UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin

Institut für Humangenetik

Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Gal

Molekulargenetische Analysen bei Patienten mit Kleinhirnfehlbildungen: Sequenzanalyse der Gene *SHH*, *CNPY1*, *EN2* und *PFN1*

Dissertation

Zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

Der Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

vorgelegt von:

Semira Devecioglu

aus Berlin

Hamburg 2013

Angenommen von der Medizinischen Fakultät am: 23.06.2014

Veröffentlichung mit Genehmigung der medizinischen Fakultät der Universität Hamburg

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

Prüfungsausschuss, 2. Gutachter/in: PD Dr. Chris Mühlhausen

Prüfungsausschuss, 3. Gutachter/in: Prof Dr. Roland Bender

Inhaltsverzeichnis

1 Arbeitshypothese und Fragestellung	1
2 Einleitung	2
2.1 Entwicklung des Kleinhirns	2
2.2 Kleinhirnentwicklungsstörungen	6
2.2.1 Spektrum der Dandy-Walker-Malformation	6
2.2.1.1 Dandy-Walker-Malformation	
2.2.2 Lissenzephalie mit zerebellärer Hypoplasie	
2.3 Drei positionelle und funktionelle Kandidatengene	ür DWM auf
Chromosom 7	
2.3.1 Sonic hedgehog (SHH)	
2.3.2 <i>Canopy I (CNPY1)</i>	
2.3.3 Engrailed 2 (EN2)	
2.4 <i>Profilin 1 (PFN1)</i>	
3 Material & Methoden	20
	_ 0
3.1 Material	
3.1.1 Patienten	
3.1.1.1 Patientenkollektiv für die Gene CNPY1, SHH	und EN2 20
3.1.1.2 Patientenkollektiv für das <i>PFN1</i> -Gen	
3.1.2 Materialien für molekularbiologische Methoden	
3.1.2.1 PCR-Puffer	
3.1.2.2 Puffer und Lösungen	
3.1.2.3 PCR-Primer für die Mutationsanalyse der Ge	ne CNPY1, SHH, EN2 und
PFN1	
3.1.2.4 Materialien zur Genom-Amplifikation von ge	nomischer DNA 23
3.1.2.5 Enzyme und Nukleinsäuren	
3.1.3 Chemikalien und Lösungsmittel	
3.1.4 Geräte	
3.1.5 Verbrauchsmaterialien	
3.1.6 Hardware	
3.1.7 Software	
3.2 Methoden	
3.2.1 Amplifikation genomischer DNA	
3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)	
3.2.2.1 Touchdown-PCR	

	3.2.2.2	Multiplex PCR-Kit	30
	3.2.2.3	PCR-Bedingungen	31
3	.2.3 Agar	ose-Gelelektrophorese	32
3	.2.4 Aufr	einigung der PCR-Produkte	33
3	.2.5 DNA	-Sequenzierung	33
3	.2.6 Ausv	vertung	35
		C	
Λ	Frachni		36
-	Ligeon		
4.1	Mutati	onsanalyse von drei Kandidatengenen für DWM in 7ɑ36.3 bei	
	Patient	en mit Kleinhirnveränderungen	36
4	.1.1 Muta	tionsanalyse des SHH-Gens	36
	4.1.1.1	PCR-Amplifikation sämtlicher Exons des SHH-Gens	36
	4.1.1.2	DNA-Sequenzanalyse des <i>SHH</i> -Gens	
	4.1.1.2.1	Häufigkeiten der gefundenen Seguenzvarianten im <i>SHH</i> -Gen	
	4.1.1.2.2	<i>In-silico</i> -Analyse der Sequenzveränderungen im <i>SHH</i> -Gen	
4	.1.2 Muta	tionsanalyse des CNPY1-Gens	42
	4.1.2.1	PCR-Amplifikation sämtlicher Exons des CNPY1-Gens	42
	4.1.2.2	DNA-Sequenzanalyse des <i>CNPY1</i> -Gens	42
	4.1.2.2.1	Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im <i>CNPY1</i> -Gen	43
	4.1.2.2.2	In-silico-Analyse der Sequenzveränderungen im CNPY1-Gen	44
4	.1.3 Muta	tionsanalyse des EN2-Gens	46
	4.1.3.1	PCR-Amplifikation sämtlicher Exons des EN2-Gens	46
	4.1.3.2	DNA-Sequenzanalyse des EN2-Gens	46
	4.1.3.2.1	Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im EN2-Gen	47
	4.1.3.2.2	In-silico-Analyse der Sequenzveränderungen im EN2-Gen	48
12	Mutati	onconalyza von DENI	50
4. 2		Amplification sömtlicher Exons des DENI Cons	50 50
4	2.1 FCK	Sequenzanelyse des <i>DENL</i> Cons	50
4	4.2.2 DNA	-Sequenzanaryse des <i>PFNI</i> -Gens	JI
	4.2.2.1	Haufigkeiten der gerundenen Sequenzvarianten im <i>PFNI</i> -Gen	51
	4.2.2.2	In-sulico-Analyse der Sequenzveranderungen im PFNI-Gen	52
5	Diskuss	ion	53
6	Zusamr	nenfassung	61
7	Anhana	T. C.	63
'	Aimang	, ••••••••••••••••••••••••••••••••••••	05
0			
8	Abkúrz	ungsverzeichnis	6 7
9	Literatı	ırverzeichnis	70
10	Danksa	gung	79

11	Eidesstattliche Erklärung	.8	0
----	---------------------------	----	---

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 2.1: Schematische Darstellung der Kleinhirnbildung (links dorso-lateral,
rechts dorsal)
Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Kleinhirn-Neurogenese (parasagittale
Schnittebene durch die Mesencephalon/Rhombencephalon-Region) 4
Abbildung 2.3: Entwicklung der Kleinhirnrinde
Abbildung 2.4: Sagittales MRT eines Patienten mit Dandy-Walker-Malformation 7
Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Wildtyp- und rearrangierten
Chromosomen der 4;7-Translokation11
Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion 7q36.3 mit dort
lokalisierten Genen12
Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des SHH-Signalweges 14
Abbildung 4.1: Darstellung eines Agarosegels nach Färbung mit Ethidiumbromid mit
unterschiedlich großen PCR-Produkten der drei Exons des SHH-Gens
Abbildung 4.2: Darstellung eines Agarosegels nach Färbung in Ethidiumbromid mit
unterschiedlich großen PCR-Produkten der vier Exons des CNPY1-Gens
Abbildung 4.3: Darstellung eines Agarosegels nach Färbung mit Ethidiumbromid mit
unterschiedlich großen PCR-Produkten der zwei Exons des EN2-Gens 46
Abbildung 4.4: Darstellung eines Agarosegels nach Färbung mit Ethidiumbromid mit
unterschiedlich großen PCR-Produkten der drei Exons des PFN1-Gens 50

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1: PCR-Primer für die Mutationsanalyse des CNPY1-Gens	22
Tabelle 3.2: PCR-Primer für die Mutationsanalyse des SHH-Gens	22
Tabelle 3.3: PCR-Primer für die Mutationsanalyse des EN2-Gens	22
Tabelle 3.4: PCR-Primer f	23
Tabelle 3.5: Chemikalien und Lösungsmittel	24
Tabelle 3.6: Geräte	25
Tabelle 3.7: Verbrauchsmaterialien	25
Tabelle 3.8: Hardware	26
Tabelle 3.9: Software	26
Tabelle 3.10: PCR-Bedingungen der einzelnen Exons von CNPY1	31
Tabelle 3.11: PCR-Bedingungen der einzelnen Exons von EN2	31
Tabelle 3.12: PCR-Bedingungen der einzelnen Exons von SHH.	31
Tabelle 3.13: PCR-Bedingungen der einzelnen Exons von PFN1	32
Tabelle 4.1: Identifizierte Sequenzvarianten im SHH-Gen bei 33 untersuchten	
Patienten	37
Tabelle 4.2: Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im SHH-Gen; Vergleich	
der Allelhäufigkeit in der Normalbevölkerung und der untersuchten	
Patientenkohorte	38

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Untersuchung auf Spleißstellenveränderung im SHH-Gen
durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme. 39
Tabelle 4.4: Ergebnisse der Untersuchung auf Funktionsänderung und
Strukturveränderung im SHH-Gen durch die gefundenen Sequenzveränderungen
mittels verschiedener Programme
Tabelle 4.5: Identifizierte Sequenzvarianten im <i>CNPY1</i> -Gen bei 33 untersuchten
Patienten
Tabelle 4.6: Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im <i>CNPY1</i> -Gen; Vergleich
der Allelhäufigkeit in der Normalbevölkerung und der untersuchten
Patientenkohorte
Tabelle 4.7: Ergebnisse der Untersuchung auf Spleißstellenveränderung im CNPY1-Gen
durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme. 45
Tabelle 4.8: Ergebnisse der Untersuchung auf Funktionsänderung und
Strukturveränderung im CNPY1-Gen durch die gefundenen Sequenzveränderungen
mittels verschiedener Programme 45
Tabelle 4.9: Identifizierte Sequenzvarianten im EN2-Gen bei 33 untersuchten
Patienten
Tabelle 4.10: Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im EN2-Gen; Vergleich
der Allelhäufigkeit in der Normalbevölkerung und der untersuchten
Patientenkohorte
Tabelle 4.11: Ergebnisse der Untersuchung auf Spleißstellenveränderung im EN2-Gen
durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme . 49
Tabelle 4.12: Ergebnisse der Untersuchung auf Funktionsänderung und
Strukturveränderung im EN2-Gen durch die gefundenen Sequenzveränderungen
mittels verschiedener Programme 49
Tabelle 4.13: Identifizierte Sequenzvarianten im PFN1-Gen bei 55 untersuchten
Patienten
Tabelle 4.14: Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im PFN1-Gen; Vergleich
der Allelhäufigkeit in der Normalbevölkerung und der untersuchten
Patientenkohorte
Tabelle 4.15: Ergebnisse der Untersuchung auf Spleißstellenveränderung im PFN1-Gen
durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme . 52
Tabelle 7.1: Aufzählung der einzelnen Veränderungen zu dem jeweiligen Patient und
Gen

1 Arbeitshypothese und Fragestellung

Die Feinkartierung chromosomaler Rearrangements dient der Identifizierung neuer Kandidatengene für Erkrankungen. Dabei wird u.a. vermutet, dass bei Patienten mit einer de novo Chromosomenaberration regulatorische Elemente von ihren Genen in der Nähe der Bruchstelle entfernt werden, daraus eine veränderte Expression der betroffenen Gene folgt (Positionseffekt) und dieses Ereigniss mit dem Krankheitsbild des Patienten zusammenhängt. In einer vorangegangenen Arbeit wurde bei einem Patienten eine de novo Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 4 und 7 festgestellt. Klinisch stellte sich der Patient unter anderem mit Kleinwuchs, autistischen Verhaltenszügen, Feinmotorikdefiziten, ataktischen Bewegungsmustern und verzögerter motorischer Entwicklung vor. In der Bildgebung mittels MRT zeigte sich eine milde Dandy-Walker-Malformation (DWM) mit Hypoplasie des Kleinhirnwurms. In einiger Entfernung zu der Translokationsstelle befinden sich die drei Gene SHH, CNPY1 und EN2, die mit der Kleinhirnentwicklung in Verbindung stehen. Es wurde ein möglicher Positionseffekt auf eines der drei Gene vermutet. In dieser Arbeit sollte ein Patientenkollektiv, bestehend aus Patienten mit kongenitalen Kleinhirnveränderungen, auf Sequenzveränderungen in den Genen SHH, CNPY1 und EN2 hin untersucht werden. Das Ziel dieser Arbeit war zu untersuchen, ob Mutationen in einem dieser Gene zur Ausprägung des Dandy-Walker-Phänotyps führen.

Bei Untersuchungen an Mäuseembryonen mit blockierter *Pfn1*-Expression im Gehirn zeigte sich eine Kleinhirnhypoplasie mit anormaler Organisation der Schichten des Kleinhirnkortex und verlagerten Kleinhirn-Körnerneuronen. Es konnte gezeigt werden, dass das Actin-bindende Protein Profilin1 (Pfn1) essentiell für die radiale Migration ist. Eine ähnliche Funktion von PFN1 wurde beim Menschen vermutet. Aufgrund dieser Vermutung sollte in dieser Arbeit ein Patientenkollektiv mit vergleichbarem Phänotyp auf Veränderungen im *PFN1*-Gen untersucht werden.

2 <u>Einleitung</u>

2.1 Entwicklung des Kleinhirns

Das Kleinhirn (Cerebellum) entsteht aus dem Metencephalon und entwickelt sich am Ende der Embryonalperiode (achte Schwangerschaftswoche) aus den oberen Rautenlippen. Die Rautenlippen sind ein Wulst, der in den vierten Ventrikel hineinragt und über das Rautengrubendach hinausgeht. Sie entstehen beim Einknicken des Rautenhirns zur Bildung der Flexura pontina (Brückenbeuge) (s. Abb. 2.1). Die Rautenlippen überwachsen durch Vergrößerung und Vereinigung in der Medianebene einen Teil des vierten Ventrikels und infolge der Vorwölbung nach außen überdecken sie bald Pons und Teile der Medulla oblongata. Verschiedene Faktoren induzieren und regulieren die Entstehung des Kleinhirns. Hierzu zählen der Transkriptionsfaktor EN2 und der Wachstumsfaktor FGF8, welche im Isthmusbereich gebildet werden (Moore und Persaud 2007). Der Isthmus ist eine Verengung am Übergang zwischen Mesencephalon und Rhombencephalon und zeichnet sich durch spezifische molekulare Aktivität aus. Er wird deshalb auch als Organisatorregion der Gehirnanlage bezeichnet (Moore und Persaud 2007).





1: extraventrikuläre Rautenlippe, 2: intraventrikuläre Rautenlippe, 3: unteres Ende des Rhombencephalon, 4: Mesencephalon, 5: rostrales Ende des Rhombencephalon, 6: Flügelplatte, 7: Sulcus limitans, 8: Grundplatte. Quelle: http://www.embryology.ch/allemand/vcns/tronc05.html

Ab der 12. embryonalen Woche kann das Kleinhirn in einen kleinen zentralen Abschnitt, den Vermis und zwei laterale Hemisphären unterteilt werden. Durch eine Querfurchung des Kleinhirns können der zentral unterhalb der Vermis liegende Nodulus und der lateral unterhalb der beiden Kleinhirnhemisphären liegende Flocculus abgetrennt werden. Im Laufe der Entwicklung des Kleinhirns werden noch viele weitere Querfurchen entstehen und die charakteristische Kleinhirn-Form bilden (Sadler 2008).

Das Kleinhirn kann in zwei funktionelle Teile gegliedert werden, dass Paleocerebellum und das Neocerebellum. Zudem kann man das Archicerebellum unterscheiden, welches den phylogenetisch ältesten Teil, den Lobus flocculonodularis, enthält. Der Lobus ist mit dem Vestibularisgebiet verbunden. Das Paleocerebellum umfasst anatomisch den Vermis und die medialen Hemisphären (Lobus anterior). Es reguliert die Haltung des Körpers durch Informationen aus den Gleichgewichtsorganen (Vestibulocerebellum). Zudem erhält das Paleocerebellum Impulse (Afferenzen) aus den Muskel- und Sehnenspindeln (Spinocerebellum). Bei Ausfall bzw. Störung während der Entwicklung des Paleocerebellum kann es zu Gleichgewichts- und Gangstörungen kommen (Ataxie). Das Neocerebellum beinhaltet anatomisch die lateralen Kleinhirnhemisphären (Lobus posterior). Es entsteht durch die Auffaltung und die Ausweitung des Kleinhirnwulstes. Das Neocerebellum wird durch motorische Impulse des zerebralen Cortex und des extrapyramidalen Systems parallel miterregt und steuert so die Feinmotorik der Hände und Füße. Ein Ausfall in dieser Region des Kleinhirns führt bei zielgerichteten Bewegungen zu Tremor (Intentionstremor) und zu Muskelstarre (Rigor) (Drews 2006).

Das Kleinhirn erhält seine Informationen aus anderen Teilen des Hirns über Axone, welche durch drei Kleinhirnstiele in das Kleinhirn gelangen. Die Afferenzen aus den Gleichgewichtsorganen laufen über die unteren Kleinhirnstiele (Pedunculi cerebelaris inferiores) in das Paleocerebellum. Die Afferenzen aus dem Rückenmark gelangen über die oberen und unteren Kleinhirnstiele in das Paleocerebellum. Über die mittleren Kleinhirnstiele dringen die Afferenzen des zerebralen Kortex und des extrapyramidalen Systems in das Neocerebellum. Die Impulse aus dem Kleinhirn heraus (Efferenzen) laufen über die unteren und oberen Kleinhirnstiele (Drews 2006, O'Rahilly und Müller 1999).

Die Entwicklung der Kleinhirnrinde entspringt histologisch dem Neuralepithel der oberen Rautenlippe. Die Kleinhirnplatte besteht von innen nach außen aus der Matrix-, Mantel- und Marginalzone. Aus diesen Schichten entwickelt sich die Kleinhirnrinde. Der Kleinhirnkortex entsteht durch einen komplexen Migrationsprozess, an dem viele verschiedene Faktoren mitwirken. Die Kleinhirnneuronen werden von zwei anatomisch und molekular unterschiedlichen Vorläuferzonen gebildet, der Ventrikularzone und der Rautenlippe (Miller und Gleeson 2008). Die Ventrikularzone des Kleinhirns exprimiert

den Transkriptionsfaktor Ptf1a (s. Abb. 2.2). Dies führt zur Beendigung des Zellzyklus der Vorläuferzellen. Die neudifferenzierten Neurone, einschließlich der Purkinje-Zellen, verlassen die Ventrikularzone und wandern (migrieren) radial in die sich entwickelnde Kleinhirnanlage. Sie bilden unter anderem die innere Körnerzellschicht des Kleinhirns. Die Rautenlippe dagegen exprimiert den Transkriptionsfaktor Math1+, der durch Signale der Deckplatte induziert wird. Die Deckplatte selbst entwickelt sich später zum Plexus choroideus. Durch die Expression von Math1+ kommt es zur Auswanderung der Vorläuferzellen aus der Rautenlippe. Die frühen Vorläuferzellen wandern innerhalb des rostralen Wanderungstromes tangential an der Oberfläche der Kleinhirnanlage entlang. Aus dem rostralen Wanderungsstrom bilden sich die tiefen glutamatergen Kleinhirnkerne, die im späteren Verlauf in die Kernzone auswandern. Aus den Zellen der Rautenlippe entstehen ebenfalls Körnerzellen, welche die äußere Körnerzellschicht des Kleinhirns bilden. Die Zellen der äußeren Körnerschicht proliferieren, im Gegensatz Zellen. die zu den der Ventrikularzone entspringen, weiterhin. Die Körnervorläuferzellen der äußeren Körnerschicht werden durch ein SHH-Signal, das sie von den unterliegenden Purkinjezellen erhalten, zur Proliferation angeregt. Die unipolaren Bürstenzellen entspringen ebenfalls der Rautenlippe (Miller und Gleeson 2008).



