktiven Transkriptionsfaktor-Komplexes resultiert, der u. a. SMAD4 und ATF2 enthält (Hanafusa et al. 1999, Adachi-Yamada et al. 1999, Sano et al. 1999). Dadurch werden vermehrt Gene transkribiert, die zu einer gesteigerten Produktion von Komponenten der ECM führen. Dabei scheint die Signalkaskade der SMAD-Proteine essenziell für das TGF-Signalling zu sein, während die Aktivierung des TAK1-MKK6-p38-Signalweges eher eine verstärkende Wirkung hat (Hanafusa et al. 1999). Bei den beiden Patienten mit einer Duplikation im Bereich des *MAP2K6*-Gens (Patienten 4 und 5, Abb. 27) könnte also die erhöhte Kopienanzahl dieses Gens zu einer vermehrten Aktivität der Kinase MKK6 führen und damit die TGF-vermittelten Signale, z. B. die Expression des Integrins $\alpha 2$, intrazellulär verstärken und somit die vermehrte Kollagen-Produktion der Gingivafibroblasten erklären. Bei den Patienten, die im Bereich des *MAP2K6*-Gens jedoch eine Deletion haben (Patienten der Familien 1-3, Abb. 27), findet sich dagegen keine Zahnfleischveränderung, da der verstärkende Effekt der TAK1-MKK6-p38-Signalkaskade abgeschwächt ist. Auch die von Hart und Mitarbeitern (2002) bei Patienten mit HGF beschriebene c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation im *SOS1*-Gen lässt sich mit der TGF-vermittelten erhöhten Kollagen-Produktion in Verbindung bringen. Eine verstärkte Aktivität im RAS-MAPK-Signalweg, der durch *SOS1* aktiviert wird, führt zu einer verstärkten Expression von Kollagen (Typ I) und einem Wachstumsfaktor für Bindegewebe (*connective tissue growth factor*, CTGF) (Leivonen et al. 2005, Mulsow et al. 2005) sowie von TGF (Mulder 2000). Wenn die c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation in *SOS1* zu dem von Jang und Kollegen (2007) postulierten Funktionsgewinn des *SOS1*-Proteins und dem daraus resultierenden verstärkten Signalfuss in der RAS-MAPK-Kaskade führt, wäre die Entstehung der Gingivahyperplasie sowohl über die direkte Steigerung der ECM-Produktion als auch über eine verstärkte TGF-Aktivität erklärbar.

Zusammenfassend komme ich zu der Annahme, dass die Fibroseentstehung im Zahnfleisch über drei miteinander vernetzte Signalwege vermittelt wird. Hierbei stellt die TGF -vermittelte Aktivierung von SMAD-Proteinen die Hauptkomponente dar. Die Auswirkungen dieser Aktivierung werden jedoch sowohl vom RAS-MAPK-Signalweg als auch von der TGF -vermittelten Aktivierung von MKK6 reguliert (Abb. 29). So könnte das Auftreten der Gingivahyperplasie bei den Patienten mit der c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation in SOS1 mit einer verstärkten Aktivität im RAS-MAPK-Signalweg erklärt werden, während es bei den beiden Patienten 4 und 5 mit einer Duplikation im Bereich des *MAP2K6*-Gens aufgrund der erhöhten Aktivität von p38 zur vermehrten Expression von ECM-Proteinen kommt (Abb. 29).

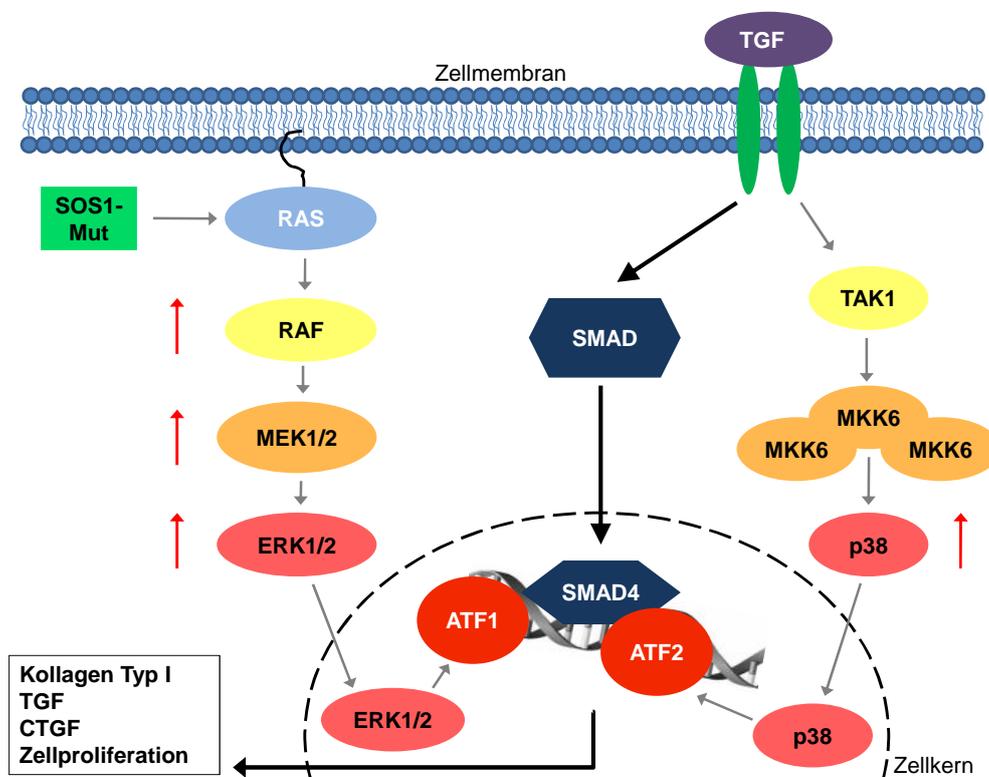


Abb. 29: Schematische Darstellung möglicher Signalwege, die bei erhöhter Aktivität zur Gingivafibromatose führen könnten

Im linken Teil der Abbildung ist der RAS-MAPK-Signalweg dargestellt. Bei Expression des durch die c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation veränderten SOS1-Proteins ($SOS1^{Mut}$) könnte es zu einer verstärkten Aktivität in dieser Signalkaskade kommen. Am Ende dieser Signalkaskade gelangt ERK1/2 in den Zellkern und aktiviert dort den Transkriptionsfaktor ATF1 (aktivierender Transkriptionsfaktor 1). Rechts sind die beiden TGF -vermittelten Signalwege dargestellt. Zum einen werden SMAD-Proteine aktiviert, wodurch SMAD4 in den Zellkern transloziert und zusammen mit ATF2 einen Transkriptionsfaktor-Komplex bildet. ATF2 seinerseits wird durch den TAK1-MKK6-p38-Signalweg aktiviert. ATF1, ATF2 und SMAD4 binden im Zellkern an die DNA und vermitteln die Transkription von Genen, die für eine vermehrte Produktion von Bestandteilen der ECM sorgen (Kollagen Typ I; CTGF, *connective tissue growth factor*). Außerdem kommt es zu einer erhöhten Zellproliferation und Expression von TGF .

Zum Ende bleibt aber noch die Frage, warum bei Patienten mit HGF nur das Zahnfleisch von den fibrotischen Veränderungen betroffen ist, da auch in anderen Geweben eine erhöhte TGF- β -Expression zur Fibrose führt (Border und Noble 1994). Und auch eine verstärkte Aktivität im RAS-MAPK-Signalweg führt, wie am klinischen Bild der NCFC-Syndrome zu sehen ist, eher zu Multisystem-Erkrankungen. Besonders bemerkenswert ist, dass Mutationen in *SOS1* einerseits zum NS führen und andererseits eine auf das Zahnfleisch begrenzte Erkrankung wie die HGF hervorrufen. Bei den NS-assoziierten Mutationen handelt es sich fast ausschließlich um heterozygote Punktmutationen, die den Austausch einer Aminosäure zur Folge haben (Lepri et al. 2011). Sie führen alle zu einer vermehrten Aktivität des GEFs *SOS1* und somit zu einer erhöhten RAS-Aktivierung. *SOS1* hat zwei Bindestellen für RAS-Proteine: eine katalytische Bindestelle, an welche GDP-beladenes RAS bindet und dort durch den Nukleotidaustausch aktiviert wird, und eine allosterische Bindestelle, an welche aktives GTP-gebundenes RAS binden kann, wodurch die katalytische Aktivität von *SOS1* gesteigert wird (Margarit et al. 2003). Bei fehlender Stimulation liegt *SOS1* im inaktiven Zustand vor (Sondermann et al. 2004). Hierbei wird die allosterische RAS-Bindestelle durch den NH₂-Terminus blockiert (Sondermann et al. 2004, Gureasko et al. 2010). Außerdem scheint auch der COOH-terminale Teil von *SOS1* eine autoinhibitorische Funktion zu haben, da Proteinvarianten, denen dieser Prolin-reiche Abschnitt fehlt, eine verstärkte Aktivität haben (Corbalan-Garcia et al. 1998). Ein weiterer Schritt bei der Aktivierung von *SOS1* ist dessen Rekrutierung an die Plasmamembran (Aronheim et al. 1994, Gureasko et al. 2010). Die bei Patienten mit NS identifizierten *SOS1*-Mutationen können in zwei Gruppen eingeteilt werden. In einer Gruppe werden diejenigen Veränderungen zusammengefasst, welche die Autoinhibition verhindern, während die Mutationen in der anderen Gruppe zu einer verstärkten Rekrutierung von *SOS1* an die Plasmamembran führen (Lepri et al. 2011). Die c.3248dupC (p.R1084Kfs*23)-Mutation in *SOS1* führt durch die fehlende autoinhibitorische Funktion des COOH-Terminus anscheinend ebenfalls zu einer verstärkten Aktivität (Corbalan-Garcia et al. 1998, Jang et al. 2007). Jang und Kollegen (2007) konnten eine gesteigerte Translokation von *SOS1* an die Membran nachweisen, wobei der genaue Mechanismus jedoch unklar blieb (Jang et al. 2007). Möglicherweise führt diese *SOS1*-Mutation noch über andere Signalwege zu einer ERK-Aktivierung, da die Phosphorylierung von ERK1/2 in Gingivafibroblasten von HGF-Patienten zwar durch einen MEK1-Inhibitor vermindert werden konnte, jedoch bei weitem nicht so stark wie nach Expression von *SOS1*^{WT} (Jang et al. 2007). Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass bei der Pathogenese der HGF neben einer erhöhten Aktivität im RAS-MAPK-Signalweg auch noch andere Signalkaskaden eine Rolle spielen. So bleibt