Abbildung 2.2: Schematische Darstellung der Kleinhirn-Neurogenese (parasagittale Schnittebene durch die Mesencephalon/Rhombencephalon-Region)

VZ: Ventrikularzone, ntz: Kernzone, RLS: rostrale Wanderungsströmung, RL: Rautenlippe, rp: Deckplatte, CPe: Plexus choroideus, GC: Körnerzellen, UBC: unipolare Bürstenzellen, Ptfa+ und Math1+: Transkriptionsfaktoren, blau: Spitze der Rautenlippe, rot: Ventrikularzone mit Ptf1a+ Expression, blaue Punkte: Körnerzellen, blaue Pfeile: Strömungsrichtung der Körnerzellen. Quelle: Millen und Gleeson 2008 Bei der Migration der Körnerzellen unterscheidet man die tangentiale Migration von der radialen Migration (Chédotal 2010). Die radiale Migration führt entlang von Leitstrukturen wie der radialen Glia. Bei der tangentialen Migration laufen die neuralen Vorläuferzellen aneinander entlang und bilden sich fortbewegende Ströme (Guerrini et al. 2008). Beide Prozesse können zeitgleich vorkommen oder sich abwechseln. Aus der inneren Matrixzone wandern die entstandenen Neurone in die Intermediärzone aus und bilden die innere Körnerzellschicht (s. Abb. 2.3). Daraufhin kommt es zur Auswanderung von Purkinje-Zellen und noch teilungsfähigen Neuralepithelzellen aus der inneren Matrixzone. Diese Zellen wandern an Stützzellen (Radiärfasern) entlang nach außen. Die Purkinje-Zellen sind durch ein Axon mit den Neuronen der zentralen Kleinhirnkerne verbunden und bilden eine Purkinje-Zellschicht oberhalb der zentralen Kerne. Etwa in der 25. embryonalen Woche wandern Körnerzellen aus der äußeren Körnerschicht in Richtung der inneren Körnerschicht. Es kommt zur Umkehrung der Wachstumsrichtung (Eversion des Kleinhirns). Dadurch bilden sich Verbindungen zwischen den beiden Körnerschichten.



Abbildung 2.3: Entwicklung der Kleinhirnrinde

VZ: Ventrikelzone (innere Matrixzone), IZ: Intermediärzone, ML: Molekularschicht, WM: weiße Substanz, IGL: innere Körnerschicht, PCL: Purkinjezellschicht, EGL: äußere Körnerschicht. Quelle: http://www.embryology.ch/francais/vcns/encephale05.html

2.2 Kleinhirnentwicklungsstörungen

Angeborene Fehlbildungen des zentralen Nervensystems (ZNS) kommen aufgrund der komplexen Prozesse während der Embryonalentwicklung des Gehirns relativ häufig vor. Sie finden sich bei ca. 3 von 1000 Geburten (Moore und Persaud 2007) und stellen etwa 10% aller Fehlbildungen dar (O'Rahilly und Müller 1999). Ursachen für Fehlbildungen können teratogene Substanzen oder pränatale Infektionen, aber auch genetische Defekte sein (Schiebler et al. 2002). Sie können direkt die Morphogenese oder Histogenese des ZNS stören oder durch Entwicklungsstörung angrenzender Strukturen (Chorda dorsalis, Somiten, Mesenchym) indirekt zu Fehlbildungen führen. Zu den Fehlbildungen des Kleinhirns gehören Veränderungen der Vermis, einer Kleinhirnhemisphäre oder des ganzen Organs. Hierbei unterscheidet man das vollständige Fehlen (Agenesie), die Nichtausbildung trotz vorhandener Anlage (Aplasie) und eine nicht vollständige bzw. zu kleine Ausbildung (Hypoplasie) voneinander.

2.2.1 Spektrum der Dandy-Walker-Malformation

Die Dandy-Walker-Malformation (DWM) ist die häufigste kongenitale Kleinhirn-Malformation des Menschen und wurde das erste Mal 1914 von Dandy und Blackfan beschrieben (Dandy und Blackfan 1914). Sie tritt bei ca. 1 von 5000 Lebendgeburten auf (Parisi und Dobyns 2003). Die wichtigsten charakteristischen Merkmale der DWM sind eine zystische Erweiterung des vierten Ventrikels, eine komplette oder partielle Agenesie des Kleinhirnwurms und eine vergrößerte retrozerebelläre Zyste (Hart et al. 1972) (s. Abb. 2.4). Klinisch ist die DWM oft mit milder bis schwerer Ataxie und Entwicklungsverzögerung assoziiert (Blank et al. 2011). Dies ist die klassische Form des Dandy-Walker-Syndroms.



Abbildung 2.4: Sagittales MRT eines Patienten mit Dandy-Walker-Malformation

Im Gegensatz zur klassischen Ausprägung gibt es weniger schwere Formen der Dandy-Walker-Malformation (DWM) (Wakeling et al. 2002). Wenn noch ein Rest des Kleinhirnwurms vorhanden oder die hintere Schädelgrube nicht vergrößert ist, spricht man von einer Dandy-Walker-Variante (DWV) (Bragg et al. 2006). Die klassische Form der DWM stellt das schwere Ende des Spektrums dar. Das Spektrum der DWM ist ein Kontinuum kongenitaler Anomalien. Embryopathologische Gemeinsamkeiten aller Fehlbildungen dieses Spektrums sind eine abnorme Ausbildung des Kleinhirns und des vierten Ventrikels. Zu diesem Kontinuum werden die DWM, die DWV, die Blakes-Beutel-Zyste und die Mega zisterna magna gezählt (Warf et al. 2011). Die Grenzen zwischen den einzelnen Fehlbildungen sind unscharf.

Es werden Varianten beschrieben, bei denen ein Teil des Kleinhirnwurms vorhanden ist und die hintere Schädelgrube nicht vergrößert ist. Die Ätiologien der DWM und der DWV sind heterogen (Wakeling et al. 2002; Ecker et al. 2000). Bei Fehlbildungen aus diesem Spektrum ist ein Hydrozephalus oft begleitend vorhanden und ist charakteristisch für die DWM (Warf et al. 2011). Die DWM und die DWV sind oft mit weiteren Fehlbildungen assoziiert, speziell mit Fehlbildungen des zentralen Nervensystems (Russ et al. 1989; Hirsch et al. 1984). Die am häufigsten assoziierten extrakraniellen Malformationen sind Herzdefekte und Gesichtsanomalien (Ecker et al. 2000). Ebenfalls wurde die DWM als klinisches Merkmal bei verschiedenen Chromosomenaberrationen beobachtet (Imataka et al. 2007, Estroff et al. 1992, Murru et al. 2002). Es existieren weitere Anomalien und Symptome, die gehäuft mit der DWM assoziiert auftreten, wie z.B.

Der Patient zeigt eine Vermis-Hypoplasie mit Rotation des Kleinhirnwurms gegen den Uhrzeigersinn, angehobenes Tentorium (Pfeil), Erweiterung des 4. Ventrikels (*) und vergrößerter retrocerebellärer Zyste (**). Quelle: Zanni et al. 2011.

ein Hydrozephalus, eine Agenesie des Corpus callosum, visuelle Defizite, Epilepsie und Intelligenzminderung (Grinberg et al. 2004).

2.2.1.1 Dandy-Walker-Malformation

Es konnte bisher noch nicht geklärt werden wie die DWM verursacht bzw. vererbt wird; es finden sich abweichende Erklärungen. In verschiedenen Studien wird über familiär gehäuft vorkommende DWM/DWV berichtet. Auf Grundlage dieser Fallberichte kann eine autosomal-rezessive (Bragg et al. 2006) oder X-chromosomale Vererbung (Wakeling et al. 2002) möglich sein. Allerdings konnte bis heute noch kein Ort auf dem X-Chromosom für eine isolierte DWM/DWV identifiziert werden (Bragg et al. 2006). Die niedrige Rate an familiär vorkommender DWM lässt vermuten, dass die DWM polygen verursacht wird (Blank et al. 2011). Ein Hinweis auf die Beteiligung von genetischen Faktoren ist u.a. die Beobachtung, dass die DWM bei verschiedenen Syndromen mit chromosomalen Anomalien auftritt (Imataka et al. 2007). Es wurden bereits verschiedene Gene mit der DWM/DWV in Verbindung gebracht, sie werden im Folgenden näher erläutert.

In einer Untersuchung an acht Patienten mit isolierter DWM konnte eine de novo Deletion auf Chromosom 3 festgestellt werden (Grinberg et al. 2004). Alle acht Patienten hatten kognitive Defizite; drei von ihnen zusätzlich einen Hydrozephalus. Die Deletionen der einzelnen Patienten waren unterschiedlich groß und lagen zwischen 3q22.2 und 3q25.33. Grinberg et al. (2004) konnten aus der Schnittmenge der Deletionen einen 7 Mb großen Bereich zwischen 3q24 und 3q25.1 als DWM kritische Region identifizieren. Diese Region enthält die Gene ZIC1 und ZIC4, die als Kandidatengene für DWM angenommen wurden. Bei der Überprüfung dieser These an heterozygoten Zic^{+/-};Zic4^{+/-} Doppel-Knockout-Mäusen konnten Grinberg et al. (2004) zeigen, dass 15% dieser Tiere die gleiche Kleinhirnmorphologie aufwiesen, wie die Patienten mit DWM und Deletion in 3q. Somit ist der Grund für die DWM bei den untersuchten Patienten vermutlich die Deletion in 3q24-q25.1 und der damit verbundene heterozygote Verlust von ZIC1 und ZIC4. Ein heterozygoter Verlust von $Zic1^{+/-}$ führte im Kleinhirn der Mäuse zu sehr geringen Veränderungen, bei heterozygoten $Zic4^{+/-}$ Mäusen konnte jedoch eine Kleinhirnhypoplasie festgestellt werden. Die Gene ZIC1 und ZIC4 gehören zur Familie der fünf ZIC-Gene. Sie werden in überlappenden Mustern während der Embryogenese exprimiert und kodieren für Transkriptionsfaktoren (Zink-Finger). Jedes der fünf Proteine ist in verschiedene Entwicklungsprozesse involviert, hierzu zählt auch die Kleinhirnentwicklung (Aruga et al. 2004; Grinberg et al. 2004).

In einer nachfolgenden Studie konnte gezeigt werden, dass es auch bei homozygotem Verlust von $Zic1^{-/-};Zic4^{-/-}$ zu einer Verringerung der Kleinhirngröße bei Mäusen kommt (Blank et al. 2011). Die Ursache für die festgestellte Kleinhirnhypoplasie ist laut Blank et al. (2011) eine verminderte postnatale Körnervorläuferzellproliferation. Die Proliferation der Körnervorläuferzellen wird von Zic1 und Zic4 beeinflusst und ist Shh abhängig. Blank et al. (2011) konnten zeigen, dass eine Verringerung der Shh Dosis in heterozygoten Zic1- und Zic4-Maus-Mutanten ($Zic1^{+/-};Zic4^{+/-}$) ebenfalls zu einer Verkleinerung der Kleinhirngröße und zu einer Veränderung der Shh-abhängigen Genexpression führt, wie bereits in homozygoten Zic1- und Zic4-Maus-Mutanten ($Zic1^{-/-};Zic4^{-/-}$) beobachtet. Zic1 und Zic4 werden zusätzlich für die Foliation des vorderen Kleinhirn-wurms benötigt (Blank et al. 2011).

Bei einer weiteren Studie an 18 Patienten mit DWM wurde eine 1,8 Mb große kritische Region für die DWM auf Chromosom 6 in p25.3 lokalisiert (Aldinger et al. 2009). Hierbei wurde beobachtet, dass Patienten mit einer großen Deletion (2 Mb) eine schwerere Ausprägung der DWM aufwiesen, als solche mit weniger großen Deletionen (450 kb). Aldinger et al. (2009) schlossen daraus, dass mehr als ein Gen in dieser Region an der Ausprägung der Erkrankung beteiligt ist. Das Gen *FOXC1* liegt in diesem Bereich und wird als Kandidatengen für DWM in Betracht gezogen. Die Untersuchung an Mäusen ergab, dass homozygote *Foxc1*-Mutanten (*Foxc1*^{-/-}) eine deutliche Kleinhirnmalformation aufweisen (Aldinger et al. 2009). Aldinger et al. (2009) vermuteten, dass der Verlust (oder der Zugewinn) von *FOXC1* zu einer Kleinhirnwurmhypoplasie führt und auch bei der Entstehung der schwerwiegenderen Phänotypen, wie Mega zisterna magna und DWM, mitwirkt.

Bei einem drei Jahre alten Mädchen mit schwerer Wachstumsretardierung, Krämpfen und der klassischen DWM wurde eine 2.3 Mb große *de novo* Deletion auf Chromosom 8 in p21.2-p21.3 festgestellt (Zanni et al. 2011). In diesem Bereich liegen 19 Gene. Eine Analyse der Genexpression von Lymphozyten und Fibroblasten zeigte eine merkliche Reduzierung von *FGF17*. Das Gen *FGF17* liegt 1 Mb proximal von der Deletion entfernt. Zanni et al. (2011) nahmen an, dass FGF17 einen kritischen Faktor während der Kleinhirnwurmentwicklung darstellt.

9

2.2.2 Lissenzephalie mit zerebellärer Hypoplasie

Die Lissenzephalien (LIS) sind eine Gruppe von kortikalen Malformationen, die durch Veränderung der neuronalen Migration entstehen (Ross et al. 2001). Diese Veränderungen resultieren klinisch in Intelligenzminderung, Epilepsie und in schwerwiegenden Fällen in einer reduzierten Lebenserwartung (Kumar et al. 2010). Die klassische Lissenzephalie (Typ I) ist charakterisiert durch fehlende (Agyrie) oder verminderte (Pachygyrie) Gyrierung der Gehirnoberfläche mit einem verdickten Kortex (10-20 mm; normal 3-4 mm) (Uyanik et al. 2008). Die histologische Ursache der kortikalen Verdickung stellt eine veränderte Schichtung des Kortex in Folge der Migrationsstörung dar (z.B. vier statt sechs Schichten). Wegen der unterschiedlichen Ausprägungsgrade der kortikalen Veränderungen wurde der Begriff des Agyrie-Pachygyrie-Bandspektrums für die Gruppe der klassischen Lissenzephalie eingeführt. Die klassische Lissenzephalie tritt mit einer Häufigkeit von ca. 1:20.000 auf (Uyanik et al. 2008). Der größte Teil der isolierten, klassischen Lissenzephalien (ca. 75%) werden durch Mutationen im *LIS1*- oder *DCX*-Gen verursacht (Leventer et al. 2000). Lis1 spielt eine spezifische Rolle während der neuronalen Migration im Gehirn (Hirotsune et al. 1998).

Die Lissenzephalien mit zerebellärer Hypoplasie (LCH) stellen eine heterogene Gruppe aus klassischen und nicht klassischen Lissenzephalien dar, die eine Kleinhirnhypoplasie aufweisen (Ross et al. 2001). Die Patienten entwickeln postnatal häufig eine Mikrozephalie, eine Epilepsie und eine Wachstumsretardierung.

2.3 Drei positionelle und funktionelle Kandidatengene für DWM auf Chromosom 7

In der von Frau Magdalena Mermela angefertigten Doktorarbeit am Institut für Humangenetik des UKE wurden bei einem Patienten mit balanciert erscheinender *de novo* Translokation zwischen den langen Armen der Chromosomen 4 und 7 die chromosomalen Bruchpunkte kartiert (s. Abb. 2.5).



Abbildung 2.5: Schematische Darstellung der Wildtyp- und rearrangierten Chromosomen der 4;7-Translokation

Blau-weiß: Wildtyp-Chromosom 4; rot-weiß: Wildtyp-Chromosom 7; der(4): derivatives Chromosom 4; der(7): derivatives Chromosom 7; schwarze Wellenlinien: markierte Bruchpunktregionen in 4q12 bzw. in 7q36.

Der Patient wurde durch Entwicklungsverzögerung, Kleinwuchs, autistische Verhaltenszüge sowie eine linksseitige polyzystische Nierendegeneration auffällig. Außerdem bestanden Feinmotorikdefizite, ataktisches Bewegungsmuster, verzögerte motorische Entwicklung, Strabismus und eine kurze Nase mit leicht antevertierten Nares. In der Bildgebung mittels MRT zeigte sich eine milde DWM mit Hypoplasie des Kleinhirnwurms.

Die Kartierung der 7q36-Bruchpunktregion ergab, dass sich im Bruchbereich das *NOM1*-Gen ("nucleolar protein with MIF4G domain 1") befindet. Da dieses Gen aber nicht spezifisch im Gehirn exprimiert wird, erschien es als Krankheitsursache eher unwahrscheinlich. In der Nähe der Bruchpunktregion auf Chromosom 7 liegen Gene, wel-



che in der Kleinhirnentwicklung eine Rolle spielen. In der Abbildung 2.6 sind die Ergebnisse der Bruchpunktanalyse auf Chromosom 7 schematisch dargestellt.

Abbildung 2.6: Schematische Darstellung der Bruchpunktregion 7q36.3 mit dort lokalisierten Genen

Das Ideogramm des Chromosoms 7 ist in rot-weißer Bandenmusterung abgebildet. Durch den grauen Balken ist ein Ausschnitt der Region 7q36.3 mit der darüber liegenden Größeneinteilung in Megabasen (Mb) dargestellt. Der etwa 40 kb große Bruchpunktbereich ist mit einem roten Balken markiert. Gene, die in dieser Region liegen, sind durch Pfeile dargestellt (Pfeilrichtung: $5' \rightarrow 3'$ -Orientierung).

In der Arbeit von Frau Mermela wird ein möglicher Positionseffekt auf eines der drei Gene *CNPY1*, *SHH* und *EN2* diskutiert. Ein Positionseffekt wird durch die Annahme erklärt, dass sich auf dem durch die Translokation nun auf Chromosom 4 sitzenden Stück von Chromosom 7 Sequenzabschnitte mit hohem regulatorischem Potential für eines der drei genannten Gene befinden. Durch ein chromosomales Rearrangement kann es zu einer Veränderung der Genumgebung kommen und daraus kann eine modifizierte Genexpression resultieren. Regulatorische Einheiten wie "Enhancer" und "Silencer" können durch die Translokation von ihrem Zielgen entfernt werden und es dadurch nicht mehr beeinflussen. Dieser Mechanismus kann zu einer Steigerung oder Verminderung der Expression des Zielgens führen. Durch die Translokation können auch fremde "Enhancer" in die Nähe eines Gens gelangen und zu einer verstärkten Expression führen, "Silencer" können ebenso translozieren und die Genexpression beeinflussen (Kleinjan und van Heyningen 1998). Deshalb wurde der Frage nachgegangen, ob Mutationen in einem dieser Gene mit Kleinhirnmalformation bzw. der Dandy-Walker Malformation assoziiert sein könnten.

2.3.1 Sonic hedgehog (SHH)

Das SHH-Gen gehört in die Familie der "Hedgehog"-Gene, hierzu zählen "Sonic hedgehog" (SHH), "Indian hedgehog" und "Desert hedgehog" (Vaillant und Monard 2009). SHH liegt auf Chromosom 7 (7q36.3), besteht aus drei Exons und erstreckt sich auf Ebene der genomischen DNA über ca. 10 kb. Das Gen kodiert für ein Protein aus 462 Aminosäuren (Belloni et al. 1996). SHH wirkt über einen Signalweg auf die Genexpression. SHH ist ein Ligand und interagiert mit den Transmembran-Proteinen "Patched" (PTC) und "Smoothened" (SMO, G-Protein gekoppelter Rezeptor) und löst dadurch einen intrazellulären Signaltransduktionsweg aus (Vaillant und Monard 2009). Dies führt zur Aktivierung von Glioma-assoziierten Transkriptionsfaktoren (GLI). Die Komponenten des SHH-Signalweges PTC, SMO und die GLI-Proteine sind in der primären Zilie lokalisiert (Rohatgi et al. 2007). Zur Familie der GLI-Transkriptionsfaktoren gehören GLI1, GLI2 und GLI3. Die GLI-Proteine (GLIS) binden an die DNA und regulieren die Transkription der Zielgene. Über eine Feedback-Schleife reguliert SHH PTC und die GLI-Transkriptionsfaktoren (Kenney und Rowitch 2000; Zhao et al. 2002; Sjostrom et al. 2005). In Abwesenheit von SHH blockiert PTC die Funktion von SMO. Die GLI-Transkriptionsfaktoren werden durch den "suppressorof-fused" proteolytisch inaktiviert und dadurch an der Aktivierung der Genexpression gehindert (s. Abb. 2.7). Es kommt zur Phosphorylierung und Spaltung der GLIs im Proteasom. Im Proteasom werden aus den gespaltenen GLIs verkürzte Transkriptionsrepressoren produziert (Vaillant und Monard 2009). Die Zielgene der GLI-Transkriptionsfaktoren sind nur teilweise identifiziert. Zu ihnen gehören Regulatoren des Zellzyklus und des SHH-Signalweges (Vaillant und Monard 2009).



Abbildung 2.7: Schematische Darstellung des SHH-Signalweges

Auf der linken Seite der Abbildung ist der SHH-Signalweg ohne Anwesenheit von SHH-Proteinen schematisch dargestellt; auf der rechten Seite mit SHH. Ptc: Patched-Transmembranprotein; Smo: Smoothened-Transmembranprotein; SHH: Sonic-hedgehog-Protein; Sufu: Suppressor-of-fused; Glis: GLI-Transkriptionsfaktor. Nach Vaillant und Monard 2009.

Die Dauer und Intensität der Proliferationsphase, in welcher die Kleinhirn-Körnervorläuferzellen gebildet werden, ist eine kritische Phase für die Ausbildung der endgültigen Form und Funktion des Kleinhirns, in welcher SHH eine wichtige Rolle übernimmt (Vaillant und Monard 2009). SHH wurde das erste Mal in einer Studie, die sich mit der Inhibition von Cholesterol beschäftigte, mit dem Kleinhirn in Verbindung gebracht (Lanoue et al. 1997). Da SHH durch Cholesterol-Modifizierung aktiviert wird, führt eine Cholesterol-Inhibierung zu einem gestörten SHH-Signalweg und zu Kleinhirnentwicklungsstörungen (Lanoue et al. 1997). Das Smith-Lemli-Opitz-Syndrom ist eine autosomal-rezessive Erkrankung, es wird durch eine Störung der Cholesterol-Biosynthese verursacht und geht mit einer Kleinhirnhypoplasie einher (Yu und Patel 2005).

Die kritische mitogene Funktion von Shh wurde in verschiedenen Studien bewiesen. Shh wird in Purkinje-Zellneuronen und vorübergehend in der äußeren Körnerzellschicht produziert. Shh ist für die Proliferation der Körnervorläuferzellen notwendig und induziert die Differenzierung der Bergmann-Glia. Die Hemmung der Shh-Funktion führt bei Mäusen und Hühner-Küken zur Entwicklung einer Kleinhirnhypoplasie mit anormaler Foliation. Hierbei sind die Purkinje-Zellen nicht normal positioniert und Bergmann-Glia sowie differenzierte Körnerzellen sind in der Anzahl reduziert oder nicht vorhanden (Dahmane und Ruiz i Altaba 1999; Wallace 1999; Wechsler-Reya und Scott 1999). Das Shh-Expressionsprofil in der frühen postnatalen Entwicklung ist direkt verantwortlich für die endgültige Größe und Form des Kleinhirns (Vaillant und Monard 2009). Eine fehlende Foliation des Kleinhirns wurde das erste Mal bedingt durch eine Deletion von Shh oder Injektion von Antikörpern gegen Shh bewiesen (Lewis et al. 2004; Dahmane und Ruiz i Altaba 1999). Bei einer Überexpression von Shh in Purkinje-Zellen kommt es zur Entwicklung eines größeren Kleinhirns im Vergleich zur normalen Kleinhirngröße. Zudem kann ein Extralappen im Kleinhirn beobachtet werden, wenn eine weitere Steigerung der Shh-Aktivität induziert wird (Corrales et al. 2006). Die Dauer und Intensität der Shh-Signalwirkung ist entscheidend für die vollständige Entwicklung des Kleinhirns.

SHH vermittelt im Kleinhirn die Proliferation der Körnervorläuferzellen, indem es Gene, die den Zellzyklus regulieren, induziert oder hemmt (Vaillant und Monard 2009). Zu diesen Genen gehören Mitglieder der Cyclin-Familie (A2, B1, D1 und D2), der Forkhead Transkriptionsfaktor FoxM1, das Protoonkogen N-myc und der Wachstumsfaktor IGF-2. Eine Deletion der Gene *D1* und *D2* führt zur Entwicklung einer Kleinhirnhypoplasie (Ciemerych et al. 2002). Nach vollständiger Erzeugung aller Körnervorläuferzellen des Kleinhirns kommt es nicht zu einem Abfall der SHH-Expression, der SHH-Spiegel bleibt auch im Erwachsenen-Stadium erhöht (Traiffort et al. 1998). Dies führte zu der Vermutung, dass SHH auch eine wichtige Rolle im Gehirn erwachsener Menschen spielen könnte. Die SHH-Konzentration beeinflusst stark die endgültige Form des Kleinhirns und wird durch verschiedene Moleküle kontrolliert. Hierzu zählen unter anderem der Wachstumsfaktor IGF-2 (Hartmann et al. 2005), das Insulin-Rezeptor-Substrat 1 (IRS1) (Parathath et al. 2008), Laminin (Vaillant und Monard 2009), die beiden Proteine Vitronectin und Fibronectin (Pons et al. 2001) und die Protease Nexin-1 (PN-1) (Vaillant et al. 2007).

Eine Deregulierung des SHH-Signalweges ist mit einer anormalen Kleinhirnproliferation assoziiert und findet sich bei einem der häufigsten und bösartigsten embryonalen Tumoren des Kleinhirns, dem Medulloblastom (Vaillant und Monard 2009). Es wurden bereits mehrere Mutationen bei betroffenen Patienten gefunden, die den SHH-Signalweg betreffen (Taylor et al. 2002). Zudem induzierte eine Überexpression von Shh in Vorläuferzellen des Kleinhirns bei Mäusen Medulloblastome (Weiner et al. 2002). Es wird vermutet, dass SHH eine Rolle bei der Dandy-Walker-Malformation spielt (Vaillant und Monard 2009). Die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren (*ZIC1* und *ZIC4*) könnten den SHH-Signalweg im sich entwickelnden Kleinhirn modulieren. Die Zinkfinger-Transkriptionsfaktoren sind involviert in die Neurogenese, die Myogenese und die links-rechts Achsenetablierung (Aruga 2004). Der genaue Mechanismus dieser Regulierung ist Gegenstand intensiver Forschung.

2.3.2 *Canopy 1 (CNPY1)*

Das *CNPY1*-Gen gehört zur Familie der *CNPY*-Gene. Die *CNPY*-Gene kodieren für Saposin-ähnliche Proteine. Diese Proteinfamilie wird vor allem über ihre strukturellen Gemeinsamkeiten definiert (Hirate und Okamoto 2006; Matsui et al. 2011). Das *CNPY1*-Gen liegt auf Chromosom 7 (7q36.3), umfasst auf Ebene der genomischen DNA ca. 32 kb und kodiert für ein Protein, das 92 Aminosäuren enthält. *CNPY1* besteht aus vier Exons. Das Startcodon befindet sich im zweiten Exon.

Es wurde beobachtet, dass *Cnpy1* im Isthmusbereich des sich entwickelnden ZNS von Zebrafischembryonen exprimiert wird (Hirate und Okamoto 2006). Der Isthmus spielt eine entscheidende regulatorische Rolle während der Tectum- und Kleinhirnentwicklung. Die Ausschaltung von *Cnpy1* führte zu einer gestörten Kleinhirnausbildung, einer anormalen Ausprägung des Isthmusbereiches und beeinträchtigte den FGF-Signalweg. *Cnpy1* ist laut Hirate und Okamoto (2006) einerseits essentiell für den FGF-Signalweg und wird andererseits durch ihn induziert. Diese Wechselwirkung ist für die Tectumund Kleinhirnentwicklung entscheidend.

2.3.3 Engrailed 2 (EN2)

Das *EN2*-Gen ist in 7q36.3 lokalisiert (Gharani et al. 2004). *EN2* überspannt auf Ebene der genomischen DNA ca. 7 kb. Das Gen kodiert für ein 333 Aminosäuren großes Protein und besteht aus 2 Exons. EN2 hat verschiedene Funktionen. In dieser Arbeit steht die Funktion während der Gehirnentwicklung im Vordergrund.

Die Gene *En1* und *En2* sind in die Kontrolle der Ausbildung des zentralen Nervensystems miteinbezogen (Zec et al. 1997). Eine Expression der *En*-Gene konnte in allen

Neuronen der Medulla oblongata und im ganzen Kleinhirn nachgewiesen werden. Die meisten Strukturen mit den stärksten *En*-Signalen entstammen der Rautenlippe (Zec et al.1997).

Die Expression von *En2* wird durch Fgf8 während der frühen Entwicklung von Diencephalon und Mesencephalon induziert (Liu und Joyner 2001). Außerdem konnten Liu und Joyner (2001) durch Ausschaltung der beiden Gene *En1* und *En2* in Mäuseembryonen zeigen, dass die *En*-Gene für die Aufrechterhaltung der Fgf8-Expression, nicht aber für die Initiation der Expression von Fgf8 bedeutend sind. Fgf8 wird im Isthmusbereich exprimiert und ist für die Ausbildung der richtigen Anordnung von Mesencephalon und Kleinhirn essentiell. Fgf8 ist der bedeutendste Faktor, der mit der Aktivität des Isthmusbereiches in Verbindung steht (Wassef und Joyner 1997). Das Kleinhirn stammt von Zellen aus dem Mesencephalon und Metencephalon (Isthmus) ab. Der Isthmus ist ein Entstehungsort sezernierender Faktoren, diese steuern wiederum die Entwicklung des Isthmusbereiches (Wassef und Joyner 1997).

In einem Mausmodel konnte gezeigt werden, dass eine homozygote Mutation des En2-Gens ($En2^{-/-}$) mit einer Kleinhirnhypoplasie assoziiert ist (Sarnat et al. 2002). Aufgrund dieser Ergebnisse spekulieren Sarnat et al. (2002), dass eine Mutation oder Deletion des EN2-Gens beim Menschen zu einer Fehlbildung von Mesencephalon und Metencephalon mit einer Kleinhirnhypoplasie führt. Das Expressionsmuster von En2 deutet darauf hin, dass die Kleinhirnmusterung bereits während der Embryogenese beginnt und dass En2 eine kritische Rolle in diesem Prozess spielt (Millen et al. 1994).

Das *EN2*-Gen wird mit Autismus in Verbindung gebracht (Wang et al. 2008). In einer Studie wurde bei 138 Personen mit einer Autismus-Störung und ihren Eltern das *EN2*-Gen molekulargenetisch analysiert (Gharani et al. 2004). Dabei wurde beobachtet, dass zwei "single-nucleotide" Polymorphismen (SNPs), die sich im Intron befinden (*rs1861972*; *rs1861973*), signifikant häufiger bei Personen mit einer Autismus-Störung auftreten (Gharani et al. 2004). Bei einer Untersuchung an *En2*-Knockout Mäusen (*En2*^{-/-}) wurde eine Kleinhirnhypoplasie beobachtet, ähnlich wie bei einigen Menschen mit einer Autismus-Störung (Gharani et al. 2004). Zudem wurden bei den Mäusen Defizite im sozialen Verhalten und eine Schwäche der gezielten motorischen Bewegung beobachtet.

2.4 Profilin 1 (PFN1)

Das Gen *PFN1* gehört zur Familie der Profilin-Gene. *PFN1* liegt auf Chromosom 17 in p13.3 und nimmt auf Ebene der genomischen DNA 3,5 kb ein (Kwiatkowski et al. 1990). Das *PFN1*-Gen besteht aus 3 Exons und kodiert für ein 140 Aminosäuren großes Protein. Das entstehende Protein kommt in allen eukaryotischen Zellen vor, bindet an Actinmonomere und reguliert die Actinpolymerisation (Haarer und Brown 1990). Über das Protein PFN1 und seine Funktionen wurde bereits viel geforscht und veröffentlicht. In dieser Arbeit liegt der Fokus auf der Gehirnentwicklung und der dabei von PFN1 vermittelten Wirkung.

Aufgrund der nachfolgend erläuterten Studie und der Annahme, dass das bei Mäusen beobachtete Modell auf den Menschen übertragbar ist, wurde die molekulargenetische Analyse von *PFN1* bei Patienten mit vergleichbarem Phänotyp gestartet. Bei Untersuchungen an Mäuseembryonen wurde die Expression des *Pfn1*-Gens im Gehirn verhindert. Dies führte zu einer Kleinhirnhypoplasie mit anormaler Organisation der Schichten des Kleinhirnkortex und verlagerten Kleinhirn-Körnerneuronen (Kullmann et al. 2011). Die Körnerneurone des Kleinhirns benutzen die Bergmann-Glia-Zellen für die radiale Migration, indem sie an ihnen entlangwandern und Zell-Zell-Kontakte bilden. Kullmann et al. (2011) konnten zeigen, dass das Actin-bindende Protein PFN1 essentiell für die Zell-Zell-Kontakte zwischen Körnerneuronen und Glia und damit für die radiale Migration ist. Kullmann et al. (2011) vermuteten eine ähnliche Funktion von PFN1 beim Menschen.

Ein Anstieg von *Pfn*-mRNA konnte bei Ratten in der ersten postnatalen Woche beobachtet werden (Léna et al. 1991). Hier finden eine intensive Zellproliferation, Axonwachstum und Synaptogenese statt. Léna et al. (1991) vermuteten, das Profilin während der kritischen Entwicklung des Kleinhirns Actinmonomere zur Verfügung stellt und somit die Kleinhirnentwicklung unterstützt. Unreife Neuronen, die sich im Kleinhirn von Ratten befinden, beinhalten eine große Menge an Pfn (Faivre-Sarrailh et al. 1993). In der zweiten und dritten postnatalen Woche ist die Profilin-Konzentration in den Synapsen höher als im gesamten Kleinhirn. Während dieses Zeitraums findet eine intensive Synaptogenese statt. Faivre-Sarrailh et al. (1993) spekulieren, dass Pfn die ActinPolymerisation und –Depolymerisation während der axonalen Verlängerung und der Synaptogenese reguliert.