als eine Aufgabe für die Zukunft die Identifizierung dieser Signalwege, die spezifisch im Zahnfleisch zur Entstehung einer Fibrose führen. Nützlich könnte hierbei die genetische Heterogenität der HGF sein, so dass versucht werden kann, anhand anderer genomischer Regionen, die mit dem Auftreten der HGF assoziiert sind, wie z. B. 5q13-q22 (Xiao et al. 2001), neue Erkenntnisse über den Pathomechanismus zu gewinnen.

VI. Zusammenfassung

Der RAS-MAPK-Signalweg spielt eine wichtige Rolle bei der Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Veränderungen in Genen, die für Proteine dieses Signalwegs kodieren, führen zu unterschiedlichen Krankheitsbildern. Somatische Mutationen sind oft an der Entstehung eines bösartigen Tumors mitbeteiligt, während Keimbahnmutationen zu Erkrankungen aus dem Formenkreis der neuro-kardio-fazio-kutanen (*neuro-cardio-facio-cutaneous*; NCFC)-Syndrome oder RASopathien führen. Hierzu zählen u. a. das Noonan-Syndrom, das kardio-fazio-kutane (CFC)-Syndrom und das Costello-Syndrom. Bei 70-80% der Betroffenen wird eine Mutation in einem der bekannten kausalen Gene identifiziert, weswegen nach weiteren Krankheitsgenen gesucht wird. Die wiederkehrende Missense-Mutation c.4A>G (p.S2G) im *SHOC2*-Gen, die mit dem sogenannten *Noonan-like syndrome with loose-anagen hair* assoziiert ist, wurde kürzlich publiziert. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daraufhin 186 mutationsnegative Patienten mit dem klinischen Verdacht auf eine RASopathie auf die *SHOC2*-Mutation c.4A>G mittels PCR und Restriktionsanalyse hin untersucht. Es konnten sechs Patienten als Mutationsträger identifiziert werden. Klinisch weisen sie alle ein *Noonan-like syndrome with loose-anagen hair* auf, das neben typischen Merkmalen des Noonan-Syndroms, wie Kleinwuchs, postnatale Gedeihstörung, Intelligenzminderung, angeborene Herzfehler sowie Hypertelorismus, Ptosis und tief ansetzende, nach hinten rotierte Ohren durch das Auftreten von hellem, schütterem und leicht ausreißbarem Kopfhair charakterisiert ist. Somit konnte die bekannte Genotyp-Phänotyp-Korrelation untermauert werden. Bei einigen Patienten des zur Verfügung stehenden Patientenkollektivs wurden außerdem ausgewählte Exons von zwei neuen, mit dem RAS-Signalweg assoziierten Kandidatengenen, *GNAI2* und *ERBB4*, mittels PCR und Sequenzierung auf mögliche Mutationen hin untersucht. Hierbei konnte jedoch keine krankheitsverursachende Veränderung festgestellt werden.

Neben dem Mutationsscreening sollten die molekularbiologischen Auswirkungen der bei einer Patientin mit Costello-Syndrom neu gefundenen *HRAS*-Mutation c.187_207dup (p.E63_D69dup) charakterisiert werden. Hierfür wurde mithilfe PCR-vermittelter Mutagenese das entsprechende *HRAS*-cDNA-Konstrukt hergestellt und COS-7-Zellen transient transfiziert. Daraufhin wurden die Bindungseigenschaften des mutierten *HRAS*-Proteins an verschiedene Effektoren mittels GTPase-Pulldown-Experimenten untersucht und durch Western-Blot-Analyse und densitometrische Auswertung quantifiziert. Hierbei zeigte sich, dass das *HRAS*^{E63_D69dup}-Protein vermehrt im aktiven Zustand vorliegt, woraus eine ebenfalls vermehrte Interaktion mit den *HRAS*-Effektoren RAF1, RALGDS und PLC resultierte. Interessanterweise konnte

festgestellt werden, dass die Bindung der HRAS-Mutante an einen anderen Effektor, der katalytischen Untereinheit der PI3-Kinase (PI3KCA), beeinträchtigt war. Ebenfalls mittels Western-Blot-Analysen wurden die Auswirkungen auf die Aktivierung HRAS-abhängiger Signalwege analysiert. Es konnte eine verstärkte Phosphorylierung der MAP-Kinasen MEK1/2 sowie ERK1/2 identifiziert werden, jedoch nicht von AKT (Proteinkinase B α), was wahrscheinlich durch die verminderte Interaktion zwischen HRAS^{E63_D69} und PI3KCA, die *upstream* von AKT liegt, erklärt werden kann.

Eine Form der hereditären Gingivahypertrophie (HGF), die auch bei einigen Patienten mit Costello-Syndrom vorkommt, wird ebenfalls durch eine genetische Veränderung im RAS-MAPK-Signalweg hervorgerufen. Hierbei kommt es vermutlich zur vermehrten Produktion von extrazellulärer Matrix (ECM), was eine Hypertrophie/Fibrose des Zahnfleisches zur Folge hat. Bei mehreren Betroffenen aus einer Familie mit HGF wurde eine Mutation in *SOS1*, das für einen Guaninnukleotidaustauschfaktor von RAS kodiert, beschrieben [c.3248dupC (p.R1084Kfs*22)]. Auch bei Patienten mit einer Duplikation im Bereich des *MAP2K6*-Gens, das für die MAP Kinase-Kinase 6 (MKK6) kodiert, wurde von einer Gingivahyperplasie berichtet. Da bei den beschriebenen genetischen Veränderungen von einem Funktionsgewinn des entsprechenden Proteins auszugehen ist, sollte in dieser Arbeit analysiert werden, ob es einen direkten Signalweg von *SOS1* über HRAS (bei Patienten mit Costello-Syndrom mutiert) zur MAP-Kinase MKK6 gibt, der möglicherweise an der Pathogenese der HGF beteiligt ist. Hierfür wurde zunächst ein Zellsystem etabliert, in dem die Kinase MKK6 durch einen Stimulus aktiviert werden kann. Die *SOS1*-cDNA-Konstrukte [für Wildtyp (SOS^{WT}) und Mutante (SOS^{Mut})] wurden mittels PCR-Mutagenese generiert und die entsprechenden Proteine in HeLa-Zellen transient exprimiert. In diesen Zellen wurden die Phosphorylierungszustände von MKK6 und ERK1/2 mittels Western-Blot-Analyse und densitometrischer Auswertung quantifiziert. Die hier durchgeführten Untersuchungen erbrachten jedoch keinen Hinweis auf einen direkten Signalweg von *SOS1* zur MAP-Kinase MKK6. Eine Rolle dieser Signalproteine bei der Pathogenese der Gingivahypertrophie ist dennoch möglich, da sie regulierend auf die Bildung von Komponenten der ECM wirken.