Die Expression von Pfn1 variiert bei Mäusen in den verschiedenen Bereichen des Gehirns (Neuhoff et al. 2005). Im Kleinhirnkortex und im Hippocampus ist Pfn1 überwiegend mit Dendriten assoziiert und zeigt sich in einem Teil der Dendritendorne. Im Gegensatz dazu ist Pfn1 im Kleinhirn hauptsächlich mit präsynaptischen Strukturen in Verbindung zu bringen. Das Protein Pfn1, wie auch Pfn2, interagiert mit synaptischen Proteinen, es reorganisiert Actinfilamente und stimuliert die Actin-Polymerisation. Pfn1 kann also auf beiden Seiten, prä- und postsynaptischer Membran, lokalisiert sein. Neuhoff et al. (2005) vermuteten, dass Pfn1 in die aktivitätsabhängige Umgestaltung der Synapsen-Struktur involviert ist.

3 Material & Methoden

3.1 Material

3.1.1 Patienten

3.1.1.1 Patientenkollektiv für die Gene CNPY1, SHH und EN2

Das Patientenkollektiv für die Mutationsanalyse umfasste 33 Patienten, wobei die Patienten-DNAs durch unterschiedliche Institute für Humangenetik zur Verfügung gestellt wurden. Dabei sind die Institute des Universitätsklinikums Erlangen, der Universität Lübeck (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein), der Universität Heidelberg und des Universitätsklinikums Essen zu nennen. Die grundsätzliche klinische Gemeinsamkeit des Patientenkollektivs war die Kleinhirnaffektion. Bei fünf Patienten lag eine isolierte Dandy-Walker-Malformation vor, drei Patienten zeigten eine Kleinhirnagenesie und 25 eine Kleinhirnhypoplasie, teilweise nur mit Kleinhirnwurmhypoplasie.

3.1.1.2 Patientenkollektiv für das *PFN1*-Gen

Das Patientenkollektiv für die Mutationsanalyse umfasste 55 Patienten. Die Patienten-DNAs wurden auch hier durch unterschiedliche Institute für Humangenetik zur Verfügung gestellt. Die Institute des Universitätsklinikums Freiburg, der Universität Lübeck (Universitätsklinikum Schleswig-Holstein) und des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf sind dabei zu erwähnen. Die grundsätzliche Gemeinsamkeit des Patientenkollektivs war wiederum die Kleinhirnaffektion, wobei die meisten Patienten darüber hinaus auch Auffälligkeiten des Großhirns (Cerebrum) zeigten. Fünf Patienten zeigten eine Dandy-Walker-Malformation und die restlichen 50 Patienten wiesen eine Kleinhirnhypoplasie auf, die bei manchen Patienten mit einer kortikalen Gyrierungsstörung und/oder Balkenhypoplasie assoziiert war.

3.1.2 Materialien für molekularbiologische Methoden

3.1.2.1 PCR-Puffer

10x Buffer F-101	MgCl ₂	1.5 mM	
	Tris-HCl	10 mM	EININZVMES
ase	KCl	50 mM	
	pН	8,3 bei 25°C	
CoralLoad PCR Buffer, 10x 1.2ml	MgCl ₂	15 mM	QIAGEN

FailSafeTM PCR 2x PreMix D 2.5 ml	EPICENTRE
FailSafeTM PCR 2x PreMix H 2.5 ml	EPICENTRE
FailSafeTM PCR 2x PreMix J 2.5 ml	EPICENTRE
10X PCRx Enhancer- Solution	Invitrogen
Multiplex PCR 2x PreMix J 2.5 ml	QIAGEN

3.1.2.2 Puffer und Lösungen

	Tris	890 mM (108 g/l)	
10x TBE	Borsäure	890 mM (55 g/l)	
	EDTA	20 mM (12,4 g/l)	
	Glycerin (100%)	25 ml	
10x Ladepuffer für	1x TBE	25 ml	
DIM	Orange-G	20 mg	
Ethidiumbromid	(in Aqua dest.)	0,05%	
Ladopuffor TE Mix	6x Ladepuffer	200 µl	
Ladeputter-TE-MIX	1x TE	800 µl	
	Ladepuffer-TE-Mix	950 μl	
DNA-Leiter (100 Bp)	100 bp DNA Leiter 1µg/µl (Invitrogen)	50 µl	

3.1.2.3 PCR-Primer für die Mutationsanalyse der Gene CNPY1, SHH, EN2 und PFN1

Die PCR-Primer für die Gene *CNPY1, SHH, EN2* und *PFN1* wurden mit Hilfe des webbasierten Programms Primer3Plus (http://www.bioinformatics.nl/cgibin/primer3plus /primer3plus.cgi) ermittelt (Untergasser et al. 2007) und von der Firma Sigma-Aldrich synthetisiert (s. Tab. 3.1 bis 3.4).

Tabelle 3.1: PCR-Primer für die Mutationsanalyse des CNPY1-Gens

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
<i>CNPY1</i> – 1F	GCCACCTCAACAAGGGGTTA	<i>CNPY1</i> – 1R	GGGAAAAGCGGGTATCAAAT
CNPY1 – 2F	ATCTGCGGTACCGTCTTCTG	<i>CNPY1</i> – 2R	TGCATTTTGATGTTCCATGTC
<i>CNPY1</i> – 3F	GGCGAATAAAAATGGACCAC	<i>CNPY1</i> – 3R	TCTCACATGCTGTCGTTTCTG
CNPY1 – 4F	GGGTGCAGGGGAATAGATTA	<i>CNPY1</i> – 4R	TTGATTTATCAAAATCTGCAAAGG

Tabelle 3.2: PCR-Primer für die Mutationsanalyse des SHH-Gens

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
<i>SHH</i> – 1F	GACCCAACTCCGATGTGTTC	<i>SHH</i> – 1R	TGACCTCCATTCTCCTCCAG
SHH – 2F	GCAAATGCTGTCCCTCTTCC	<i>SHH</i> – 2R	AGCCACAGGACCCCATCT
SHH – 3aF	AGGAATGTGTCGGAATCCTG	<i>SHH</i> – 3aR	CCTCCTCGCTTAGGGTCAC
<i>SHH</i> – 3b2F	CAGCGCGTGTACGTGGTGGCC	<i>SHH</i> – 3b2R	CCCCCCGGCTTCAGCTGGACTT
SHH – 3cF	GCAGAGTAGCCCTAACCG	<i>SHH</i> – 3.2R	CGGGGTCCTTGTTTCCTTAG

Tabelle 3.3: PCR-Primer für die Mutationsanalyse des EN2-Gens

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
<i>EN2</i> – 1.1F	CGGACCACTGCGACTGTCTA	<i>EN2</i> – 1.1R	GCAGGATGTTGTCGATGAAG
<i>EN2</i> – 1.2F	TGTGAACAGCATGGAGGAGA	<i>EN2</i> – 1.2R	ATGTCGCGTGAGTCTTTGTG
<i>EN2</i> – 2F	CGAAGTCTAGCCCCACATCT	<i>EN2</i> – 2R	ATTTCAGAACCT- TAGCTAATACACAA

Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'	Name	Oligonukleotidsequenz 5'→3'
<i>PFN1</i> – 1F	TCCTTCCTTCTTCTGGCTCA	<i>PFN1</i> – 1R	ACCCAGTCAGGGCCTCTC
<i>PFN1</i> – 2F	TCTGCACTAACGTCCCACAG	<i>PFN1</i> – 2R	CCTTCATGTTGGGGGAATCAC
<i>PFN1</i> – 3F	CCTGGATCCTAGCCTCCTTT	<i>PFN1</i> – 3R	CACCAATTTGACCAGCACAC

 Tabelle 3.4: PCR-Primer f
 ür die Mutationsanalyse des PFN1-Gens

3.1.2.4 Materialien zur Genom-Amplifikation von genomischer DNA

Für die Amplifikation von genomischer ("whole genome amplification") DNA wurde das illustraTM GenomiPhi V2 Amplification Kit von GE Healthcare (Buckinghamshire) benutzt.

Inhalt des Kits:

GenomiPhi Sample Buffer (1 x 0.9 ml)

GenomiPhi V2 Reaction Buffer (1 x 0.9 ml)

GenomiPhi V2 Enzyme Mix (1 x 100 µl)

GenomiPhi Control DNA, 10 µg/ml (1 x 20 µl)

3.1.2.5 Enzyme und Nukleinsäuren

Taq DNA Polymerase	5 U/µl	FINNZYMES
Taq DNA Polymerase	5 U/µl	QIAGEN
Herculase ^R Enhanced DNA Polymerase	5 U/µl	STRATAGENE
100 mM dNTP Set PCR Grade	Je 50 µl dGTP, dTTP, dATP, dCTP (je 1M) mit 300 µl HPLC H ₂ 0 verdünnt	Invitrogen

3.1.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Tabelle 3.5: Chemikalien und Lösungsmitte	Tabelle 3.5:	Chemikalien	und Lösungsmitte
---	--------------	-------------	------------------

Chemikalien/Lösungsmittel	Hersteller
Agarose	Invitrogen (Karlsruhe)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Chloramphenicol	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, NL)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz- Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Glycerol	Roth (Karlsruhe)
H ₂ 0	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Natriumchlorid	J.T. Baker (Deventer, NL)
Orange-G	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Tri-Natriumcitrat-Dihydrat	Merck (Darmstadt)
Tris(Hydroxymethyl-)aminomethan [Tris]	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Trypton	BD (Heidelberg)
2-Propanol	Fluka (Buchs, CH)
10X FastDigestR Green Buffer	Fermentas (St. Leon-Rot)

Exonuclease I (Exo I)	20 u/µl	Fermentas Life Sciences	
FastAPTM Thermosensitive Alkaline Phosphatase	1 u/µl	Fermentas Life Sciences	
ABI PrismR BigDyeR Ter-			
minator v1.1	Applied Biosystems		
Cycle Sequencing Kits			
BigDyeR Terminator v1.1 5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems		

3.1.4 Geräte

Tabelle 3.6: Geräte

Geräte	Hersteller
DNA Sequencer	Applied Biosystems [®] 3500 DX Genetic Analyzers (Foster City, USA)
Drucker Digital Graphic Printer	SONY (Japan)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (München)
Heizblock (Typ: 52526101)	Liebisch (Bielefeld)
Kamera	Pentax (Hamburg)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg)
Kühlzentrifuge 5810R	Eppendorf AG (Hamburg)
Magnetrührer MR 3000	Heidolph (Schwabach)
Magnetrührer RET basic	IKA Labortechnik (Staufen i. Br.)
Netzgerät <i>Electrophoresis power</i> supply ST305	Life Technologies (Karlsruhe)
Netzgerät Power Pac 300	BioRad (München)
PCR-Cycler MJ Research PTC 200	MJ Research, Inc. (Watertown, USA)
Pipetten Finnpipetten	Thermo Labsystems (Mannheim)
Tischzentrifuge "Biofuge Pico"	Heraeus (Hannover)
UV-Transilluminator UVT-28M	Herolab (Wiesloch)
Vortex-Gerät "Vortex Genie 2 Heidolph Reex 2000"	Scientific Industries, INC. (Bohemia, New York, USA)
Waage "Sartorius ISO 9001"	Sartorius (Göttingen)
Wasserbad "GFL 1083"	GFL (Burgwedel)
Zentrifuge Megafuge 1.0	Heraeus (Hannover)

3.1.5 Verbrauchsmaterialien

Tabelle 3.7: Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Handschuhe puderfrei	Peha-Soft, Hartmann (Heidenheim)
Pipettenspitzen	Sarstedt (Nümbrecht)
PCR SoftTubes, 0,5 ml	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)
Tubes	Eppendorf AG (Hamburg)
CELLSTAR Tubes	Greiner bio-one (Frickenhausen)
Combitips plus	Eppendorf AG (Hamburg)
HighDensityPaper	Mitsubishi Electric (Ratingen)

3.1.6 Hardware

Tabelle 3.8: Hardware

Hardware	Hersteller
Computer	Lifetec®
Laptop	Sony VAIO

3.1.7 Software

Tabelle 3.9: Software

Software	Hersteller/Internetadresse
Microsoft Office 2007	Microsoft D GmbH, Unterschleißheim
Microsoft Word 2010	Microsoft D GmbH, Unterschleißheim
Ensembl release 61	© WTSI / EBI, http://www.ensembl.org/index.html
National Center for Biotechnology Information	8600 Rockville Pike, Bethesda MD, 20894 USA
Sequence Pilot ^{CE}	JSI Medical Systems GmbH, Kippenheim
Corel Paint Shop Pro X	Corel Corporation
Primer3Plus	Bioformatics (http://www.bioformatics.nl/ cgibin/primer3plus/primer3plus.cgi)
Mutationtaster	http://www.mutationtaster.org/index.html
NetGene2 (Center for Biological Se- quence Analysis DTU)	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
Institute for Biomedical Technologies ITB – CNR	http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/www spliceview_ex.html
Berkeley Drosophila Genome Project	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
Polyphen	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/
Polyphen2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
PANTHER	http://www.pantherdb.org/t ools/csnpScoreForm.jsp
SIFT Human Protein	http://sift.jcvi.org/www/ SIFT_enst_submit.html
SNAP	http://www.rostlab.org/services/SNAP/
Chromas Lite	Technelysium Pty Ltd

3.2 Methoden

3.2.1 Amplifikation genomischer DNA

Bei begrenzter DNA-Menge wurde für die Amplifikation der gesamten genomischen DNA eine "whole genome amplification" (WGA-) Reaktion mit dem illustraTM GenomiPhi V2 Amplification Kit von GE Healthcare nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

Hierfür wurde die zu amplifizierende DNA (~10 ng/µl) zunächst mit 9 µl GenomiPhi Sample Buffer für 3 Minuten bei 95°C denaturiert und anschließend auf 4°C heruntergekühlt. Daraufhin wurden 9 µl GenomiPhi V2 Reaction Buffer und 1 µl GenomiPhi V2 Enzyme Mix (enthält *Phi29*-DNA-Polymerase) zur Probe hinzugegeben. Die Amplifikation wurde bei 30°C für 90 Minuten durchgeführt. Im Anschluss wurde die DNA-Polymerase bei 65°C für 10 Minuten inaktiviert und die Probe wieder auf 4°C heruntergekühlt.

Ein großer Vorteil der *Phi29*-DNA-Polymerase ist die hohe Prozessivität und zusätzlich die "strand displacement" Aktivität, dadurch können die neu synthetisierten Stränge ebenfalls als Matrize für weitere Amplifikationen genutzt werden. Durch diese Methode ist es möglich, die Ausgangs-DNA hochgradig zu amplifizieren und so aus 10 ng DNA ca. 4-7 µg DNA zu generieren (je 20 µl Reaktionsansatz).

Sämtliche Schritte der WGA-Amplifikation wurden im PTC-200 Peltier Thermal Cycler von MJ Research durchgeführt.

3.2.2 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, "polymerase chain reaction") dient der selektiven Amplifikation von DNA-Fragmenten und ist ein *in-vitro*-Verfahren (Mullis und Faloona 1987). Mit Hilfe hitzestabiler DNA-Polymerasen kommt es zur zyklischen Vervielfältigung eines bestimmten DNA-Abschnittes, der von zwei Oligonukleotiden (Primer) umgeben ist. Die Oligonukleotide sind zu je einem Abschnitt des DNA-Fragmentes revers komplementär. Sie binden spezifisch an die DNA und markieren somit den Anfang des zu vervielfältigenden DNA-Fragments.

Für einen PCR-Ansatz wurden in der Regel 1,0 μ l DNA (ca. 100 ng/ μ l; Matrize), 0,1 μ l DNA-Polymerase (5 U/ μ l), 0,5 μ l Desoxynukleotide (10 mM), je 0,5 μ l der beiden Primer (10 mM) und diese mit 2,5 μ l 10xPCR-Puffer und 19,9 μ l HPLC-H₂O auf ein Reaktionsvolumen von 25 μ l gebracht.

Standard PCR-Ansatz:

HPLC-H ₂ O
10xPCR-Puffer (15 mM MgCl ₂)
Primer Forward (10 µM)
Primer Revers (10 µM)
dNTPs (10 mM)
<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
DNA (100 ng/µl)
Gesamtvolumen

PCR-Ansatz mit FailSafe-PCR-Puffer:

10,4 µl	HPLC-H ₂ O
0,5 µl	Primer Forward (10 µM)
0,5 µl	Primer Revers (10 µM)
12,5 µl	FailSafe TM PCR
0,1 µl	<i>Taq</i> DNA-Polymerase (5 U/µl)
1,0 µl	DNA (100 ng/µl)
25,0 µl	Gesamtvolumen

FailSafe-PCR-Puffer wurde für besonders schwierig zu amplifizierende Abschnitte eines Gens benutzt, zum Beispiel für Exons, die einen sehr hohen Anteil an Guanin- bzw. Cytosinbasen haben. Der FailSafe-Puffer enthält bereits dNTPs, diese müssen deshalb nicht zusätzlich hinzugefügt werden. Jeder der drei benutzten FailSafe-Puffer (D, J, H) hat eine spezielle Zusammensetzung, die vom Hersteller EPICENTRE nicht angegeben wird.

Alle nachstehend erläuterten Amplifikationsreaktionen wurden im PTC-200 Peltier Thermal Cycler von MJ Research durchgeführt. Die Polymerase-Kettenreaktion wird in fünf Schritte unterteilt. Die mittleren drei Reaktionsschritte stellen repetitive Reaktionszyklen dar.

1. Initiale Denaturierung	95°C	5 – 10 min	
2. Denaturierung	95°C	20 s	J
3. Annealing	$50-68^{\circ}C$	10 s	> 30−40 Zyklen
4. Elongation	72°C	30 s – 1 min	J
5. Finale Elongation	72°C	10 min	

Die Polymerase-Kettenreaktion beginnt mit der Denaturierung. Dabei wird die doppelsträngige DNA auf 95°C erhitzt. Durch die Erhitzung brechen die Wasserstoffbrückenbindungen, welche die beiden DNA-Stränge zusammenhalten, und es entstehen zwei Einzelstränge. Die Initiale Denaturierung wird einmal 5 bis 10 Minuten zu Beginn der PCR durchgeführt. Die folgende Denaturierung wird in jedem Zyklus wiederholt. Anschließend erfolgt beim "Annealing" die komplementäre Hybridisierung der Primer. Die Hybridisierungstemperatur ist für jeden Primer spezifisch und wird von der Länge und der Sequenz des jeweiligen Primers bestimmt. Bei der anschließenden "Elongation" synthetisiert die DNA-Polymerase ausgehend von den Primern in der 5' \rightarrow 3'-Richtung den Komplementärstrang. Durch Wiederholung dieser drei Schritte entstehen viele Kopien (PCR-Produkte) des durch die beiden eingesetzten Primer begrenzten DNA-Abschnittes. Die Temperatur während der "Elongation" ist abhängig von der verwendeten DNA-Polymerase, die Elongationszeit orientiert sich an der Länge des zu synthetisierenden Abschnittes (Polymerasen können 500-1000 Basen pro Minute polymerisieren).