Literaturverzeichnis

- Adachi-Yamada, T., Nakamura, M., Irie, K., Tomoyasu, Y., Sano, Y., Mori, E., Goto, S., Ueno, N., Nishida, Y. & Matsumoto, K. p38 Mitogen-Activated Protein Kinase Can Be Involved in Transforming Growth Factor beta Superfamily Signal Transduction in Drosophila Wing Morphogenesis, *Mol Ce. Biol* 19, 2322–2329 (1999).
- Ahmadian, M.R., Zor, T., Vogt, D., Kabsch, W., Selinger, Z., Wittinghofer, A. & Scheffzek, K. Guanosine triphosphatase stimulation of oncogenic Ras mutants, *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 7065–7070 (1999).
- Ahmadian, M.R., Kiel, C., Stege, P. & Scheffzek, K. Structural fingerprints of the Ras-GTPase activating proteins neurofibromin and p120GAP, *J Mol Biol* 329, 699–710 (2003).
- Allanson, J. E. Noonan syndrome., *J Med Genet* 24, 9–13 (1987).
- Aoki, Y., Niihori, T., Kawame, H., Kurosawa, K., Ohashi, H., Tanaka, Y., Filocamo, M., Kato, K., Suzuki, Y., Kure, S. & Matsubara, Y. Germline mutations in HRAS proto-oncogene cause Costello syndrome, *Nat Genet* 37, 1038–1040 (2005).
- Aoki, Y., Niihori, T., Narumi, Y., Kure, S. & Matsubara, Y. The RAS/MAPK syndromes: novel roles of the RAS pathway in human genetic disorders, *Hum Mutat* 29, 992–1006 (2008).
- Aronheim, A., Engelberg, D., Li, N., Al-Alawi, N., Schlessinger, J. & Karin, M. Membrane targeting of the nucleotide exchange factor Sos is sufficient for activating the Ras signaling pathway, *Cell* 78, 949–961 (1994).
- Bardwell, L. Mechanisms of MAPK signalling specificity, *Biochem Soc Trans* 34, 837–841 (2006).
- Benko, S., Fantes, J.A., Amiel, J., Kleinjan, D.-J., Thomas, S., Ramsay, J., Jamshidi, N., Essafi, A., Heaney, S., Gordon, C.T., McBride, D., Golzio, C., Fisher, M., Perry, P., Abadie, V., Ayuso, C., Holder-Espinasse, M., Kilpatrick, N., Lees, M.M., Picard, A., Temple, I.K., Thomas, P., Vazquez, M.-P., Vekemans, M., Crollius, H.R., Hastie, N.D., Munnich, A., Etchevers, H.C., Pelet, A., Farlie, P.G., FitzPatrick, D.R. & Lyonnet, S. Highly conserved non-coding elements on either side of SOX9 associated with Pierre Robin sequence, *Nat Genet* 41, 359–364 (2009).
- Bertola, D.R., Pereira, A.C., Oliveira, P.S.d., Kim, C.A. & Krieger, J.E. Clinical variability in a Noonan syndrome family with a new PTPN11 gene mutation, *Am J Med Genet* 130A, 378–383 (2004).
- Birnboim, H.C. & Doly, J. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA, *Nucleic Acids Res* 7, 1513–1523 (1979).
- Blobe, G.C., Schiemann, W.P. & Lodish, H.F. Role of Transforming Growth Factor in Human Disease, *N Engl J Med* 342, 1350–1358 (2000).
- Bodzioch, M., Orso, E., Klucken, J., Langmann, T., Bottcher, A., Diederich, W., Drobnik, W., Barlage, S., Buchler, C., Porsch-Ozcurumez, M., Kaminski, W.E., Hahmann, H.W., Oette, K., Rothe, G., Aslanidis, C., Lackner, K.J. & Schmitz, G. The gene encoding ATP-binding cassette transporter 1 is mutated in Tangier disease, *Nat Genet* 22, 347–351 (1999).
- Border, W.A. & Noble, N.A. Transforming Growth Factor in Tissue Fibrosis, *N Engl J Med* 331, 1286–1292 (1994).

- Boriack-Sjodin, P.A., Margarit, S.M., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. The structural basis of the activation of Ras by Sos, *Nature* 394, 337–343 (1998).
- Bos, J.L. ras Oncogenes in Human Cancer: A Review, *Cancer Research* 49, 4682–4689 (1989).
- Brems, H., Chmara, M., Sahbatou, M., Denayer, E., Taniguchi, K., Kato, R., Somers, R., Messiaen, L., Schepper, S. de, Fryns, J.-P., Cools, J., Marynen, P., Thomas, G., Yoshimura, A. & Legius, E. Germline loss-of-function mutations in SPRED1 cause a neurofibromatosis 1-like phenotype, *Nat Genet* 39, 1120–1126 (2007).
- Brooks-Wilson, A., Marcil, M., Clee, S.M., Zhang, L.-H., Roomp, K., van Dam, M., Yu, L., Brewer, C., Collins, J.A., Molhuizen, H.O.F., Loubser, O., Ouelette, B.F.F., Fichter, K., Ashbourne-Excoffon, K.J.D., Sensen, C.W., Scherer, S., Mott, S., Denis, M., Martindale, D., Frohlich, J., Morgan, K., Koop, B., Pimstone, S., Kastelein, J.J.P., Genest, J. & Hayden, M.R. Mutations in ABC1 in Tangier disease and familial high-density lipoprotein deficiency, *Nat Genet* 22, 336–345 (1999).
- Bunney, T.D. & Katan, M. Phospholipase C epsilon: linking second messengers and small GTPases, *Trends Cell Biol* 16, 640–648 (2006).
- Burkitt-Wright, E. M.M., Bradley, L., Shorto, J., McConnell, V. P.M., Gannon, C., Firth, H. V., Park, S.-M., D'Amore, A., Munyard, P. F., Turnpenny, P. D., Charlton, A., Wilson, M. & Kerr, B. Neonatal lethal Costello syndrome and unusual dinucleotide deletion/insertion mutations in *HRAS* predicting p.Gly12Val, *Am J Med Genet* 158A, 1102–1110 (2012).
- Cantatore-Francis, J.L. & Orlow, S.J. Practical Guidelines for Evaluation of Loose Anagen Hair Syndrome, *Arch Dermatol* 145, 1123–1128 (2009).
- Cawthon, R.M., O'Connell, P., Buchberg, A.M., Viskochil, D., Weiss, R.B., Culver, M., Stevens, J., Jenkins, N.A., Copeland, N.G. & White, R. Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of *EVI2* and mapping of other transcripts, *Genomics* 7, 555–565 (1990).
- Chardin, P., Camonis J H, Gale, N.W., van Aelst, L., Schlessinger, J., Wigler, M.H. & Bar-Sagi, D. Human *Sos1*: a guanine nucleotide exchange factor for Ras that binds to *GRB2*, *Science* 260, 1338–1343 (1993).
- Cheung, M., Chaboissier, M.-C., Mynett, A., Hirst, E., Schedl, A. & Briscoe, J. The Transcriptional Control of Trunk Neural Crest Induction, Survival, and Delamination, *Developmental Cell* 8, 179–192 (2005).
- Cirstea, I. C., Kutsche, K., Dvorsky, R., Gremer, L., Carta, C., Horn, D., Roberts, A.E., Lepri, F., Merbitz-Zahradnik, T., König, R., Kratz, C.P., Pantaleoni, F., Dentici, M.L., Joshi, V.A., Kucherlapati, R.S., Mazzanti, L., Mundlos, S., Patton, M.A., Silengo, M.C., Rossi, C., Zampino, G., Digilio, C., Stuppia, L., Seemanova, E., Pennacchio, L.A., Gelb, B.D., Dallapiccola, B., Wittinghofer, A., Ahmadian, M.R., Tartaglia, M. & Zenker, M. A restricted spectrum of *NRAS* mutations causes Noonan syndrome, *Nat Genet* 42, 27–29 (2010).
- Cole, R. B. Noonan's Syndrome: A Historical Perspective, *Pediatrics* 66, 468–469 (1980).
- Coletta, R. D., Almeida, O. P., Reynolds, M. A. & Sauk, J. J. Alteration in expression of MMP-1 and MMP-2 but not TIMP-1 and TIMP-2 in hereditary gingival fibromatosis is mediated by TGF- 1 autocrine stimulation, *J Periodontal Res* 34, 457–463 (1999).

- Corbalan-Garcia, S., Margarit, S. M., Galron, D., Yang, S. & Bar-Sagi, D. Regulation of Sos Activity by Intramolecular Interactions, *Mol Cell Biol* 18, 880–886 (1998).
- Cordeddu, V., Di Schiavi, E., Pennacchio, L. A., Ma'ayan, A., Sarkozy, A., Fodale, V., Cecchetti, S., Cardinale, A., Martin, J., Schackwitz, W., Lipzen, A., Zampino, G., Mazzanti, L., Digilio, M.C., Martinelli, S., Flex, E., Lepri, F., Bartholdi, D., Kutsche, K., Ferrero, G.B., Anichini, C., Selicorni, A., Rossi, C., Tenconi, R., Zenker, M., Merlo, D., Dallapiccola, B., Iyengar, R., Bazzicalupo, P., Gelb, B.D. & Tartaglia, M. Mutation of SHOC2 promotes aberrant protein N-myristoylation and causes Noonan-like syndrome with loose anagen hair, *Nat Genet* 41, 1022–1026 (2009).
- Costello, J.M. A new syndrome: mental subnormality and nasal papillomata., *Aust Paediatr J* 13, 114-118. (1977).
- Denayer, E. & Legius, E. What's new in the neuro-cardio-facial-cutaneous syndromes?, *Eur J Pediatr* 166, 1091–1098 (2007).
- Denayer, E., Parret, A., Chmara, M., Schubber, S., Vogels, A., Devriendt, K., Frijns, J.-P., Rybin, V., Ravel, T. J. de, Shannon, K., Cools, J., Scheffzek, K. & Legius, E. Mutation analysis in Costello syndrome: functional and structural characterization of the HRAS p.Lys117Arg mutation, *Hum Mutat* 29, 232–239 (2008a).
- Denayer, E., Ravel, Th. de & Legius, E. Clinical and molecular aspects of RAS related disorders, *J Med Genet* 45, 695–703 (2008b).
- Dhillon, A.S., Kriegsheim, A. von, Grindlay, J. & Kolch, W. Phosphatase and feedback regulation of Raf-1 signaling, *Cell Cycle* 6, 3–7 (2007).
- DiBello, P.R., Garrison, T.R., Apanovitch, D.M., Hoffman, G., Shuey, D.J., Mason, K., Cockett, M.I. & Dohlman, H.G. Selective Uncoupling of RGS Action by a Single Point Mutation in the G Protein γ -Subunit, *J Biol Chem* 273, 5780–5784 (1998).
- Digilio, M., Conti, E., Sarkozy, A., Mingarelli, R., Dottorini, T., Marino, B., Pizzuti, A. & Dallapiccola, B. Grouping of Multiple-Lentiginos/LEOPARD and Noonan Syndromes on the PTPN11 Gene, *Am J Hum Genet* 71, 389–394 (2002).
- Digilio, M., Sarkozy, A., Capolino, R., Chiarini Testa, M., Esposito, G., Zorzi, A. de, Cutrera, R., Marino, B. & Dallapiccola, B. Costello syndrome: clinical diagnosis in the first year of life, *Eur J Pediatr* 167, 621–628 (2008).
- Estep, A.L., Tidyman, W.E., Teitell, M.A., Cotter, P.D. & Rauen, K.A. HRAS mutations in Costello syndrome: Detection of constitutional activating mutations in codon 12 and 13 and loss of wild-type allele in malignancy, *Am J Med Genet* 140A, 8–16 (2006).
- Farnsworth, C.L. & Feig, L.A. Dominant inhibitory mutations in the Mg(2+)-binding site of RasH prevent its activation by GTP, *Mol Cell Biol* 11, 4822–4829 (1991).
- Feig, L.A. & Buchsbaum, R.J. Cell Signaling: Life or Death Decisions of Ras Proteins, *Curr Biol* 12, R259-261 (2002).
- Ferrero, G.B., Picco, G., Baldassarre, G., Flex, E., Isella, C., Cantarella, D., Cora, D., Chiesa, N., Crescenzo, N., Timeus, F., Merla, G., Mazzanti, L., Zampino, G., Rossi, C., Silengo, M., Tartaglia, M. & Medico, E. Transcriptional hallmarks of Noonan syndrome and Noonan-like syndrome with loose anagen hair, *Hum Mutat* 33, 703–709 (2012).
- Fuller, S.J., Sivarajah, K. & Sugden, P.H. ErbB receptors, their ligands, and the consequences of their activation and inhibition in the myocardium, *J Mol Cell Cardiol* 44, 831–854 (2008).

- Galperin, E., Abdelmoti, L. & Sorkin, A. Shoc2 Is Targeted to Late Endosomes and Required for Erk1/2 Activation in EGF-Stimulated Cells, *PLoS ONE* 7, e36469 (2012).
- Gao, Z. & Mackenzie, I. C. Patterns of phenotypic expression of human junctional, gingival and reduced enamel epithelia in vivo and in vitro, *Epithelial Cell Biol* 1, 156–167 (1992).
- Garnett, M.J. & Marais, R. Guilty as charged: B-RAF is a human oncogene, *Cancer Cell* 6, 313–319 (2004).
- Gordon, C.T., Tan, T.Y., Benko, S., FitzPatrick, D., Lyonnet, S. & Farlie, P.G. Long-range regulation at the SOX9 locus in development and disease, *J Med Genet* 46, 649–656 (2009).
- Gorlin, R.J., Cohen, M.M. & Levin, L.S. *Syndromes of the head and neck*. 3rd ed. Oxford Univ. Press, New York (1990).
- Gremer, L., Luca, A. de, Merbitz-Zahradnik, T., Dallapiccola, B., Morlot, S., Tartaglia, M., Kutsche, K., Ahmadian, M.R. & Rosenberger, G. Duplication of Glu37 in the switch I region of HRAS impairs effector/GAP binding and underlies Costello syndrome by promoting enhanced growth factor-dependent MAPK and AKT activation, *Hum Mol Genet* 19, 790–802 (2010).
- Gremer, L., Merbitz-Zahradnik, T., Dvorsky, R., Cirstea, I. C., Kratz, C. P., Zenker, M., Wittinghofer, A. and Ahmadian, M. R. Germline *KRAS* mutations cause aberrant biochemical and physical properties leading to developmental disorders, *Hum Mutat* 32, 33–43 (2011).
- Gripp, K. W. Tumor predisposition in Costello syndrome, *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 137C, 72–77 (2005).
- Gripp, K.W., Lin, A.E., Stabley, D.L., Nicholson, L., Scott, C.I., Doyle, D., Aoki, Y., Matsubara, Y., Zackai, E.H., Lapunzina, P., Gonzalez-Meneses, A., Holbrook, J., Agresta, C.A., Gonzalez, I.L. & Sol-Church, K. HRAS mutation analysis in Costello syndrome: Genotype and phenotype correlation, *Am J Med Genet* 140A, 1–7 (2006).
- Gripp, K.W., Innes, A.M., Axelrad, M.E., Gillan, T.L., Parboosingh, J.S., Davies, C., Leonard, N.J., Lapointe, M., Doyle, D., Catalano, S., Nicholson, L., Stabley, D.L. & Sol-Church, K. Costello syndrome associated with novel germline HRAS mutations: an attenuated phenotype?, *Am J Med Genet* 146A, 683–690 (2008).
- Gripp, K. W., Hopkins, E., Sol-Church, K., Stabley, D. L., Axelrad, M. E., Doyle, D., Dobyns, W. B., Hudson, C., Johnson, J., Tenconi, R., Graham, G. E., Sousa, A. B., Heller, R., Piccione, M., Corsello, G., Herman, G. E., Tartaglia, M. & Lin, A. E. Phenotypic analysis of individuals with Costello syndrome due to HRAS p.G13C, *Am J Med Genet* 155, 706–716 (2011).
- Gripp, K. W., Hopkins, E., Serrano, A., Leonard, N. J., Stabley, D. L. & Sol-Church, K. Transmission of the rare HRAS mutation (c. 173C > T; p.T58I) further illustrates its attenuated phenotype, *Am J Med Genet* 158A, 1095–1101 (2012).
- Gripp, K.W. & Lin, A.E. Costello syndrome: a Ras/mitogen activated protein kinase pathway syndrome (rasopathy) resulting from HRAS germline mutations, *Genet Med* 14, 285–292 (2012).
- Guiding, C., McNair, K., Stone, T.W. & Morris, B.J. Restored plasticity in a mouse model of neurofibromatosis type 1 via inhibition of hyperactive ERK and CREB, *Eur J Neurosci* 25, 99–105 (2007).

- Gureasko, J., Kuchment, O., Makino, D.L., Sondermann, H., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. Role of the histone domain in the autoinhibition and activation of the Ras activator Son of Sevenless, *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 3430–3435 (2010).
- Häkkinen, L. & Csiszar, A. Hereditary gingival fibromatosis: characteristics and novel putative pathogenic mechanisms, *J Dent Res* 86, 25–34 (2007).
- Han, J., Lee, J.D., Jiang, Y., Li, Z., Feng, L. & Ulevitch, R.J. Characterization of the structure and function of a novel MAP kinase kinase (MKK6), *J Biol Chem* 271, 2886–2891 (1996).
- Hanafusa, H., Ninomiya-Tsuji, J., Masuyama, N., Nishita, M., Fujisawa, J., Shibuya, H., Matsumoto, K. & Nishida, E. Involvement of the p38 Mitogen-activated Protein Kinase Pathway in Transforming Growth Factor- β -induced Gene Expression, *J Biol Chem* 274, 27161–27167 (1999).
- Hart, T.C., Pallos, D., Bozzo, L., Almeida, O.P., Marazita, M.L., O'Connell, J.R. & Cortelli, J.R. Evidence of genetic heterogeneity for hereditary gingival fibromatosis, *J Dent Res* 79, 1758–1764 (2000).
- Hart, T.C., Zhang, Y., Gorry, M.C., Hart, P.S., Cooper, M., Marazita, M.L., Marks, J.M., Cortelli, J.R. & Pallos, D. A mutation in the SOS1 gene causes hereditary gingival fibromatosis type 1, *Am J Hum Genet* 70, 943–954 (2002).
- Heinrich, M., Müller, M., Rand, S., Brinkmann, B. & Hohoff, C. Allelic drop-out in the STR system ACTBP2 (SE33) as a result of mutations in the primer binding region, *Int J Legal Med* 118, 361–363 (2004).
- Heldin, C.-H., Miyazono, K. & Dijke, P. TGF β signalling from cell membrane to nucleus through SMAD proteins, *Nature* 390, 465–471 (1997).
- Hennekam, R.C. Costello syndrome: An overview, *Am J Med Genet* 117C, 42–48 (2003).
- Holbrook, J.F., Stabley, D. & Sol-Church, K. Exploring Whole Genome Amplification as a DNA Recovery Tool for Molecular Genetic Studies, *J Biomol Tech* 16, 125–133 (2005).
- Hu, X., Li, T., Zhang, C., Liu, Y., Xu, M., Wang, W., Jia, Z., Ma, K., Zhang, Y. & Zhou, C. GATA4 regulates ANF expression synergistically with Sp1 in a cardiac hypertrophy model, *J Cell Mol Med* 15, 1865–1877 (2011).
- Huang, X., Fu, Y., Charbeneau, R.A., Saunders, T.L., Taylor, D.K., Hankenson, K.D., Russell, M.W., D'Alecy, L.G. & Neubig, R.R. Pleiotropic Phenotype of a Genomic Knock-In of an RGS-Insensitive G184S Gnai2 Allele, *Mol Cell Biol* 26, 6870–6879 (2006).
- Huang, X., Fu, Y., Charbeneau, R.A. & Neubig, R.R. GNAI2 and regulators of G protein signaling as a potential Noonan syndrome mechanism, *Med Hypotheses* 73, 56–59 (2009).
- Hynes, R.O. Integrins: Versatility, modulation, and signaling in cell adhesion, *Cell* 69, 11–25 (1992).
- Jakobsen, L.P., Ullmann, R., Christensen, S.B., Jensen, K.E., Mølsted, K., Henriksen, K.F., Hansen, C., Knudsen, M.A., Larsen, L.A., Tommerup, N. & Thomsen, Z. Pierre Robin sequence may be caused by dysregulation of SOX9 and KCNJ2, *J Med Genet* 44, 381–386 (2007).