Die Polymerase-Kettenreaktion ergibt sich aus der Wiederholung von Denaturierung, Annealing und Elongation in 30-40 Zyklen. Durch jeden Zyklus entstehen mehr Duplikate eines DNA-Abschnittes. Diese können ebenfalls als Matrize für die DNA-Polymerase dienen. Dadurch kommt es zu einer exponentiellen Vermehrung dieses Abschnittes. Durch die finale Elongation wird die Polymerisation der DNA beendet.

3.2.2.1 Touchdown-PCR

Bei der Touchdown-PCR werden gegenüber der Standard-PCR nur die Einstellungen des Thermocyclers verändert. Die Touchdown-PCR wird eingesetzt, um die Spezifität der entstehenden Produkte zu erhöhen. Hierfür wird die Annealing-Temperatur der Primer zweimal um jeweils 2°C heruntergesetzt. Diese Methode soll dazu führen, dass die Primer in der ersten Runde (mit der höchsten Annealing-Temperatur) mit hoher Spezifität binden und dadurch wenig Nebenprodukte durch Fehlanlagerung entstehen. In der zweiten Runde, in der die Annealing-Temperatur um 2°C niedriger ist, binden die Primer leichter, aber auch nicht mehr so spezifisch. Aufgrund der ersten Runde sind aber schon viele Duplikate des zu amplifizierenden DNA-Abschnittes entstanden, dadurch ist die Wahrscheinlichkeit sehr hoch, dass die Primer an diese binden und sie duplizieren. In der nächsten Runde wird die Annealing-Temperatur wieder um 2°C erniedrigt.

Initiale Denaturierung	95°C	5-10 min	
Denaturierung	95°C	20 s	J
Annealing	X°C	10 s	
Elongation	72°C	30 s – 1 min	J
Denaturierung	95°C	20 s	۲
Annealing	X-2°C	10 s	> 3 Zyklen
Elongation	72°C	30 s – 1 min	
Denaturierung	95°C	20 s	J
Annealing	X-4°C	10 s	> 29 Zvklen
Elongation	72°C	30 s – 1 min	J
Finale Elongation	72°C	10 min	

3.2.2.2 Multiplex PCR-Kit

Das Multiplex-Kit ermöglicht eine parallele Amplifikation von zwei oder mehr Produkten in einem Reaktionsgefäß. Das Multiplex-Kit wurde für besonders schwierige Bereiche eines Gens benutzt, zum Beispiel für Exons, welche einen sehr hohen Anteil an Guanin- bzw. Cytosinbasen haben.

Im Mastermix des Multiplex-Kit sind die DNA-Polymerase, der PCR-Puffer und die dNTPs bereits enthalten.

PCR-Ansatz mit Multiplex-Kit:

19,9 µl	HPLC-H ₂ O
0,5 µl	Primer Forward (10 µM)
0,5 µl	Primer Revers (10 µM)
3,1 µl	Multiplex-Kit
1,0 µl	DNA (100 ng/µl)
25,0 µl	Gesamtvolumen

Alle nachstehend erläuterten Amplifikationsreaktionen wurden im PTC-200 Peltier Thermal Cycler von MJ Research durchgeführt.
1. Initiale Denaturierung	95°C 15 min	
2. Denaturierung	95°C 30 s	J
3. Annealing	58°C 90 s	> 35 Zyklen
4. Elongation	72°C 60 s	J
5. Finale Elongation	72°C 10 min	

3.2.2.3 PCR-Bedingungen

Die PCR-Bedingungen variieren je nach Primerpaar. In den folgenden Tabellen (s. Tab. 3.10 bis 3.13) sind die PCR-Bedingungen der einzelnen Gene zusammengefasst.

Exon (Amplikon)	Primerpaar	Produktgröße (Bp)	TD- Programm
Exon 1	<i>CNPY1</i> – 1F+1R	386	TD62
Exon 2	CNPY1 – 2F+2R	472	TD62
Exon 3	<i>CNPY1</i> – 3F+3R	392	TD62
Exon 4	<i>CNPY1</i> – 4F+4R	481	TD62

Tabelle 3.10: PCR-Bedingungen der einzelnen Exons von CNPY1

Tabelle 3.11: PCR-Bedingungen der einzelnen Exons von EN2

Exon (Ampli- kon)	Primerpaar	Produktgröße (Bp)	Failsafe- /Puffer	TD- Programm
Exon 1.1	<i>EN2</i> – 1.1F+1.1R	538	D/H	TD62
Exon 1.2	<i>EN2</i> – 1.2F+1.2R	893	D/H	TD62
Exon 2	EN2 - 2F + 2R	599	-	TD62

Tabelle 3.12: PCR-Bedingungen der einzelnen Exons von SHH

Exon (Ampli- kon)	Primerpaar	Produktgröße (Bp)	Failsafe- /Puffer	TD- Programm
Exon 1	<i>SHH</i> – 1F+1R	761	-	TD62
Exon 2	<i>SHH</i> – 2F+2R	696	-	TD60
Exon 3a	<i>SHH</i> – 3aF+3aR	671	D/H	TD60
Exon 3b2	<i>SHH</i> – 3b2F+3b2R	466	Enhancer	TD64
Exon 3c	<i>SHH</i> – 3cF+3.2R	327	Enhancer/ Multiplex	TD58

Exon (Ampli- kon)	Primerpaar	Produktgröße (Bp)	Failsafe- /Puffer	TD- Programm
Exon 1	PFN1 – 1F+1R	696	D	TD64
Exon 2	PFN1 - 2F + 2R	482	-	TD60
Exon 3	<i>PFN1</i> – 3F+3R	577	_	TD62

Tabelle 3.13: PCR-Bedingungen der einzelnen Exons von PFN1

3.2.3 Agarose-Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der Nukleinsäurestränge nach ihrer Größe aufgetrennt werden können. Sie dient der Darstellung von PCR-Produkten. Die Agarose-Konzentration wird je nach erwarteter DNA-Fragmentgröße angepasst (0,8-4%). Die Laufstrecke eines Fragments ist dabei dem Logarithmus seines Molekulargewichts umgekehrt proportional. Dies bedeutet, dass kleinere Fragmente schneller durch das Gel wandern als größere. Die DNA wandert in einem angelegten elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, da die DNA durch Phosphatreste negativ geladen ist.

Um ein Agarosegel zu erstellen, wurde Agarose in 1x TBE-Puffer aufgekocht, dann auf etwa 50°C abgekühlt und in einen Gelschlitten mit eingesetzten Probekämmen gegossen. Nach auspolymerisieren des Gels wurde es in eine mit TBE gefüllte Gelkammer gegeben und die Probekämme entnommen. In die entstandenen Geltaschen wurde eine Mischung aus PCR-Produkt und ¼ Volumen DNA-Ladepuffer gegeben. Um eine Größenskala zu erhalten, wurde eine Geltasche mit 100 bp-Marker beladen. Es wurde etwa 30 Minuten eine Spannung von 160V angelegt. Anschließend wurde das Gel mindestens 15 Minuten in einer 0,05%igen Ethidiumbromid-Lösung eingefärbt. Der Farbstoff Ethidiumbromid interkaliert in die DNA und fluoresziert nach Anregung mit UV-Licht (254 nm), so dass die DNA im Gel sichtbar wird. Auf einem Transilluminator-Tisch kann diese Fluoreszenz sichtbar gemacht werden und mit Hilfe einer Kamera dokumentiert werden. Mittels des Größenmarkers kann nun die Größe der entstandenen PCR-Produkte ermittelt werden.

3.2.4 Aufreinigung der PCR-Produkte

Die PCR-Produkte werden aufgereinigt, um störende Enzymreste, kleine DNA-Fragmente und Oligonukleotide zu entfernen, welche die folgende Sequenzier-Reaktion des PCR-Produkts stören könnten. Die Aufreinigung der PCR-Produkte erfolgt enzymatisch mit Hilfe des Enzymmix ExoSAP. Dieser Enzymmix wird aus der Exonuclease I aus *E.coli* und der FastAPTM Thermosensitive Alkaline Phosphatase im Verhältnis 1:2 hergestellt.

ExoSAP-Ansatz:

1,5 µl	PCR-Produkt
1 µl	ExoSAP
5 µl	HPLC-H ₂ O
7,5 μl	Gesamtvolumen

Die ExoSAP-Reaktion wurde im PTC-200 Peltier Thermal Cycler von MJ Research durchgeführt. Zuerst wurde der ExoSAP-Ansatz für 15 Minuten bei 37°C erhitzt, daraufhin folgte die Enzyminaktivierung bei 80°C für 15 Minuten.

3.2.5 DNA-Sequenzierung

Die DNA-Sequenzierungen wurden auf dem ABI^R 3500 Genetic Analyzer mit dem ABI Prism BigDye Terminator Kit Version v1.1 der Firma Applied Biosystems durchgeführt. Das Prinzip der DNA-Sequenzierung beruht auf der Didesoxymethode nach Sanger (Sanger et al. 1977). Diese sogenannte Kettenabbruchmethode beruht darauf, dass neben 2'-Desoxyribonukleotiden (dNTPs) auch fluoreszenzmarkierte 2',3'-Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) in die zyklische Sequenzierreaktion eines spezifischen PCR-Produktes eingesetzt werden. Wird ein solches ddNTP während der Amplifizierungsreaktion in den DNA-Strang eingebaut, kommt es zum Abbruch der Amplifizierunsreaktion. Der Abbruch erfolgt aufgrund der fehlenden 3'OH-Gruppe an den ddNTPs. Diese ist aber für die Ausbildung einer Phosphodiesterbrücke mit der Phosphatgruppe eines weiteren dNTPs oder ddNTPs notwendig. Die so entstandenen DNA-Stränge sind durch den zufälligen Einbau von ddNTPs unterschiedlich lang und sind je nach Didesoxynukleotid mit einem spezifischen Fluoreszenzfarbstoff markiert. Diese spezifische Fluoreszenzmarkierung wird bei der darauf folgenden Kapillarelektrophorese mithilfe eines Lasers detektiert. Dadurch kann aufgrund der Größe und der Fluoreszenzmarkierung der DNA-Fragmente elektronisch ein Sequenzchromatogramm abgeleitet werden.

Die Amplifizierungsreaktion wurde mit einem Primer durchgeführt, damit nur ein Strang als Matrize für die Sequenzierung genutzt wird.

Sequenzier-Ansatz:

3 µl	ExoSAP-Produkt
1 µl	Primer Fwd oder Rev (10 pmol/µl)
2 µl	BigDye Cycle Sequencing Kits
4 µl	BigDye 5x Sequencing Buffer
9,5 µl	HPLC-H ₂ O
19,5 µl	Gesamtvolumen

Die Sequenzier-Reaktion wurde im PTC-200 Peltier Thermal Cycler von MJ Research durchgeführt.

96°C	5 min	
96°C	30 s)
55°C	15 s	29 Zvklen
60°C	4 min	
72°C	4 min	

Anschließend wurde das Sequenzierprodukt mithilfe einer Natriumacetat-Fällung aufgereinigt, um nicht eingebaute dNTPs und ddNTPs zu entfernen.

19,5 µl	Sequenzierprodukt
5 µl	3M NaAc
125 µl	Ethanol 100%
30 µl	HPLC-H ₂ O
179,5 µl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde kurz aufgeschüttelt und im Anschluss 20 Minuten bei 20°C bei 14000 Upm zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand verworfen. Das übriggebliebene DNA-Pellet wurde nun in 300 µl 70% Ethanol gewaschen, wiederum aufgeschüttelt und anschließend für 5 Minuten bei 20°C bei 14000 Upm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das DNA-Pellet wurde daraufhin für 15 Minuten bei 37°C getrocknet und bis zur Sequenzierung bei -20°C gelagert.

3.2.6 Auswertung

Die Auswertung der entstandenen Sequenzchromatogramme erfolgte mithilfe des Programms *Sequence Pilot*[©] der Firma JSI Medical Systems GmbH. Die Referenz-Sequenzen der untersuchten Gene wurden der Ensembl Seite von © WTSI / EBI (http://www.ensembl.org/index.html) entnommen, ebenso wie die zu dem Zeitpunkt in der Datenbank erfassten bekannten Polymorphismen und Mutationen.

Mithilfe von "Mutationtaster" (http://www.mutationtaster.org/index.html), "Polyphen" (http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/) und "Polyphen2" (http://genetics.bwh.harvard. edu/pph2/) wurden die Sequenzvarianten auf die Wahrscheinlichkeit des Vorliegens einer pathogenen Mutation überprüft.

Mittels der Programme "PANTHER" (http://www.pantherdb.org/tools/csnpScore Form.jsp), "SIFT Human Protein" (http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_ submit.html) und "SNAP" (http://www.rostlab.org/services/SNAP/) wurden die gefundenen Sequenzvarianten auf pathogene Veränderungen im Vergleich zum Wildtyp untersucht.

Die Erkennung und Voraussage von humanen Spleißstellen wurde mithilfe von "NetGene2" (Center for Biological Sequence Analysis DTU, http://www.cbs.dtu.dk /services/NetGene2/), "Institute for Biomedical Technologies ITB – CNR" (http://zeus2.itb.cnr.it/~webgene/wwwspliceview_ex.html), "Berkeley Drosophila Genome Project" (http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) und "Mutationtaster" (http://www.mutationtaster.org/index.html) geprüft.

4 Ergebnisse

4.1 Mutationsanalyse von drei Kandidatengenen für DWM in 7q36.3 bei Patienten mit Kleinhirnveränderungen

Die Mutationsanalyse der drei Gene *CNPY1*, *SHH* und *EN2* wurde an genomischer DNA eines Kollektivs bestehend aus 33 Patienten durchgeführt. Bei 25 Patienten war eine Kleinhirnhypoplasie bzw. Kleinhirnwurmhypoplasie vorhanden. Bei 5 Patienten lag eine Dandy-Walker-Malformation vor und bei 3 Patienten eine Kleinhirnagenesie. Da von einigen Patienten nicht ausreichend genomische DNA vorhanden war, wurde diese mit Hilfe des GenomiPhi DNA Amplification Kit vervielfältigt, nach Bestimmung der Konzentration verdünnt und für die PCR-Amplifikation der einzelnen Exons benutzt.

4.1.1 Mutationsanalyse des SHH-Gens

4.1.1.1 PCR-Amplifikation sämtlicher Exons des SHH-Gens

Das *SHH*-Gen besteht aus drei Exons. Alle drei Exons beinhalten kodierende Bereiche. Bei Exon 1 und 2 des *SHH*-Gens liegen die Primerpaare in den angrenzenden Intronbereichen. Da das dritte Exon sehr groß und schwer amplifizierbar war, wurde es in drei überlappenden, kleineren Teilen amplifiziert: Exons 3a, 3b und 3c. Hierbei wurden für jedes Teilstück des Exon 3 eigene Primerpaare synthetisiert. Nach der PCR-Amplifikation wurden die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (s. Abb. 4.1), nach der Größe überprüft, aufgereinigt und sequenziert.



Abbildung 4.1: Darstellung eines Agarosegels nach Färbung mit Ethidiumbromid mit unterschiedlich großen PCR-Produkten der drei Exons des *SHH*-Gens

Das Bild zeigt ein 2%-iges Agarosegel auf das jeweils 10 µl der PCR-Produkte aufgetragen wurden. Links und rechts wurde ein Größenstandard (100 Bp-Leiter) aufgetragen.

4.1.1.2 DNA-Sequenzanalyse des SHH-Gens

Im *SHH*-Gen wurden bei den untersuchten Patienten fünf Sequenzveränderungen gefunden (s. Tab. 4.1). Nur zwei von den gefundenen fünf Veränderungen sind in der Gendatenbank Ensembl als Polymorphismen mit einer zugehörigen rs-Nummer annotiert.

Tabelle 4.1: Identifizierte Sequenzvarianten im SHH-Gen bei 33 untersuchten Patiente	en

Gen	Exon/ Intron	Veränderung	Aminosäure- Austausch	SNP	n
SHH	5'UTR	c125G>A		rs9333594	33
SHH	Exon 3	c.570G>A	p.(=)	rs9333633	33
SHH	Exon 3	c.1232G>C	p.G411A		33
SHH	Exon 3	c.1275T>C	p.(=)		33
SHH	3'UTR	c.*50C>G			33

c: coding region; SNP: <u>single n</u>ucleotide <u>p</u>olymorphism; rs-Nr: <u>R</u>eferenznummer des <u>S</u>NP in der Gendatenbank Ensembl; n: Anzahl der untersuchten Patienten; UTR: <u>unt</u>ranslated <u>r</u>egion; Buchstaben (Veränderung): DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); p: protein; p.(=): kein Aminosäureaustausch; Buchstaben (Aminosäureaustausch): Buchstaben Code der Aminosäuren (siehe Abkürzungsverzeichnis)

4.1.1.2.1 Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im SHH-Gen

In der folgenden Tabelle 4.2 sind die Häufigkeiten der gefundenen Veränderungen im *SHH*-Gen angegeben. Hierbei wurden die Häufigkeiten in der Normalbevölkerung für das erste und das zweite Allel aus der Datenbank Ensembl entnommen. Aus diesem Grund sind nur Daten für diejenigen Veränderungen, die in Ensembl erfasst sind, vorhanden.