- Jang, S.-I., Lee, E.-J., Hart, P.S., Ramaswami, M., Pallos, D. & Hart, T.C. Germ line gain of function with SOS1 mutation in hereditary gingival fibromatosis, *J Biol Chem* 282, 20245–20255 (2007).
- Jorge, A.A.L., Malaquias, A.C., Arnhold, I.J.P. & Mendonca, B.B. Noonan Syndrome and Related Disorders: A Review of Clinical Features and Mutations in Genes of the RAS/MAPK Pathway, *Horm Res* 71, 185–193 (2009).
- Kaminski, W.E., Piehler, A. & Wenzel, J.J. ABC A-subfamily transporters: Structure, function and disease, *Biochim Biophys Acta* 1762, 510–524 (2006).
- Karnoub, A.E. & Weinberg, R.A. Ras oncogenes: split personalities, *Nat Rev Mol Cell Biol* 9, 517–531 (2008).
- Kerr, B., Delrue, M.-A., Sigaudy, S., Perveen, R., Marche, M., Burgelin, I., Stef, M., Tang, B., Eden, O.B., O'Sullivan, J., Sandre-Giovannoli, A. de, Reardon, W., Brewer, C., Bennett, C., Quarell, O., M'Cann, E., Donnai, D., Stewart, F., Hennekam, R., Cavé, H., Verloes, A., Philip, N., Lacombe, D., Levy, N., Arveiler, B. & Black, G. Genotype-phenotype correlation in Costello syndrome: HRAS mutation analysis in 43 cases, *J Med Genet* 43, 401–405 (2006).
- Kerr, B., Allanson, J., Delrue, M.A., Gripp, K.W., Lacombe, D., Lin, A.E. & Rauen, K.A. The diagnosis of Costello syndrome: nomenclature in Ras/MAPK pathway disorders, *Am J Med Genet* 146A, 1218–1220 (2008).
- Kiefer, J.C. Back to basics: Sox genes, *Dev Dyn* 236, 2356–2366 (2007).
- Kim, H.G., Higgins, A.W., Herrick, S.R., Kishikawa, S., Nicholson, L., Kutsche, K., Ligon, A.H., Harris, D.J., MacDonald, M.E., Bruns, G.A., Morton, C.C., Quade, B.J. & Gusella, J.F. Candidate loci for Zimmermann–Laband syndrome at 3p14.3, *Am J Med Genet* 143A, 107–111 (2007).
- Kobayashi, T., Aoki, Y., Niihori, T., Cave, H., Verloes, A., Okamoto, N., Kawame, H., Fujiwara, I., Takada, F., Ohata, T., Sakazume, S., Ando, T., Nakagawa, N., Lapunzina, P., Meneses, A.G., Gillissen-Kaesbach, G., Wiczorek, D., Kurosawa, K., Mizuno, S., Ohashi, H., David, A., Philip, N., Guliyeva, A., Narumi, Y., Kure, S., Tsuchiya, S. & Matsubara, Y. Molecular and clinical analysis of RAF1 in Noonan syndrome and related disorders: dephosphorylation of serine 259 as the essential mechanism for mutant activation, *Hum Mutat* 31, 284–294 (2010).
- Komatsuzaki, S., Aoki, Y., Niihori, T., Okamoto, N., Hennekam, R.C., Hopman, S., Ohashi, H., Mizuno, S., Watanabe, Y., Kamasaki, H., Kondo, I., Moriyama, N., Kurosawa, K., Kawame, H., Okuyama, R., Imaizumi, M., Rikiishi, T., Tsuchiya, S., Kure, S., Matsubara, Y. Mutation analysis of the SHOC2 gene in Noonan-like syndrome and in hematologic malignancies, *J Hum Genet* 55, 801–809 (2010).
- Kurth, I., Klopocki, E., Stricker, S., van Oosterwijk, J., Vanek, S., Altmann, J., Santos, H.G., van Harssel, J.J.T., Ravel, T. de, Wilkie, A.O.M., Gal, A. & Mundlos, S. Duplications of noncoding elements 5[prime] of SOX9 are associated with brachydactyly-anonychia, *Nat Genet* 41, 862–863 (2009).
- Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227, 680–685 (1970).
- Laios, E. & Glynou, K. Allelic drop-out in the LDLR gene affects mutation detection in familial hypercholesterolemia, *Clin Biochem* 41, 38–40 (2008).
- Langholz, O., Röckel, D., Mauch, C., Kozłowska, E., Bank, I., Krieg, T. & Eckes, B. Collagen and collagenase gene expression in three-dimensional collagen lattices

- are differentially regulated by alpha 1 beta 1 and alpha 2 beta 1 integrins, *J Cell Biol* 131, 1903–1915 (1995).
- Leivonen, S.-K., Hakkinen, L., Liu, D. & Kahari, V.-M. Smad3 and Extracellular Signal-Regulated Kinase 1//2 Coordinately Mediate Transforming Growth Factor-[beta]-Induced Expression of Connective Tissue Growth Factor in Human Fibroblasts, *J Investig Dermatol* 124, 1162–1169 (2005).
- Lepri, F., Luca, A. de, Stella, L., Rossi, C., Baldassarre, G., Pantaleoni, F., Cordeddu, V., Williams, B.J., Dentici, M.L., Caputo, V., Venanzi, S., Bonaguro, M., Kavamura, I., Faienza, M.F., Pilotta, A., Stanzial, F., Faravelli, F., Gabrielli, O., Marino, B., Neri, G., Silengo, M.C., Ferrero, G.B., Torrente, I., Selicorni, A., Mazzanti, L., Digilio, M.C., Zampino, G., Dallapiccola, B., Gelb, B.D. & Tartaglia, M. SOS1 mutations in Noonan syndrome: molecular spectrum, structural insights on pathogenic effects, and genotype-phenotype correlations, *Hum Mutat* 32, 760–772 (2011).
- Li, W., Han, M. & Guan, K.L. The leucine-rich repeat protein SUR-8 enhances MAP kinase activation and forms a complex with Ras and Raf, *Genes Dev* 14, 895–900 (2000).
- Lin, A.E., Grossfeld, P.D., Hamilton, R.M., Smoot, L., Gripp, K.W., Proud, V., Weksberg, R., Wheeler, P., Picker, J., Irons, M., Zackai, E., Marino, B., Scott, C.I. & Nicholson, L. Further delineation of cardiac abnormalities in Costello syndrome, *Am J Med Genet* 111, 115–129 (2002).
- Lin, C.-H., Li, L.-H., Ho, S.-F., Chuang, T.-P., Wu, J.-Y., Chen, Y.-T. & Fann, C. A large-scale survey of genetic copy number variations among Han Chinese residing in Taiwan, *BMC Genet* 9, 92 (2008).
- Lo, I.F., Brewer, C., Shannon, N., Shorto, J., Tang, B., Black, G., Soo, M.T., Ng, D.K., Lam, S.T., Kerr, B. Severe neonatal manifestations of Costello syndrome, *J Med Genet* 45, 167-171 (2008).
- Lorenz, S., Petersen, C., Kordaß, U., Seidel, H., Zenker, M., Kutsche, K. Two cases with severe lethal course of Costello syndrome associated with HRAS p.G12C and p.G12D, *Eur J Med Genet* 55, 615-619 (2012).
- Lorenz, S., Lißewski, Ch., Sim ek-Kiper, P.O., Alanay, Y., Boduroglu, K., Zenker, M., Rosenberger, G. Functional analysis of a duplication (p.E63_D69dup) in the switch II region of HRAS: new aspects of the molecular pathogenesis underlying Costello syndrome, *Hum Mol Genet* 22, 1643- 1653 (2013).
- Lynch, M.A., Brightman, V.J. & Greenberg, M.S. *Burket's oral medicine. Diagnosis and treatment*, 9th ed., Lippincott, Philadelphia (1994).
- Lyons, J., Landis, C.A., Harsh, G., Vallar, L., Grunewald, K., Feichtinger, H., Duh, Q.Y., Clark, O.H., Kawasaki, E., Boume, H.R. & al. Two G protein oncogenes in human endocrine tumors, *Science* 249, 655–659 (1990).
- Margarit, S.M., Sondermann, H., Hall, B.E., Nagar, B., Hoelz, A., Pirruccello, M., Barsagi, D. & Kuriyan, J. Structural evidence for feedback activation by Ras.GTP of the Ras-specific nucleotide exchange factor SOS, *Cell* 112, 685–695 (2003).
- Martelli-Junior, H., Cotrim, P., Graner, E., Sauk, J.J. & Coletta, R.D. Effect of Transforming Growth Factor- 1, Interleukin-6, and Interferon- on the Expression of Type I Collagen, Heat Shock Protein 47, Matrix Metalloproteinase (MMP)-1 and MMP-2 by Fibroblasts from Normal Gingiva and Hereditary Gingival Fibromatosis, *J Periodont* 74, 296–306 (2003).

- Martinelli, S., Luca, A. de, Stellacci, E., Rossi, C., Checquolo, S., Lepri, F., Caputo, V., Silvano, M., Buscherini, F., Consoli, F., Ferrara, G., Digilio, M.C., Cavaliere, M.L., van Hagen, J.M., Zampino, G., van der Burgt, I., Ferrero, G.B., Mazzanti, L., Screpanti, I., Yntema, H.G., Nillesen, W.M., Savarirayan, R., Zenker, M., Dallapiccola, B., Gelb, B.D. & Tartaglia, M. Heterozygous Germline Mutations in the CBL Tumor-Suppressor Gene Cause a Noonan Syndrome-like Phenotype, *Am J Hum Genet* 87, 250–257 (2010).
- Matsunaga-Udagawa, R., Fujita, Y., Yoshiki, S., Terai, K., Kamioka, Y., Kiyokawa, E., Yugi, K., Aoki, K. & Matsuda, M. The Scaffold Protein Shoc2/SUR-8 Accelerates the Interaction of Ras and Raf, *J Biol Chem* 285, 7818–7826 (2010).
- Mautner, V.F., Nguyen, R., Bernhard, A., Kodolitsch, Y. von, Zenker, M. & Kutsche, K. Neuro-kardio-fazio-kutane Syndrome, *Medizinische Genetik* 22, 10–19 (2010).
- Mazzanti, L., Cacciari, E., Cicognani, A., Bergamaschi, R., Scarano, E. & Forabosco, A. Noonan-like syndrome with loose anagen hair: A new syndrome?, *Am J Med Genet* 118, 279–286 (2003).
- Mendez, H.M.M., Opitz, J.M. & Reynolds, J.F. Noonan syndrome: A review, *Am J Med Genet* 21, 493–506 (1985).
- Mochizuki, N., Ohba, Y., Kiyokawa, E., Kurata, T., Murakami, T., Ozaki, T., Kitabatake, A., Nagashima, K. & Matsuda, M. Activation of the ERK/MAPK pathway by an isoform of rap1GAP associated with G[alpha]i, *Nature* 400, 891–894 (1999).
- Mochizuki, N., Yamashita, S., Kurokawa, K., Ohba, Y., Nagai, T., Miyawaki, A. & Matsuda, M. Spatio-temporal images of growth-factor-induced activation of Ras and Rap1, *Nature* 411, 1065–1068 (2001).
- Moodie, S.A., Paris, M., Villafranca, E., Kirshmeier, P., Willumsen, B.M. & Wolfman, A. Different structural requirements within the switch II region of the Ras protein for interactions with specific downstream targets, *Oncogene* 11, 447–454 (1995).
- Morrison, D.K. & Cutler, R.E. The complexity of Raf-1 regulation, *Current Opinion in Cell Biol* 9, 174–179 (1997).
- Mulder, K.M. Role of Ras and Mapks in TGFbeta signaling, *Cytokine Growth Factor Rev* 11, 23–35 (2000).
- Mullis, K.B. & Faloona, F.A. Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction, *Meth Enzymol* 155, 335–350 (1987).
- Mulsow, J.J.W., Watson, R.W.G., Fitzpatrick, J.M. & O'Connell, P.R. Transforming Growth Factor Promotes Pro-fibrotic Behavior by Serosal Fibroblasts via PKC and ERK1/2 Mitogen Activated Protein Kinase Cell Signaling, *Ann Surg* 242 (2005).
- Niemeyer, C.M., Kang, M.W., Shin, D.H., Furlan, I., Erlacher, M., Bunin, N.J., Bunda, S., Finklestein, J.Z., Sakamoto, K.M., Gorr, T.A., Mehta, P., Schmid, I., Kropshofer, G., Corbacioglu, S., Lang, P.J., Klein, C., Schlegel, P.-G., Heinzmann, A., Schneider, M., Stary, J., van den Heuvel-Eibrink, M.M., Hasle, H., Locatelli, F., Sakai, D., Archambeault, S., Chen, L., Russell, R.C., Sybingco, S.S., Ohh, M., Braun, B.S., Flotho, C. & Loh, M.L. Germline CBL mutations cause developmental abnormalities and predispose to juvenile myelomonocytic leukemia, *Nat Genet* 42, 794–800 (2010).
- Niihori, T., Aoki, Y., Narumi, Y., Neri, G., Cavé, H., Verloes, A., Okamoto, N., Hennekam, R.C.M., Gillessen-Kaesbach, G., Wiczorek, D., Kavamura, M.I., Kurosawa, K., Ohashi, H., Wilson, L., Heron, D., Bonneau, D., Corona, G., Kaname, T., Naritomi, K., Baumann, C., Matsumoto, N., Kato, K., Kure, S. &

- Matsubara, Y. Germline KRAS and BRAF mutations in cardio-facio-cutaneous syndrome, *Nat Genet* 38, 294–296 (2006).
- Niihori, T., Aoki, Y., Okamoto, N., Kurosawa, K., Ohashi, H., Mizuno, S., Kawame, H., Inazawa, J., Ohura, T., Arai, H., Nabatame, S., Kikuchi, K., Kuroki, Y., Miura, M., Tanaka, T., Ohtake, A., Omori, I., Ihara, K., Mabe, H., Watanabe, K., Niiijima, S., Okano, E., Numabe, H. & Matsubara, Y. HRAS mutants identified in Costello syndrome patients can induce cellular senescence: possible implications for the pathogenesis of Costello syndrome, *J Hum Genet* 56, 707–715 (2011).
- Noonan, J.A. Hypertelorism with Turner phenotype. A new syndrome with associated congenital heart disease., *Am J Dis Child* 116, 373–380 (1968).
- Noonan, J.A. und Ehmke, D.A. Associated noncardiac malformations in children with congenital heart disease., *J Pediatr*, 468–470 (1963).
- Nur-E-Kamal, M.S. & Maruta, H. The role of Gln61 and Glu63 of Ras GTPases in their activation by NF1 and Ras GAP, *Mol Biol Cell* 3, 1437–1442 (1992).
- Pace, A.M., Faure, M. & Bourne, H.R. Gi2-mediated activation of the MAP kinase cascade, *Mol Biol Cell* 6, 1685–1695 (1995).
- Pandit, B., Sarkozy, A., Pennacchio, L.A., Carta, C., Oishi, K., Martinelli, S., Pogna, E.A., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Landstrom, A., Bos, J.M., Ommen, S.R., Esposito, G., Lepri, F., Faul, C., Mundel, P., López Siguero, J.P., Tenconi, R., Selicorni, A., Rossi, C., Mazzanti, L., Torrente, I., Marino, B., Digilio, M.C., Zampino, G., Ackerman, M.J., Dallapiccola, B., Tartaglia, M. & Gelb, B.D. Gain-of-function RAF1 mutations cause Noonan and LEOPARD syndromes with hypertrophic cardiomyopathy, *Nat Genet* 39, 1007–1012 (2007).
- Pérez, B., Kosmider, O., Cassinat, B., Renneville, A., Lachenaud, J., Kaltenbach, S., Bertrand, Y., Baruchel, A., Chomienne, C., Fontenay, M., Preudhomme, C. & Cavé, H. Genetic typing of CBL, ASXL1, RUNX1, TET2 and JAK2 in juvenile myelomonocytic leukaemia reveals a genetic profile distinct from chronic myelomonocytic leukaemia, *Br J Haematol* 151, 460-468 (2010).
- Piehler, A.P., Ozcurummez, M. & Kaminski, W.E. A-Subclass ATP-Binding Cassette Proteins in Brain Lipid Homeostasis and Neurodegeneration, *Front Psychiatry* 3, 17 (2012).
- Pillas, D., Hoggart, C.J., Evans, D.M., O'Reilly, P.F., Sipilä, K., Lähdesmäki, R., Millwood, I.Y., Kaakinen, M., Netuveli, G., Blane, D., Charoen, P., Sovio, U., Pouta, A., Freimer, N., Hartikainen, A.-L., Laitinen, J., Vaara, S., Glaser, B., Crawford, P., Timpson, N.J., Ring, S.M., Deng, G., Zhang, W., McCarthy, M.I., Deloukas, P., Peltonen, L., Elliott, P., Coin, L.J.M., Smith, G.D. & Jarvelin, M.-R. Genome-Wide Association Study Reveals Multiple Loci Associated with Primary Tooth Development during Infancy, *PLoS Genet* 6, e1000856 (2010).
- Plaster, N.M., Tawil, R., Tristani-Firouzi, M., Canún, S., Bendahhou, S., Tsunoda, A., Donaldson, M.R., Iannaccone, S.T., Brunt, E., Barohn, R., Clark, J., Deymeer, F., George, A.L., JR., Fish, F.A., Hahn, A., Nitu, A., Ozdemir, C., Serdaroglu, P., Subramony, S.H., Wolfe, G., Fu, Y.-H. & Ptáček, L.J. Mutations in Kir2.1 Cause the Developmental and Episodic Electrical Phenotypes of Andersen's Syndrome, *Cell* 105, 511–519 (2001).
- Prickett, T.D., Agrawal, N.S., Wei, X., Yates, K.E., Lin, J.C., Wunderlich, J.R., Cronin, J.C., Cruz, P., Rosenberg, S.A. & Samuels, Y. Analysis of the tyrosine kinome in melanoma reveals recurrent mutations in ERBB4, *Nat Genet* 41, 1127–1132 (2009).