Tabelle 4.2: Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im *SHH*-Gen; Vergleich der Allelhäufigkeit in der Normalbevölkerung und der untersuchten Patientenkohorte

Veränderung (SNP)	Häufigkeit in der Normalbevölkerung für das 1.Allel	Häufigkeit in der Normalbevölkerung für das 2.Allel	gefundene Häu- figkeit in der untersuchten Patientenkohorte für das 1.Allel	gefundene Häu- figkeit in der untersuchten Patientenkohorte für das 2.Allel
c125G>A (<i>rs9333594</i>)	ca. 94% (G)	ca. 6 % (A)	95,5% (63)	4,5% (3)
c.570G>A (<i>rs9333633</i>)	ca. 99% (G)	ca. 1% (A)	98,5% (65)	1,5% (1)
c.1232G>C	/	/	98,5% (65)	1,5% (1)
c.1275T>C	/	/	98,5% (65)	1,5% (1)
c.*50C>G	/	/	98,5% (65)	1,5% (1)

SNP: single nucleotide polymorphism; rs-Nr: Referenznummer des SNP in der Gendatenbank Ensembl; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); in Klammer angegebene Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin) steht für das jeweils gemeinte Allel; in Klammer angegebene Zahl: gefundene Allelhäufigkeit in der untersuchten Patientenkohorte; /: Daten in Gendatenbank Ensembl nicht vorhanden

4.1.1.2.2 In-silico-Analyse der Sequenzveränderungen im SHH-Gen

Mit Hilfe sieben verschiedener Programme wurden die gefundenen Veränderungen im *SHH*-Gen untersucht. Es wurde analysiert, ob sich durch den Basenaustausch die Funktion des Proteins verändert hat, ob mögliche pathogene Modifizierungen stattgefunden haben und ob es zu einer Veränderung der Spleißstellen gekommen ist.

In der folgenden Tabelle 4.3 sind die Ergebnisse der Untersuchungen mittels der Programme "NetGene2 Server", "The National Research Council" und "Mutationtaster" aufgeführt. Alle drei Programme untersuchen die Veränderungen darauf hin, ob es zu einer Änderung im Spleißverhalten kommt. Das Programm "NetGene2 Server" analysiert die eingegebene Sequenz darauf hin, ob durch die Veränderung eine neue Spleißstelle im Vergleich zur Normalsequenz entsteht bzw. ob eine natürliche Spleißstelle abgeschwächt oder zerstört wird.

Des Weiteren wurde vom "The National Research Council – Institute for Biomedical Technologies" ein Programm entwickelt, mit dessen Hilfe von der Normalsequenz abweichende Spleißstellen analysiert werden können.

Das Programm "Mutationtaster" macht eine Aussage zu einer möglichen Spleißstellenveränderung. Hierzu benutzt "Mutationtaster" ein Programm namens "Splice sites" von Berkeley Drosophila Genome Project. Die Vorhersage für den Wildtyp (wt) und die Veränderung (mu) in Bezug auf die Spleißstellenveränderung sind dort eingetragen.

Tabelle 4.3: Ergebnisse der Untersuchung auf Spleißstellenveränderung im SHH-Gen durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme

Veränderung (SNP)	NetGene2 Server	The National Research Council - Institute for Biomedical Technologies	Mutationtaster
c.570G>A (<i>rs9333633</i>)	/	/	wt: 0.95 / mu: 0.956
c.1232G>C	/	/	wt: 0.96 / mu: 0.98
c.1275T>C	/	/	/

SNP: <u>single n</u>ucleotide polymorphism; rs-Nr: <u>R</u>eferenznummer des <u>S</u>NP in der Gendatenbank Ensembl; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); wt: Wildtyp; mu: Mutation; /: keine Veränderungen

In der Tabelle 4.4 sind die Ergebnisse der Analyse der Programme "Mutationtaster", "Polyphen2", "PANTHER", "SIFT HumanProtein" und "SNAP" zusammengefasst. Alle vier Programme untersuchen die Veränderung im Vergleich zum Wildtyp auf Variationen in der Proteinfunktion.

Das Programm "Mutationtaster" macht eine Vorhersage darüber, ob es sich bei einem Aminosäure-Austausch um einen Polymorphismus ("polymorphism") oder eine potenziell krankheitsverursachende Veränderung ("disease causing") handelt. Dieses Ergebnis gibt "Mutationtaster" mit einer Zahl zwischen null und eins an und quantifiziert damit die Wahrscheinlichkeit der Aussage. "Polyphen2" ist ein Programm, das die Aminosäureveränderung auf Struktur- und Funktionsänderungen des Proteins hin analysiert. Das Ergebnis dieser Untersuchung wird mit einer Zahl zwischen null und eins angegeben, welche die Wahrscheinlichkeit angibt, dass das Ergebnis zutrifft. Außerdem werden Sensitivität und Spezifität des Ergebnisses mitgeteilt.

Das Programm "PANTHER" untersucht die eingegebene Sequenz im Vergleich zur Wildtypsequenz auf Veränderungen der Funktion. Dieses Ergebnis wird durch den Wert des "subPSEC" angegeben. Der "subPSEC"-Wert wird mit einer Zahl zwischen 0 bis -10 angezeigt. Die Zahl 0 wird angegeben, wenn es zu keiner funktionellen Änderung gekommen ist (neutral). Die Zahl -10 gibt an, dass eine störende Wirkung auf die Funktion sehr wahrscheinlich ist. Die Zahl -3 als "subPSEC"-Wert wird hier als Grenze für die funktionelle Bedeutung angesehen. Der Wert "Pdeleterious" ist lediglich eine andere Darstellung des Ergebnisses, ein "subPSEC"-Wert von -3 entspricht dem "Pdeleterious" Wert von 0,5.

"SIFT Human Protein" ist ein Programm, das ebenfalls die funktionelle Veränderung des Proteins untersucht. Der "SIFT Score" wird mit einer Zahl zwischen 0 und 1 angegeben. Der Aminosäure-Austausch wird als schädlich vorhergesagt, wenn der "SIFT Score" kleiner oder gleich 0,05 ist und wird geduldet, wenn der "SIFT Score" größer als 0,05 ist.

Die Programme "PANTHER" und "SIFT Human Protein" können nur Aussagen über Veränderungen machen, welche im kodierenden Bereich des Gens liegen.

Das Programm "SNAP" macht eine Voraussage über den Effekt eines Aminosäure-Austauschs auf die Proteinfunktion. Wenn die Voraussage (engl. prediction) als "neutral" angegeben wird, bedeutet dies, dass keine funktionellen Unterschiede zum Wildtypprotein erwartet werden. Anderenfalls kommt es zu der Voraussage nicht-neutral (non-neutral). Der "Reliability-Index" gibt die Zuverlässigkeit des Ergebnisses an. Dieser Wert wird mit einer Zahl zwischen 0 (niedrige Verlässlichkeit) und 9 (hohe Verlässlichkeit) angegeben. Der "Expected-Accuracy"-Wert gibt die erwartete Genauigkeit des Ergebnisses in Prozent an. Ein hoher "Reliability-Index" korreliert stark mit einem hohen "Expected-Accuracy"-Wert.

Die beiden Programme "Polyphen2" und "SNAP" können nur eine Vorhersage treffen, wenn ein Aminosäure-Austausch (Missense-Mutation) stattgefunden hat.

Die sieben genannten Programme werden bei jedem der nun folgenden aufgeführten und untersuchten Gene zur Analyse der gefundenen Veränderungen eingesetzt.

Tabelle 4.4: Ergebnisse der Untersuchung auf Funktionsänderung und Strukturveränderung im *SHH*-Gen durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme

Verände- rung (SNP)	Mutationtas- ter	Polyphen2	PAN- THER	SIFT Human Protein	SNAP
c.570G>A (<i>rs9333633</i>) p.(=)	Disease caus- ing probabil- ity: 0.99	/	_	_	/
c.1232G>C p.G411A	Polymorphism probability: 0.99	benign (score of 0.049; sensitivity: 0.95; specificity: 0.82)	/	SIFT Score 0,64 Prediction: Tolerated	Prediction: neutral Reliability Index: 0 Expected Ac- curacy: 53%

SNP: <u>single n</u>ucleotide polymorphism; rs-Nr: <u>R</u>eferenznummer des <u>S</u>NP in der Gendatenbank Ensembl; - : Veränderung liegt nicht im kodierenden Bereich, dies ist aber eine Voraussetzung für die Programme PANTHER und SIFT Human Protein; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); /: keine Veränderung; p: protein; p.(=): kein Aminosäureaustausch; Buchstaben (Aminosäureaustausch): Buchstaben Code der Aminosäuren (siehe Abkürzungsverzeichnis)

4.1.2 Mutationsanalyse des CNPY1-Gens

4.1.2.1 PCR-Amplifikation sämtlicher Exons des CNPY1-Gens

Das *CNPY1*-Gen besteht aus vier Exons. Der kodierende Bereich erstreckt sich von Exon 2 bis Exon 4. Für die PCR-Amplifikation wurde für jedes der vier Exons ein Primerpaar mit Hilfe des Programms Primer3Plus generiert. Bei Exon 1 bis 3 des *CNPY1*-Gens liegen diese Primerpaare in den jeweils anliegenden Intronbereichen. Für Exon 4 wurde der reverse Primer so gewählt, dass er sich noch innerhalb des Exons, aber weit hinter dem Stoppcodon befindet. Nach der PCR-Amplifikation wurden die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (s. Abb. 4.2), nach der Größe überprüft, aufgereinigt und sequenziert.



Abbildung 4.2: Darstellung eines Agarosegels nach Färbung in Ethidiumbromid mit unterschiedlich großen PCR-Produkten der vier Exons des *CNPY1*-Gens

Das Bild zeigt ein 2%-iges Agarosegel auf das jeweils 10 µl der PCR-Produkte aufgetragen wurden. Rechts wurde ein Größenstandard (100 Bp-Leiter) aufgetragen.

4.1.2.2 DNA-Sequenzanalyse des CNPY1-Gens

Alle fünf gefundenen Sequenzvarianten in den vier Exons des *CNPY1*-Gens sind bereits in der Datenbank Ensembl annotiert und werden als "single nucleotide polymorphisms" (SNP) auch in der Datenbank dbSNP unter rs-Nummern erfasst.

In Tabelle 4.5 sind die einzelnen Veränderungen mit der dazugehörigen rs-Nr. aufgetragen.

Gen	Exon/ Intron	Veränderung	Aminosäure- Austausch	SNP	n
CNPY1	5'UTR	c240T>C		rs1863038	33
CNPY1	5'UTR	c191A>G		rs1863039	33
CNPY1	Intron 1	c61+27C>G		rs2098797	33
CNPY1	Exon 2	c49T>C		rs6947243	33
CNPY1	Exon 2	c.16C>G	p.L6V	rs73163379	33

Tabelle 4.5: Identifizierte Sequenzvarianten im CNPY1-Gen bei 33 untersuchten Patienten

c: coding region; SNP: <u>single n</u>ucleotide polymorphism; rs-Nr: <u>R</u>eferenznummer des <u>SNP</u> nach der Gendatenbank Ensembl; n: Anzahl der untersuchten Patienten; UTR: <u>unt</u>ranslated <u>region</u>; Buchstaben (Veränderung): DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); p: protein; Buchstaben (Aminosäureaustausch): Buchstaben Code der Aminosäuren (siehe Abkürzungsverzeichnis)

4.1.2.2.1 Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im CNPY1-Gen

Die Häufigkeiten der Sequenzvarianten in der Normalbevölkerung wurden der dbSNP Datenbank entnommen. Als erstes Allel wurde die Base bezeichnet, welche nach dem Programm *Sequence Pilot*[©] nicht als Veränderung angezeigt wurde (s. Tab. 4.6). Da 33 Patienten auf Veränderungen im *CNPY1*-Gen untersucht wurden, sind jeweils 66 Allele gefunden worden.

Veränderung (SNP)	Häufigkeit in der Normalbevölkerung für das 1.Allel	Häufigkeit in der Normalbevölkerung für das 2.Allel	gefundene Häu- figkeit in der untersuchten Patientenkohorte für das 1.Allel	gefundene Häu- figkeit in der untersuchten Patientenkohorte für das 2.Allel
c240T>C (<i>rs1863038</i>)	ca. 8% (T)	ca. 92% (C)	54% (36)	45% (30)
c191A>G (<i>rs1863039</i>)	ca. 79% (A)	ca. 21% (G)	84,8% (56)	15,2% (10)
c61+27C>G (<i>rs2098797</i>)	ca. 92% (C)	ca. 8% (G)	51,5% (34)	48,5% (32)
c49T>C (<i>rs</i> 6947243)	ca. 74% (T)	ca. 26% (C)	80% (53)	20% (13)
c.16C>G (<i>rs73163379</i>)	ca. 98% (C)	ca. 2% (G)	98,5% (65)	1,5% (1)

Tabelle 4.6: Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im *CNPY1*-Gen; Vergleich der Allelhäufigkeit in der Normalbevölkerung und der untersuchten Patientenkohorte

SNP: single nucleotide polymorphism; rs-Nr: <u>Referenznummer des SNP</u> nach der Gendatenbank Ensembl; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); in Klammer angegebene Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin) steht für das jeweils gemeinte Allel; in Klammer angegebene Zahl: gefundene Allelhäufigkeit in der untersuchten Patientenkohorte

4.1.2.2.2 In-silico-Analyse der Sequenzveränderungen im CNPY1-Gen

Die gefundenen Veränderungen im *CNPY1*-Gen wurden mittels sieben verschiedener webbasierter Vorhersage-Programme analysiert. Untersucht wurde, ob sich durch den stattgefundenen Basenaustausch die Funktion oder die Struktur des Proteins verändert hat und ob es zu einer Veränderung der Spleißstellen gekommen ist.

In Tabelle 4.7 und 4.8 sind die Ergebnisse der Untersuchungen mit Hilfe der Vorhersage-Programme dargestellt.

Veränderung (SNP)	NetGene2 Server	The National Research Council - Institute for Biomedical Technologies	Mutationtaster
c240T>C (<i>rs1863038</i>)	/	/	/
c191A>G (<i>rs1863039</i>)	/	/	/
c61+27C>G (<i>rs2098797</i>)	/	/	wt: 0.27 / mu: 0.72
c.16C>G (<i>rs73163379</i>)	/	/	wt: 0.83 / mu: 0.99

Tabelle 4.7: Ergebnisse der Untersuchung auf Spleißstellenveränderung im *CNPY1*-Gen durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme

SNP: <u>single n</u>ucleotide polymorphism; rs-Nr: <u>R</u>eferenznummer des <u>S</u>NP nach der Gendatenbank Ensembl; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); wt: Wildtyp; mu: Mutation; /: keine Veränderungen

Tabelle 4.8: Ergebnisse der Untersuchung auf Funktionsänderung und Strukturveränderung im *CNPY1*-Gen durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme

Verände- rung (SNP)	Mutationtas- ter	Polyphen2	PAN- THER	SIFT Human Protein	SNAP
c.16C>G (<i>rs73163379</i>) p.L6V	Disease causing probability: 0.59	probably damag- ing with a score of 0.998 (sensitivity: 0.27; specificity: 0.99)	subPSEC: -4.40964 P _{deleterious} : 0.80371	SIFT Score: 0,2 Prediction: Tolerated	Prediction: neutral Reliability Index: 1 Expected Accu- racy: 60%

SNP: <u>single nucleotide polymorphism; rs-Nr: Referenznummer des SNP nach der Gendatenbank Ensembl; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); p: protein; Buchstaben (Aminosäureaustausch): Buchstaben Code der Aminosäuren (siehe Abkürzungsverzeichnis)</u>

4.1.3 Mutationsanalyse des *EN2*-Gens

4.1.3.1 PCR-Amplifikation sämtlicher Exons des EN2-Gens

EN2 besteht aus zwei Exons. Für die PCR-Amplifikation wurde Exon 1 in zwei Teile aufgeteilt (Exon 1.1 und Exon 1.2). Der reverse Primer von Exon 2 liegt im nichtkodierenden Bereich des Exons, da es nur einen kleinen kodierenden Bereich enthält. Nach der PCR-Amplifikation der einzelnen Exons wurden die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (s. Abb. 4.3), nach der Größe überprüft, aufgereinigt und sequenziert.



Abbildung 4.3: Darstellung eines Agarosegels nach Färbung mit Ethidiumbromid mit unterschiedlich großen PCR-Produkten der zwei Exons des *EN2*-Gens

Das Bild zeigt ein 2%-iges Agarosegel auf das jeweils 10 µl der PCR-Produkte aufgetragen wurden. Rechts wurde ein Größenstandard (100 Bp-Leiter) aufgetragen.

4.1.3.2 DNA-Sequenzanalyse des EN2-Gens

In der DNA-Sequenzanalyse fanden sich sechs verschiedene Veränderungen bei den untersuchten Patienten. Diese sind in Tabelle 4.9 aufgelistet. Alle gefundenen Veränderungen sind in der Gendatenbank Ensembl als Polymorphismen mit einer rs-Nummer annotiert.

Gen	Exon/ Intron	Veränderung	Aminosäure- Austausch	SNP	n
EN2	Exon 1	c.28G>C	p.E10Q	rs193264681	33
EN2	Exon 1	c.111G>A	p.(=)	rs77846527	33
EN2	Exon 1	c.361C>T	p.L121F	rs3735653	33
EN2	Exon 2	c.720G>A	p.(=)	rs145749730	33
EN2	Exon 2	c.952T>C	p.(=)	rs2361689	33
EN2	3'UTR	c.*3C>T		rs12674067	33

Tabelle 4.9: Identifizierte Sequenzvarianten im EN2-Gen bei 33 untersuchten Patienten

c: coding region; SNP: <u>single n</u>ucleotide polymorphism; rs-Nr: <u>R</u>eferenznummer des <u>S</u>NP nach der Gendatenbank Ensembl; n: Anzahl der untersuchten Patienten; UTR: <u>unt</u>ranslated region; Buchstaben (Veränderung): DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); p: protein; p.(=): kein Aminosäureaustausch; Buchstaben (Aminosäureaustausch): Buchstaben Code der Aminosäuren (siehe Abkürzungsverzeichnis)

4.1.3.2.1 Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im EN2-Gen

In der folgenden Tabelle 4.10 sind die Häufigkeiten der einzelnen Veränderungen im *EN2*-Gen aufgelistet. Die Häufigkeiten in der Normalbevölkerung für die Veränderungen wurden der Gendatenbank Ensembl entnommen.