- Qi, M. & Elion, E.A. MAP kinase pathways, *J Cell Sci* 118, 3569–3572 (2005).
- Rassow, J. *Biochemie. 50 Tabellen*, Thieme, Stuttgart (2006).
- Rauen, K.A. HRAS and the Costello syndrome, *Clin Genet* 71, 101–108 (2007).
- Razzaque, M.A., Nishizawa, T., Komoike, Y., Yagi, H., Furutani, M., Amo, R., Kamisago, M., Momma, K., Katayama, H., Nakagawa, M., Fujiwara, Y., Matsushima, M., Mizuno, K., Tokuyama, M., Hirota, H., Muneuchi, J., Higashinakagawa, T. & Matsuoka, R. Germline gain-of-function mutations in RAF1 cause Noonan syndrome, *Nat Genet* 39, 1013–1017 (2007).
- Reynolds, J.F., Neri, G., Herrmann, J.P., Blumberg, B., Coldwell, J.G., Miles, P.V. & Opitz, J.M. New multiple congenital anomalies/mental retardation syndrome with cardio-facio-cutaneous involvement - the CFC syndrome, *Am J Med Genet* 25, 413–427 (1986).
- Roberts, A., Allanson, J., Jadico, S.K., Kavamura, M.I., Noonan, J., Opitz, J.M., Young, T. & Neri, G. The cardiofaciocutaneous syndrome, *J Med Genet* 43, 833–842 (2006).
- Roberts, A.E., Araki, T., Swanson, K.D., Montgomery, K.T., Schiripo, T.A., Joshi, V.A., Li, L., Yassin, Y., Tamburino, A.M., Neel, B.G. & Kucherlapati, R.S. Germline gain-of-function mutations in SOS1 cause Noonan syndrome, *Nat Genet* 39, 70–74 (2007).
- Rodriguez-Viciano, P., Tetsu, O., Tidyman, W.E., Estep, A.L., Conger, B.A., Cruz, M.S., McCormick, F. & Rauen, K.A. Germline Mutations in Genes Within the MAPK Pathway Cause Cardio-facio-cutaneous Syndrome, *Science* 311, 1287–1290 (2006a).
- Rodriguez-Viciano, P., Oses-Prieto, J., Burlingame, A., Fried, M. & McCormick, F. A phosphatase holoenzyme comprised of Shoc2/Sur8 and the catalytic subunit of PP1 functions as an M-Ras effector to modulate Raf activity, *Mol Cell* 22, 217–230 (2006b).
- Rosenberger, G., Meien, S. & Kutsche, K. Oncogenic HRAS mutations cause prolonged PI3K signaling in response to epidermal growth factor in fibroblasts of patients with Costello syndrome, *Hum Mutat* 30, 352–362 (2009).
- Ross, E.M. & Wilkie, T.M. GTPASE-ACTIVATING PROTEINS FOR HETEROTRIMERIC G PROTEINS: Regulators of G Protein Signaling (RGS) and RGS-Like Proteins, *Annu Rev Biochem* 69, 795–827 (2000).
- Rust, S., Rosier, M., Funke, H., Real, J., Amoura, Z., Piette, J.-C., Deleuze, J.-F., Brewer, H.B., Duverger, N., Deneffe, P. & Assmann, G. Tangier disease is caused by mutations in the gene encoding ATP-binding cassette transporter 1, *Nat Genet* 22, 352–355 (1999).
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci U S A* 74, 5463–5467 (1977).
- Sano, Y., Harada, J., Tashiro, S., Gotoh-Mandeville, R., Maekawa, T. & Ishii, S. ATF-2 Is a Common Nuclear Target of Smad and TAK1 Pathways in Transforming Growth Factor- Signaling, *J Biol Chem* 274, 8949–8957 (1999).
- Scheffzek, K., Ahmadian, M.R., Kabsch, W., Wiesmuller, L., Lautwein, A., Schmitz, F. & Wittinghofer, A. The Ras-RasGAP complex: structural basis for GTPase activation and its loss in oncogenic Ras mutants, *Science* 277, 333–338 (1997).

- Schollen, E., Matthijs, G., Gewillig, M., Fryns, J.-P. & Legius, E. PTPN11 mutation in a large family with Noonan syndrome and dizygous twinning, *Eur J Hum Genet* 11, 85–88 (2003).
- Schubbert, S., Zenker, M., Rowe, S.L., Böll, S., Klein, C., Bollag, G., van der Burgt, I., Musante, L., Kalscheuer, V., Wehner, L.-E., Nguyen, H., West, B., Zhang, K.Y.J., Siermans, E., Rauch, A., Niemeyer, C.M., Shannon, K. & Kratz, C.P. Germline KRAS mutations cause Noonan syndrome, *Nat Genet* 38, 331–336 (2006).
- Schubbert, S., Shannon, K. & Bollag, G. Hyperactive Ras in developmental disorders and cancer, *Nat Rev Cancer* 7, 295–308 (2007).
- Schulz, A., Albrecht, B., Arici, C., van der Burgt, I., Buske, A., Gillissen-Kaesbach, G., Heller, R., Horn, D., Hübner, C., Korenke, G., König, R., Kress, W., Krüger, G., Meinecke, P., Mücke, J., Plecko, B., Rossier, E., Schinzel, A., Schulze, A., Seemanova, E., Seidel, H., Spranger, S., Tuysuz, B., Uhrig, S., Wiczorek, D., Kutsche, K. & Zenker, M. Mutation and phenotypic spectrum in patients with cardio-facio-cutaneous and Costello syndrome, *Clin Genet* 73, 62–70 (2008).
- Selfors, L.M., Schutzman, J.L., Borland, C.Z. & Stern, M.J. soc-2 encodes a leucine-rich repeat protein implicated in fibroblast growth factor receptor signaling, *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6903–6908 (1998).
- Shin, I., Kim, S., Song, H., Kim, H.-R.C. & Moon, A. H-Ras-specific Activation of Rac-MKK3/6-p38 Pathway, *J Biol Chem* 280, 14675–14683 (2005).
- Shulenin, S., Noguee, L.M., Annilo, T., Wert, S.E., Whitsett, J.A. & Dean, M. ABCA3 Gene Mutations in Newborns with Fatal Surfactant Deficiency, *N Eng J Med* 350, 1296–1303 (2004).
- Sieburth, D.S., Sun, Q. & Han, M. SUR-8, a Conserved Ras-Binding Protein with Leucine-Rich Repeats, Positively Regulates Ras-Mediated Signaling in *C. elegans*, *Cell* 94, 119–130 (1998).
- Sim ek-Kiper, P., Alanay, Y., Gülhan, B., Lissewski, C., Türkyılmaz, D., Alehan, D., Cetin, M., Utine, G., Zenker, M., Boduro lu, K. Clinical and molecular analysis of RASopathies in a group of Turkish patients, *Clin Genet* 83, 181-186 (2012).
- Smith, H.O. & Birnstiel, M.L. A simple method for DNA restriction site mapping, *Nucleic Acids Res* 3, 2387–2398 (1976).
- Sondermann, H., Soisson, S.M., Boykevisch, S., Yang, S.-S., Bar-Sagi, D. & Kuriyan, J. Structural analysis of autoinhibition in the Ras activator Son of sevenless, *Cell* 119, 393–405 (2004).
- Sot, B., Kotting, C., Deaconescu, D., Suveyzdis, Y., Gerwert, K. & Wittinghofer, A. Unravelling the mechanism of dual-specificity GAPs, *EMBO J* 29, 1205–1214 (2010).
- Stacey, D.W., Feig, L.A. & Gibbs, J.B. Dominant inhibitory Ras mutants selectively inhibit the activity of either cellular or oncogenic Ras, *Mol Cell Biol* 11, 4053–4064 (1991).
- Stein, B., Brady, H., Yang, M.X., Young, D.B. & Barbosa, M.S. Cloning and Characterization of MEK6, a Novel Member of the Mitogen-activated Protein Kinase Kinase Cascade, *J Biol Chem* 271, 11427–11433 (1996).
- Stieglitz, B., Bee, C., Schwarz, D., Yildiz, Ö., Moshnikova, A., Khokhlatchev, A. & Herrmann, C. Novel type of Ras effector interaction established between tumour suppressor NORE1A and Ras switch II, *EMBO J* 27, 1995–2005 (2008).

- Sun, M., Li, N., Dong, W., Chen, Z., Liu, Q., Xu, Y., He, G., Shi, Y., Li, X., Hao, J., Luo, Y., Shang, D., Lv, D., Ma, F., Zhang, D., Hua, R., Lu, C., Wen, Y., Cao, L., Irvine, A.D., McLean, W.H.I., Dong, Q., Wang, M.-R., Yu, J., He, L., Lo, W.H.Y. & Zhang, X. Copy-number mutations on chromosome 17q24.2-q24.3 in congenital generalized hypertrichosis terminalis with or without gingival hyperplasia, *Am J Hum Genet* 84, 807–813 (2009).
- Tartaglia, M., Mehler, E.L., Goldberg, R., Zampino, G., Brunner, H.G., Kremer, H., van der Burgt, I., Crosby, A.H., Ion, A., Jeffery, S., Kalidas, K., Patton, M.A., Kucherlapati, R.S. & Gelb, B.D. Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome, *Nat Genet* 29, 465–468 (2001).
- Tartaglia, M., Pennacchio, L.A., Zhao, C., Yadav, K.K., Fodale, V., Sarkozy, A., Pandit, B., Oishi, K., Martinelli, S., Schackwitz, W., Ustaszewska, A., Martin, J., Bristow, J., Carta, C., Lepri, F., Neri, C., Vasta, I., Gibson, K., Curry, C.J., Sigüero, J.P.L., Digilio, M.C., Zampino, G., Dallapiccola, B., Bar-Sagi, D. & Gelb, B.D. Gain-of-function SOS1 mutations cause a distinctive form of Noonan syndrome, *Nat Genet* 39, 75–79 (2007).
- Tartaglia, M., Zampino, G. & Gelb, B.D. Noonan syndrome: clinical aspects and molecular pathogenesis, *Mol Syndromol* 1, 2–26 (2010).
- Tartaglia, M., Gelb, B.D. & Zenker, M. Noonan syndrome and clinically related disorders, *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab* 25, 161–179 (2011).
- Tawil, R., L.J., Pavlakis, S.G., DeVivo, D.C., Penn, A.S., Ozdemir, C. & Griggs, R.C. Andersen's syndrome: potassium-sensitive periodic paralysis, ventricular ectopy, and dysmorphic features, *Ann Neurol* 35, 326-330 (1994).
- The Technology behind TOPO® Cloning. Available at <http://de-de.invitrogen.com/site/de/de/home/brands/Product-Brand/topo/The-Technology-Behind-TOPO-Cloning.html>, 10.07.2012.
- Tidyman, W.E. & Rauen, K.A. The RASopathies: developmental syndromes of Ras/MAPK pathway dysregulation. Genetics of disease, *Curr Opin Genet Dev* 19, 230–236 (2009).
- Tosti, A. & Piraccini, B.M. Loose Anagen Hair Syndrome and Loose Anagen Hair, *Arch Dermatol* 138, 521–522 (2002).
- Tristani-Firouzi, M. & Etheridge, S. Kir 2.1 channelopathies: the Andersen–Tawil syndrome, *Pflugers Arch Eur J Phys* 460, 289-294 (2010).
- Vetter, I.R. & Wittinghofer, A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions, *Science* 294, 1299–1304 (2001).
- Vidal, V.P.I., Chaboissier, M.-C., Lützkendorf, S., Cotsarelis, G., Mill, P., Hui, C.-C., Ortonne, N., Ortonne, J.-P. & Schedl, A. Sox9 Is Essential for Outer Root Sheath Differentiation and the Formation of the Hair Stem Cell Compartment, *Curr Biol* 15, 1340–1351 (2005).
- Viskochil, D., Buchberg, A.M., Xu, G., Cawthon, R.M., Stevens, J., Wolff, R.K., Culver, M., Carey, J.C., Copeland, N.G., Jenkins, N.A., White, R. & O'Connell, P. Deletions and a translocation interrupt a cloned gene at the neurofibromatosis type 1 locus, *Cell* 62, 187–192 (1990).
- Wagner, T., Wirth, J., Meyer, J., Zabel, B., Held, M., Zimmer, J., Pasantes, J., Bricarelli, F., Keutel, J., Hustert, E., Wolf, U., Tommerup, N., Schempp, W. & Scherer, G. Autosomal sex reversal and campomelic dysplasia are caused by mutations in and around the SRY-related gene SOX9, *Cell* 79, 1111–1120 (1994).

- Wallace, M.R., Marchuk, D.A., Andersen, L.B., Letcher, R., Odeh, H.M., Saulino, A.M., Fountain, J.W., Brereton, A., Nicholson, J. & Mitchell, A.L. Type 1 neurofibromatosis gene: identification of a large transcript disrupted in three NF1 patients, *Science* 249, 181–186 (1990).
- Xiao, S., Bu, L., Zhu, L., Zheng, G., Yang, M., Qian, M., Hu, L., Liu, J., Zhao, G. & Kong, X. A new locus for hereditary gingival fibromatosis (GINGF2) maps to 5q13-q22, *Genomics* 74, 180–185 (2001).
- Ye, X., Shi, L., Cheng, Y., Peng, Q., Huang, S., Liu, J., Huang, M., Peng, B. & Bian, Z. A novel locus for autosomal dominant hereditary gingival fibromatosis, GINGF3, maps to chromosome 2p22.3-p23.3, *Clin Genet* 68, 239–244 (2005).
- Zampino, G., Pantaleoni, F., Carta, C., Cobellis, G., Vasta, I., Neri, C., Pogna, E.A., Feo, E. de, Delogu, A., Sarkozy, A., Atzeri, F., Selicorni, A., Rauen, K.A., Cytrynbaum, C.S., Weksberg, R., Dallapiccola, B., Ballabio, A., Gelb, B.D., Neri, G. & Tartaglia, M. Diversity, parental germline origin, and phenotypic spectrum of de novo HRAS missense changes in Costello syndrome, *Hum Mutat* 28, 265–272 (2007).
- Zarubin, T. & Han, J. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway, *Cell Res* 15, 11–18 (2005).
- Zenker, M. Genetic and Pathogenetic Aspects of Noonan Syndrome and Related Disorders, *Horm Res* 72, 57–63 (2009).
- Zenker, M. Clinical manifestations of mutations in RAS and related intracellular signal transduction factors, *Curr Opin Pediatr* 23, 443-51 (2011).
- Zhou, J., Meng, L., Ye, X., den Hoff, J. von & Bian, Z. Increased expression of integrin 2 and abnormal response to TGF- 1 in hereditary gingival fibromatosis, *Oral Dis* 15, 414–421 (2009).

Publikationen und Präsentationen

Lorenz, S., Bartholdi, D., Ceylaner, S., Goecke, T.O., Korenke, G.C., Luckner, D., Morlot, M., Tartaglia, M., Zenker, M., Kutsche, K. (2009) *SHOC2* – ein neues Krankheitsgen für einen relativ homogenen Phänotyp aus dem Formenkreis der neuro-kardio-fazio-kutanen Syndrome, *Abstract zum Vortrag beim Treffen Norddeutscher Humangenetiker, 07.11.2009, Greifswald.*

Lemke, J., Held, C., **Lorenz, S.**, Kutsche, K., Zenker, M., Rossier, E., Grasshoff, U., Walter, M., Dufke, A., Bonin, M., Rieß, O. (2009) A de novo 1q42 microdeletion of 1.17 Mb in a patient with a phenotype out of the neuro-cardio-facio-cutaneous spectrum disorders, *Abstract zur Posterpräsentation beim 2nd Annual Meeting of NGFN-Plus and NGFN-Transfer in the Program of Medical Genome Research, 26.-28.11.2009 in Berlin.*

Lorenz, S., Bartholdi, D., Ceylaner, S., Goecke, T.O., Korenke, G.C., Luckner, D., *SHOC2* cause a homogeneous phenotype out of the neuro-cardio-facio-cutaneous syndrome spectrum, *Abstract zum Vortrag bei der 21. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, 02.-04.03.2010, Hamburg.*

Lorenz, S., Petersen, C., Kordaß, U., Seidel, H., Zenker, M., Kutsche, K. (2012) Two cases with severe lethal course of Costello syndrome associated with HRAS p.G12C and p.G12D, *European Journal of Medical Genetics* 55 (11), 615-619.

Lorenz, S., Lißewski, C., Sim ek-Kiper, P.O., Alanay, Y., Boduroglu, K., Zenker, M., Rosenberger, G. (2013) Functional analysis of a duplication (p.E63_D69dup) in the switch II region of HRAS: new aspects of the molecular pathogenesis underlying Costello syndrome, *Human Molecular Genetics* 22 (8) 1643-1653.

Danksagung

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Eidesstattliche Erklärung

Ich versichere ausdrücklich, dass ich die Arbeit selbständig und ohne fremde Hilfe verfasst, andere als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel nicht benutzt und die aus den benutzten Werken wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen einzeln nach Ausgabe (Auflage und Jahr des Erscheinens), Band und Seite des benutzten Werkes kenntlich gemacht habe.

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

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

Unterschrift:  _____
Sybille Lorenz