Ver- änderung (SNP)	Häufigkeit in der Normalbevölkerung für das 1.Allel	Häufigkeit in der Normalbevölkerung für das 2.Allel	gefundene Häu- figkeit in der untersuchten Patientenkohorte für das 1.Allel	gefundene Häu- figkeit in der untersuchten Patientenkohorte für das 2.Allel
c.28G>C (<i>rs193264681</i>)	ca. 99% (G)	ca. 1% (C)	98,5% (65)	1,5% (1)
c.111G>A (<i>rs7</i> 7846527)	ca. 88% (G)	ca. 12% (A)	93,9% (62)	6,1% (4)
c.361C>T (<i>rs3735653</i>)	ca. 50% (C)	ca. 50% (T)	39,4% (26)	60,6% (40)
c.720G>A (<i>rs145749730</i>)	ca. 99,9% (G)	ca. 0,1% (A)	98,5% (65)	1,5% (1)
c.952T>C (<i>rs2361689</i>)	ca. 64% (T)	ca. 36% (C)	65,1% (43)	34,9% (23)
c.*3C>T (<i>rs12674067</i>)	ca. 94,2% (C)	ca. 5,8% (T)	93,9% (62)	6,1% (4)

Tabelle 4.10: Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im *EN2*-Gen; Vergleich der Allelhäufigkeit in der Normalbevölkerung und der untersuchten Patientenkohorte

SNP: <u>single n</u>ucleotide polymorphism; rs-Nr: <u>R</u>eferenznummer des <u>SNP</u> nach der Gendatenbank Ensembl; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); in Klammer angegebene Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin) steht für das jeweils gemeinte Allel; in Klammer angegebene Zahl: gefundene Allelhäufigkeit in der untersuchten Patientenkohorte

4.1.3.2.2 In-silico-Analyse der Sequenzveränderungen im EN2-Gen

Die Ergebnisse der Vorhersage-Programme für die gefundenen Veränderungen im *EN2*-Gen sind in den Tabellen 4.11 und 4.12 zusammengefasst.

Veränderung (SNP)	NetGene2 Server	The National Research Council - Institute for Biomedical Technologies	Mutationtaster
c.28G>C (<i>rs193264681</i>)	/	/	wt: 0.65 / mu: 0.72
c.111G>A (<i>rs</i> 77846527)	/	/	wt: 0.64 / mu: 0.79
c.361C>T (<i>rs3735653</i>)	/	/	wt: 0.27 / mu: 0.33
c.720G>A (<i>rs145749730</i>)	/	/	wt: 0.38 / mu: 0.75
c.*3C>T (<i>rs12674067</i>)	/	/	wt: 0.84 / mu: 0.95

Tabelle 4.11: Ergebnisse der Untersuchung auf Spleißstellenveränderung im *EN2*-Gen durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme

SNP: <u>single n</u>ucleotide polymorphism; rs-Nr: <u>R</u>eferenznummer des <u>S</u>NP nach der Gendatenbank Ensembl; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); wt: Wildtyp; mu: Mutation; /: keine Veränderungen

Tabelle 4.12: Ergebnisse der Untersuchung auf Funktionsänderung und Strukturveränderung im *EN2*-Gen durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme

Verände- rung (SNP)	Mutation- taster	Polyphen2	PANTHER	SIFT Hu- man Pro- tein	SNAP
c.28G>C (<i>rs193264681</i>) p.E10Q	Polymor- phism probabili- ty: 0.99	score is not available	subPSEC: -1.74248 P _{deleterious} : 0.2214	SIFT Score 0,05 Prediction: Damaging	Prediction: neu- tral Reliability Index: 1 Expected Accuracy: 60%
c.361C>T (<i>rs3735653</i>) p.L121F	Polymor- phism probabili- ty: 0.6	possibly dam- aging (score of 0.605, sensitiv- ity:0.88; speci- ficity: 0.91)	subPSEC: -1.65383 P _{deleterious} : 0.2065	SIFT Score 0,71 Prediction: Tolerated	Prediction: neu- tral Reliability Index: 1 Expected Accuracy: 60%
c.952T>C (<i>rs2361689</i>) p.(=)	Disease causing probabili- ty: 0.7	/	silent mutation	SIFT Score 1 Prediction: Tolerated	/

SNP: <u>single n</u>ucleotide polymorphism; rs-Nr: <u>R</u>eferenznummer des <u>S</u>NP nach der Gendatenbank Ensembl; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); /: keine Veränderungen; p: protein; p.(=): kein Aminosäureaustausch; Buchstaben (Aminosäureaustausch): Buchstaben Code der Aminosäuren (siehe Abkürzungsverzeichnis)

4.2 Mutationsanalyse von PFN1

Die Mutationsanalyse von *PFN1* wurde mittels genomischer DNA von 55 verschiedenen Patienten durchgeführt. Die Patienten hatten neben einer Kleinhirnhypoplasie zusätzlich eine Corpus callosum Hypoplasie oder eine kortikale Gyrierungsstörung.

Da bei einigen Patienten nicht genügend genomische DNA zur Verfügung stand, wurde diese mittels GenomiPhi DNA Amplification Kit amplifiziert, nach Bestimmung der Konzentration verdünnt und für die PCR-Amplifikation der einzelnen Exons von *PFN1* verwendet.

4.2.1 PCR-Amplifikation sämtlicher Exons des PFN1-Gens

PFN1 besteht aus drei kodierenden Exons. Nach der PCR-Amplifikation der einzelnen Exons wurden die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen (s. Abb. 4.4), nach der Größe überprüft, aufgereinigt und sequenziert.



Abbildung 4.4: Darstellung eines Agarosegels nach Färbung mit Ethidiumbromid mit unterschiedlich großen PCR-Produkten der drei Exons des *PFN1*-Gens

Das Bild zeigt ein 2%-iges Agarosegel auf das jeweils 10 µl der PCR-Produkte aufgetragen wurden. Links und rechts wurde ein Größenstandard (100 Bp-Leiter) aufgetragen.

4.2.2 DNA-Sequenzanalyse des PFN1-Gens

In der DNA-Sequenzanalyse der einzelnen Exons von *PFN1* der verschiedenen Patienten wurden zwei Sequenz-Veränderungen beobachtet. Beide Veränderungen sind in der Gendatenbank Ensembl als Polymorphismus mit einer dazugehörigen rs-Nummer eingetragen (s. Tab. 4.13).

Gen	Exon/ Intron	Veränderung	Aminosäure- Austausch	SNP	n	
PFN1	Exon 3	c.334C>T	p.(=)	rs13204	55	
PFN1	3'UTR	c.*108T>C		rs113941832	55	

Tabelle 4.13: Identifizierte Sequenzvarianten im PFN1-Gen bei 55 untersuchten Patienten

c: coding region; SNP: single nucleotide polymorphism; rs-Nr: Referenznummer des SNP in der Gendatenbank Ensembl; n: Anzahl der untersuchten Patienten; UTR: untranslated region; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); p: protein; p.(=): kein Aminosäureaustausch

4.2.2.1 Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im PFN1-Gen

In der folgenden Tabelle 4.14 sind die Häufigkeiten der beiden Veränderungen im *PFN1*-Gen für die Normalbevölkerung und die untersuchte Gruppe aufgeführt. Die Häufigkeiten in der Normalbevölkerung wurden der Gendatenbank Ensembl entnommen.

Tabelle 4.14: Häufigkeiten der gefundenen Sequenzvarianten im *PFN1*-Gen; Vergleich der Allelhäufigkeit in der Normalbevölkerung und der untersuchten Patientenkohorte

Veränderung (SNP)	Häufigkeit in der Normalbevölkerung für das 1.Allel	Häufigkeit in der Normalbevölkerung für das 2.Allel	gefundene Häu- figkeit in der untersuchten Patientenkohorte für das 1.Allel	gefundene Häu- figkeit in der untersuchten Patientenkohorte für das 2.Allel
c.334C>T (<i>rs13204</i>)	ca. 97% (C)	ca. 3% (T)	96,4% (106)	3,6% (4)
c.*108T>C (<i>rs113941832</i>)	/	/	99,1% (109)	0,9% (1)

SNP: single nucleotide polymorphism; rs-Nr: Referenznummer des SNP nach der Gendatenbank Ensembl; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); in Klammer angegebene Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin) steht für das jeweils gemeinte Allel; in Klammer angegebene Zahl: gefundene Allelhäufigkeit in der untersuchten Patientenkohorte; /: Daten in Gendatenbank Ensembl nicht vorhanden 4.2.2.2 In-silico-Analyse der Sequenzveränderungen im PFN1-Gen

Die Ergebnisse der Vorhersage-Programme für die gefundenen Veränderungen im *PFN1*-Gen sind in den Tabellen 4.15 zusammengefasst.

Tabelle 4.15: Ergebnisse der Untersuchung auf Spleißstellenveränderung im *PFN1*-Gen durch die gefundenen Sequenzveränderungen mittels verschiedener Programme

Veränderung (SNP)	NetGene2 Server	The National Research Council - Institute for Biomedical Technologies	Mutationtaster
c.334C>T (<i>rs13204</i>)	/	/	wt: 0.94 / mu: 0.92
c.*108T>C (<i>rs113941832</i>)	/	/	wt: 0.40 / mu: 0.41

SNP: <u>single n</u>ucleotide polymorphism; rs-Nr: <u>R</u>eferenznummer des <u>S</u>NP nach der Gendatenbank Ensembl; Buchstaben: DNA-Basen-Abkürzung (A:Adenin, T:Thymin, G:Guanin, C:Cytosin); wt: Wildtyp; mu: Mutation; /: keine Veränderung

5 <u>Diskussion</u>

In der Doktorarbeit von Frau Magdalena Mermela fand sich bei einem Patienten mit einer milden Dandy-Walker-Malformation und Kleinhirnwurmhypoplasie eine *de novo* reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 7. Die identifizierte Bruchpunktregion auf Chromosom 7 wurde in 7q36.3 feinkartiert (s. Abb. 2.6). In der Nähe der gefundenen Bruchpunktregion liegen die drei Gene *SHH* (1,15 Mb entfernt), *CNPY1* (1,4 Mb entfernt) und *EN2* (1,5 Mb entfernt). Diese sind nicht direkt vom Bruchereignis des Chromosoms 7 betroffen, es wird aber ein möglicher Positionseffekt diskutiert. Durch die Translokation könnten Kontrollelemente der genannten Gene verändert bzw. entfernt worden sein.

Das *Cnpy1*-Gen wird in Zebrafischembryonen im Isthmusbereich (Übergangsregion zwischen Mesencephalon und Rhombencephalon) spezifisch exprimiert und wirkt bei der Entstehung von Tectum und Kleinhirn mit. Aufgrund dieser Tatsache wurde das *CNPY1*-Gen in die Gruppe der zu untersuchenden Kandidatengene integriert. CNPY1 wird einerseits durch den FGF-Signalweg im Isthmusbereich induziert und ist andererseits essentiell für den FGF-Signalweg. Durch die Ausschaltung von *Cnpy1* kommt es zu einer gestörten Kleinhirnausbildung, einer anormalen Ausprägung des Isthmusbereiches und einer Beeinträchtigung des FGF-Signalweges (Hirate und Okamoto 2006). Bei der Differenzierung, Proliferation und Migration von Zellen ist der FGF-Signalweg mit einbezogen. Diese Erkenntnisse sprechen dafür, dass Mutationen im *CNPY1*-Gen zu einer Kleinhirnaffektion führen können.

Im Rahmen der Mutationsanalyse des *CNPY1*-Gens bei 33 Patienten mit Kleinhirnfehlbildungen konnten bei einigen Patienten fünf Sequenzvarianten in heterozygotem Zustand identifiziert werden. Alle fünf gefundenen Varianten sind bereits in der SNP-Datenbank dbSNP erfasst (s. Tab. 4.5). Bereits in der SNP-Datenbank erfasste SNPs sind mit großer Wahrscheinlichkeit nicht pathogen, dies zeigt sich ebenfalls durch die Allelhäufigkeit. Bei vier der gefundenen fünf Veränderungen ergab die Analyse mittels der Vorhersage-Programme, dass es sich jeweils mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit um Polymorphismen handelt, die weder eine Funktionsänderung des Proteins noch eine Spleißstellenveränderung hervorrufen (s. Tab. 4.6 bis 4.8). Bei der Sequenzänderung c.16C>G im Exon 2 des *CNPY1*-Gens kommt es zu einem Aminosäure-Austausch: die

Aminosäure Valin wird statt der Aminosäure Leucin (L) an Position 6 des CNPY1-Proteins (p.L6V) eingebaut. Die Untersuchung mittels der Vorhersage-Programme ergab eine mögliche krankheitsverursachende Wirkung mit einer Wahrscheinlichkeit von 59% laut "Mutationtaster" (s. Tab. 4.7) und 99% nach "Polyphen2" (s. Tab. 4.8). Das Programm "PANTHER" ermittelte ebenfalls eine Veränderung der Proteinfunktion und gab diese mit einem "subPSEC"-Wert von -4,4 an (-3 gilt hier als Grenze für die funktionelle Bedeutung) (s. Tab. 4.8). Diese Ergebnisse lassen vermuten, dass es sich hierbei um eine die Funktion des Proteins beeinflussende Veränderung handelt, die möglicherweise krankheitsmitverursachend sein kann. Die anderen Vorhersage-Programme konnten keine Veränderung der Spleißstellen oder der Proteinfunktion ermitteln (s. Tab. 4.7 und 4.8). Die Veränderung c.16C>G konnte bei einem Patienten (H6) heterozygot festgestellt werden. Zur Bestätigung einer Neumutation müssten die Eltern des Patienten untersucht werden. Diese Veränderung im CNPY1-Gen wurde bereits bei drei Personen von 634 Kontrollpersonen im Rahmen einer Exomsequenzierung beobachtet und in die dbSNP-Datenbank als Polymorphismus aufgenommen (rs73163379). Da die Veränderung mit einer sehr niedrigen Frequenz nur bei drei Personen beobachtet wurde, könnte es sich dennoch um eine krankheitsverursachende Mutation handeln, die mit der DWM bei diesem Patienten in Assoziation zu bringen ist. Es wäre möglich, dass die drei Personen des Kontrollkollektivs ebenfalls eine Variante aus dem DWM-Spektrum haben, ohne dass sich dies klinisch manifestiert.

Das SHH-Protein spielt eine essentielle Rolle bei der Entwicklung von Form und Größe des Kleinhirns und wurde deshalb als vielversprechendes Kandidatengen aufgenommen. SHH induziert die Proliferation der Körnervorläuferzellen, indem es über einen Signalweg Gene des Zellzyklus reguliert (s. Abb. 2.7). Zudem wird vermutet, dass SHH bei der Entstehung der Dandy-Walker-Malformation eine Rolle spielt, wobei die beiden Transkriptionsfaktoren ZIC1 und ZIC4 mit einbezogen sind und eine SHH-abhängige Funktion haben (Vaillant und Monard 2009). Dies unterstützt die These, dass bei dem Patienten mit der reziproken Translokation zwischen den Chromosomen 4 und 7 die Expression von SHH durch einen Positionseffekt verändert sein könnte und dadurch die Kleinhirnentwicklung beeinträchtigt werden könnte. Unsere Vermutung wird ebenfalls durch die Aussagen der Arbeit von Lettice et al. (2003) unterstützt, die sich mit dem *LMBR1*-Gen befasst. Das *LMBR1*-Gen liegt ebenfalls in 7q36.3 und somit in der Nähe der gefundenen Bruchpunktregion. Veränderungen im *LMBR1*-Gen wurden bereits mit mehreren Erkrankungen in Verbindung gebracht, unter anderem mit der präaxiale Poly-

daktylie (Vielfingerigkeit). Weitere Untersuchungen ergaben, dass die gefundene Mutation bei Patienten mit Polydaktylie zwar im Intron 5 des *LMBR1*-Gens liegt, aber ein regulatorisches Element (Enhancer) des 1 Mb entfernten *SHH*-Gens darstellt (Lettice et al. 2003). Dies zeigt, wie vielfältig die Funktionen des *SHH*-Gens sind und dass regulatorische Elemente, selbst wenn sie weit vom Zielgen entfernt liegen, einen großen Einfluss auf dessen Funktion bzw. Expression haben.

Bei der Sequenzanalyse des *SHH*-Gens wurden fünf Veränderungen bei 33 Patienten mit Kleinhirnfehlbildungen nachgewiesen. Zwei dieser Veränderungen sind bereits in der dbSNP-Datenbank erfasst, die verbleibenden drei sind nicht in der Datenbank verzeichnet (s. Tab. 4.1). Die Überprüfung der Sequenzvarianten mittels der Vorhersage-Programme ergab bei der Veränderung c.570G>A, welche in der dbSNP-Datenbank bereits als Polymorphismus mit einer Frequenz von ca. 1% in der Normalbevölkerung (s. Tab. 4.2) erfasst ist (*rs933633*), laut "Mutationtaster" mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% eine mögliche krankheitsverursachende Wirkung (s. Tab. 4.3). Die restlichen Vorhersage-Programme postulieren keine Änderung der Proteinfunktion oder der Spleißstellen für die Veränderung zu keinem Aminosäure-Austausch [p.(=)]. Die Ergebnisse deuten darauf hin, dass es sich bei c.570G>A um einen Polymorphismus und bei der Vorhersage des Mutationtaster-Programms um eine Fehlkalkulation handelt. Bei den restlichen Veränderungen ergaben die Untersuchungen keinen Verdacht auf eine potentielle pathogene Auswirkung der Sequenzveränderungen (s. Tab. 4.3) und 4.4).

Das EN2-Protein spielt eine kritische Rolle während der embryonalen Entwicklung und der Foliation des Kleinhirns (Millen et al. 1994). Es wird spekuliert, dass eine Mutation oder Deletion von *EN2* beim Menschen zur Entwicklung einer Kleinhirnhypoplasie führt (Sarnat et al. 2002). Diese Vermutungen und die Nähe zur beschriebenen Bruchpunktregion bestärkten uns, das *EN2*-Gen als aussichtsreiches Kandidatengen bei Patienten mit Kleinhirnfehlbildungen zu untersuchen.

Im Zuge der Mutationsanalyse des *EN2*-Gens konnten sechs Sequenzvarianten nach Sequenzanalyse bei 33 Patienten mit Kleinhirnfehlbildungen identifiziert werden (s. Tab. 4.9). Davon liegen drei Veränderungen im Exon 1, zwei im Exon 2 und eine im 3'untranslatierten Bereich (c.*3C>T) von *EN2*. Alle sechs gefundenen Sequenzvarianten sind bereits in der dbSNP-Datenbank als häufig vorkommende Varianten mit einer Frequenz von >5% in der Normalbevölkerung eingetragen, was gegen eine krankheitsursächliche Wirkung spricht (s. Tab. 4.10). Die Veränderung c.28G>C (rs193264681) liegt in Exon 1 des EN2-Gens und führt zu einem Aminosäure-Austausch: die Aminosäure Glutamin (Q) wird statt der Aminosäure Glutaminsäure (E) (p.E10Q) an Position 10 des EN2-Proteins eingebaut. Das Programm "SIFT Human Protein" ermittelte eine schädliche Wirkung des Aminosäure-Austausches auf die Funktion des EN2-Proteins mit einem "SIFT Score" von 0,05 (s. Tab. 4.12). Ab einem "SIFT Score" von über 0,05 wird der Aminosäure-Austausch als nicht schädlich angesehen, daher ist die Verlässlichkeit dieser Vorhersage als nicht sehr hoch einzuschätzen. Die Analyse mittels der anderen Vorhersage-Programme ergab weder eine Änderung der Proteinfunktion noch der Spleißstellen (s. Tab. 4.11 und 4.12). Die Veränderung c.28G>C konnte bei einem Patienten (D9) heterozygot festgestellt werden. Die Ergebnisse lassen darauf schließen, dass es sich bei der Veränderung c.28G>C um einen Polymorphismus handelt. Die Veränderung c.952T>C in Exon 2 des EN2-Gens verursacht keinen Aminosäure-Austausch [p.(=)] und ist bereits in der dbSNP-Datenbank mit einer Frequenz von ca. 36% in der Normalbevölkerung erfasst (rs2361689) (s. Tab. 4.10). Laut "Mutationtaster" hat c.952T>C eine mögliche krankheitsverursachende Wirkung mit einer Wahrscheinlichkeit von 70% (s. Tab. 4.11). Alle anderen Vorhersage-Programme konnten keine Änderung der Proteinfunktion oder der Spleißstellen angeben (s. Tab. 4.11 und 4.12). Ähnlich stellt es sich bei der Veränderung c.361C>T in Exon 1 des EN2-Gens dar, die ebenfalls in der dbSNP-Datenbank mit einer Frequenz von über 40% in der Normalbevölkerung (s. Tab. 4.10) eingetragen (rs3735653) ist. Laut "Polyphen2" hat c.361C>T eine mögliche krankheitsverursachende Wirkung mit einer Wahrscheinlichkeit von 60% (s. Tab. 4.12). Die restlichen Programme postulieren keine Änderungen (s. Tab. 4.11 und 4.12). Diese Ergebnisse deuten daraufhin, dass es sich bei beiden Veränderungen (c.952T>C und c.361C>T) um einen Polymorphismus handelt. Die Überprüfung der übrigen drei (c.111G>A (rs77846527), c.720G>A (rs145749730) und c.*3C>T (rs12674067)) gefundenen Sequenzveränderungen im EN2-Gen ergab hinsichtlich veränderter Spleißstellen und potentieller Funktionsänderungen keinen Anhalt auf pathogene Eigenschaften (s. Tab. 4.11 und 4.12). Die Resultate lassen darauf schließen, dass die gefundenen Sequenzvarianten im EN2-Gen nicht als Hauptursache der bestehenden Krankheitsbilder bei den Patienten anzusehen sind.

Das NOM1-Gen ("nucleolar protein with MIF4G domain 1") liegt in der identifizierten Bruchpunktregion auf Chromosom 7 und könnte durch die Translokation unterbrochen worden sein. Es besteht aus 11 Exons und kodiert für ein Protein, das bei der Initiation der Translation eine Rolle spielt und beim Abbau fehlerhafter Translationsprodukte beteiligt ist. NOM1 kommt überwiegend im Zellkern vor und wird ubiquitär exprimiert (Simmons et al. 2005). Zudem interagiert NOM1 mit der Protein-Phosphatase 1 (PP1), einer eukaryotischen Serin/Threonin-Phosphatase, und ist am Transport von PP1 in den Zellkern beteiligt. PP1 ist für viele zelluläre Prozesse erforderlich, unter anderem Zellteilung, Signaltransduktion und Zellmetabolismus (Gunawardena et al. 2008). Da das NOM1-Gen nicht spezifisch im Kleinhirn exprimiert wird, bisher keine Erkrankungen mit Mutationen in diesem Gen in Verbindung gebracht worden sind und weitere im Kleinhirn exprimierte Gene in der Nähe der Bruchpunktregion existieren, ist der möglichen Beteiligung des NOM1-Gens am vorliegenden Phänotyp eine niedrigere Wahrscheinlichkeit beizumessen. Da in dieser Arbeit das NOM1-Gen nicht untersucht wurde, kann eine Beteiligung an der Erkrankung des Translokationspatienten nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden.

In einer vorausgegangenen Studie von Kullmann et al. (2011) an Mäuseembryonen, konnte gezeigt werden, dass Pfn1 eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Kleinhirns spielt. Pfn1 ist essentiell für Zell-Zell-Kontakte zwischen Körnerneuronen und Glia-Zellen des Kleinhirns und ermöglicht so die radiale Migration. Durch Ausschaltung des *Pfn1*-Gens im Gehirn von Mäusen kam es zur Ausprägung einer Kleinhirnhypoplasie mit verlagerten Körnerneuronen und pathologischer Organisation der Kortexschichten des Kleinhirns. Kullmann et al. (2011) vermuteten aufgrund ihrer Ergebnisse, dass dieses Modell auf den Menschen übertragbar ist. Nach dieser Hypothese wurde ein Patientenkollektiv aus 55 Patienten mit vergleichbarem Phänotyp untersucht. In einer früheren Veröffentlichung wird PFN1 bereits mit dem Miller-Dieker-Syndrom (syndromale klassische Lissenzephalie) in Verbindung gebracht (Kwiatkowski et al. 1990), da bei einigen Patienten, die an diesem Syndrom erkrankten, eine Mikrodeletion, die das *PFN1*-Gen miterfasst, nachgewiesen wurde. Die Vermutung, dass *PFN1* wichtig für die Entwicklung des Kleinhirns ist, wird weiter durch Ergebnisse von Léna et al. (1991) bestärkt. Pfn1 unterstützt durch Bereitstellung von Actinmonomeren in unreifen Neuronen die Entwicklung des Kleinhirns (Léna et al. 1991) und wirkt bei der aktivitätsabhängigen Umgestaltung der Synapsen-Struktur mit (Neuhoff et al. 2005). Diese Erkenntnisse bekräftigten eine Untersuchung von *PFN1* als Kandidatengen bei Patienten mit Kleinhirnfehlbildungen.

Infolge der Mutationsanalyse des *PFN1*-Gens nach Sequenzanalyse bei 55 Patienten mit Kleinhirnfehlbildungen konnten zwei Sequenzvarianten nachgewiesen werden (s. Tab. 4.13). Die Veränderung c.334C>T liegt im Exon 3 von *PFN1* und ist bereits in der dbSNP-Datenbank als häufig vorkommender Polymorphismus mit einer Frequenz von ca. 14% in der Normalbevölkerung (s. Tab. 4.14) erfasst (*rs13204*). Die zweite gefundene Veränderung c.*108T>C liegt im 3'untranslatierten Bereich und ist ebenfalls in der Datenbank eingetragen (*rs113941832*). Die Analyse mittels der Vorhersage-Programme ergab keine Veränderungen der Spleißstellen oder der Proteinfunktion durch die beiden gefundenen Sequenzvarianten im *PFN1*-Gen (s. Tab. 4.15). Diese Ergebnisse ergaben keinen Verdacht auf potentiell pathogene Eigenschaften der gefundenen Sequenzveränderungen im *PFN1*-Gen wahrscheinlich nicht an der Ausprägung der Krankheitsphänotypen der untersuchten Patienten mitgewirkt haben.

Zudem wurde erst kürzlich eine Arbeit veröffentlicht, die einen Zusammenhang von Mutationen im *PFN1*-Gen und der Amyotrophen Lateralsklerose zeigt (Wu et al. 2012). Wu et al. (2012) konnten bei einer molekulargenetischen Untersuchung der familiären Amyotrophen Lateralsklerose bei mehreren betroffenen Familien verschiedene bisher nicht beschriebene Mutationen im *PFN1*-Gen feststellen. Es wird vermutet, dass PFN1 eine Rolle, durch Modifizierung der Actin-Dynamik und Hemmung des Axon-Wachstums, eine Rolle bei der Pathogenese der familiären Amyotrophen Lateralsklerose spielen könnte. Diese Hypothese würde erklären warum keine Mutationen im *PFN1*-Gen bei Patienten mit Kleinhirnfehlbildungen gefunden werden konnten.

Da sich trotz vielversprechender vorangegangener Studien, welche die Rollen der einzelnen Kandidatengene *CNPY1*, *SHH*, *EN2* und *PFN1* während der Entwicklung des Kleinhirns belegen, keine pathogenen Sequenzveränderungen nachweisen ließen, stellt sich die Frage nach möglichen Fehlerquellen der durchgeführten Studie. Eine eventuelle Fehlerquelle könnte ein ungünstig ausgewähltes Patientenkollektiv darstellen. Bei der Zusammensetzung des Patientenkollektivs zur Untersuchung der Kandidatengene *SHH*,

CNPY1 und EN2 war der Krankheitsphänotyp des Patienten, bei dem die de novo Translokation zwischen Chromosom 4 und 7 identifiziert wurde, maßgebend (s. Abb. 2.5). Dieser Patient zeigte eine milde DWM. In die Studie wurden Patienten mit einer DWM bzw. einer Kleinhirnaffektion eingeschlossen. Bei fünf Patienten lag eine DWM vor, drei Patienten zeigten eine Kleinhirnagenesie und 25 eine Kleinhirnhypoplasie, teilweise mit Kleinhirnwurmhypoplasie. Für die molekulargenetische Analyse des PFN1-Gens wurde, aufgrund der Ausbildung einer Kleinhirnhypoplasie nach Ausschaltung des PFN1-Gens bei Mäuseembryonen (Kullmann et al. 2011), ein Kollektiv von Patienten zusammengestellt, die eine Kleinhirnaffektion aufweisen. Das Patientenkollektiv setzte sich zusammen aus fünf Patienten mit einer DWM und 50 Patienten, die eine Kleinhirnhypoplasie zeigten, teilweise assoziiert mit einer kortikalen Gyrierungsstörung. Die Zusammenstellung der beiden Patientenkollektive könnte sich rückblickend als zu spezifisch erweisen. Außerdem ist es möglich, dass Mutationen in den von uns ausgewählten vier Kandidatengenen nur sehr selten Grund für die Ausprägung einer Kleinhirnaffektion sind und sich unter unseren Patienten keiner mit einer Mutation in diesen Genen befand. Folglich müsste man eine viel größere Anzahl an Patienten in das Kollektiv einschließen, um zu ermitteln, ob die Gene SHH, CNPY1, EN2 und PFN1 mit den ausgewählten Fehlbildungen assoziiert sind.

Des Weiteren können Fehler während der einzelnen Schritte der Sequenzanalyse aufgetreten sein. Für die Analyse der einzelnen Exons des entsprechenden Gens wurde jeweils ein Primerpaar mit Hilfe des webbasierten Programms Primer3Plus (Untergasser et al. 2007) generiert (s. Tab. 3.1, 3.2, 3.3 und 3.4). Die Primer wurden jeweils so vor (forward Primer) und hinter (revers Primer) dem jeweiligen Exon platziert, dass keine bekannten SNPs an den jeweiligen Bindungsstellen der Primer liegen. So sollte gewährleistet sein, dass beide Allele des Exons amplifiziert werden können. Die Erkenntnisse in Bezug auf Vorkommen und Verteilung der SNPs sind noch nicht abgeschlossen (Stephens et al. 2001), deshalb kann nicht mit Sicherheit ausgeschlossen werden, dass in der gewählten Primersequenz SNPs vorhanden sind. Wenn ein noch unbekannter SNP in der Primerbindesequenz liegt, kann der Primer nicht an dieses Allel des Patienten binden. Dies kann dazu führen, dass das Allel kaum oder gar nicht amplifiziert wird. Dieser Vorgang wird als "allelic drop-out" bezeichnet. Dies kann dazu führen, dass das pathogene Allel nicht amplifiziert wird und somit nur das normale Allel während der weiteren Schritte der Sequenzanalyse untersucht wird (Ward et al. 2006). Exons, bei denen eine Heterozygotie sichtbar ist, sind mit Sicherheit nicht vom "allelic drop-out" betroffen.

Weitere Bereiche, welche durch die durchgeführte Sequenzanalyse der Gene SHH, CNPY1, EN2 und PFN1 nicht komplett erfasst werden, sind die 3'- und 5'- untranslatierten Bereiche und weiter innerhalb des Introns liegende Bereiche, hier könnten pathogene Mutationen liegen. Nur die Übergänge zwischen Exon und Intron wurden abgedeckt. Zudem können in den Promotorregionen und den regulatorischen Kontrollelementen der einzelnen untersuchten Gene Mutationen nicht ausgeschlossen werden. Da regulatorische Elemente sehr weit vom eigentlichen Zielgen entfernt liegen können und der Kenntnisstand über die einzelnen Elemente noch nicht vollständig ist, können Mutationen in diesen potentiellen regulatorischen Elementen nicht ausgeschlossen werden. Zudem können auch Deletionen oder Duplikationen des ganzen Gens oder einzelner Genabschnitte vorliegen. Dabei muss die Deletion oder Duplikation nicht groß sein. Eine Deletion bzw. Duplikation von nur einigen Basenpaaren kann mittels der PCRbasierten Sequenzanalyse herausgefiltert werden, aber es kann sich auch über ein komplettes Exon bzw. das ganze Gen erstrecken. Solch eine Deletion oder Duplikation könnte bei der PCR-basierten Sequenzanalyse der genomischen DNA unbemerkt bleiben. Um diesen Fehler auszuschließen, müsste eine Methode verwendet werden, mit der eine Quantifizierung möglich ist, wie z. B. die quantitative PCR (qPCR) oder die MLPA ("multiple ligation probe amplification"). Strukturelle Varianten, sogenannte "copy number variations" (CNV) sind definiert als DNA-Segmente, deren Größe zwischen 1 kb und 3 Mb liegen können und die deletiert oder dupliziert vorkommen. Untersuchungen ergaben, dass sie sehr häufig im humanen Genom vorkommen und dramatische phänotypische Konsequenzen haben können, indem sie eine veränderte Gendosis, eine Unterbrechung der kodierenden Sequenz oder eine Störung der weit entfernten regulatorischen Elemente bewirken. Dies kann sich durch eine Änderung der Kopienzahl von bestimmten genomischen Bereichen zeigen. Eine solche Veränderung würde bei der PCR-basierten Sequenzanalyse unbemerkt bleiben (Stranger et al. 2007).

6 Zusammenfassung

Die klassische Dandy-Walker-Malformation (DWM) ist eine kongenitale Fehlbildung des Gehirns. Charakteristisch sind eine zystische Erweiterung des vierten Ventrikels, eine komplette oder partielle Agenesie des Kleinhirns bzw. -wurms und eine vergrößerte retrozerebelläre Zyste. Ziel dieser Arbeit war es herauszufinden, ob Veränderungen in den Genen SHH, CNPY1, EN2 oder PFN1 bei Patienten mit DWM oder Kleinhirnfehlbildung vorkommen und möglicherweise zum Phänotyp dieser Erkrankungen beitragen. Ausgangspunkt stellte die Bruchpunktanalyse bei einem Patienten mit einer de novo Translokation der Chromosomen 4 und 7 und milder Ausprägung einer DWM dar. In der Nähe des eingegrenzten Bruchpunktes auf Chromosom 7 befinden sich die drei für die Kleinhirnentwicklung relevanten Gene SHH, CNPY1 und EN2. Die Analyse von PFN1 erfolgte aufgrund einer Studie an Mäusen, die zeigte, dass die Expressionsinhibierung von Pfn1 im Gehirn zur Ausbildung einer Kleinhirnhypoplasie mit Veränderungen des Kleinhirnkortex führt. Für die Untersuchung der Gene SHH, CNPY1 und EN2 wurden insgesamt 33 Patienten mit DWM, Kleinhirnagenesie oder Kleinhirnhypoplasie in das Kollektiv eingeschlossen. Das Patientenkollektiv zur Sequenzanalyse von PFN1 setzte sich aus 55 Patienten mit einer DWM oder einer Kleinhirnhypoplasie zusammen. Die Untersuchung erfolgte mittels PCR, Gelelektrophorese und DNA-Sequenzierung. Hierbei wurden vor allem die kodierenden Bereiche der einzelnen Gene analysiert. Die Auswertung der gefundenen Veränderungen erfolgte durch verschiedene webbasierende Vorhersage-Programme und die Gendatenbank Ensembl.

Bei der in dieser Arbeit durchgeführten Sequenzanalyse des *SHH*-Gens konnten fünf Sequenzveränderungen nachgewiesen werden, wobei zwei bereits als SNPs bekannt sind. Die vermutlich nicht pathogenen Sequenzvarianten c.1232G>C, c.1275T>C und c.*50C>G wurden jeweils bei einem Patienten heterozygot beobachtet. Die Sequenzanalyse des *EN2*-Gens ergab sechs Sequenzveränderungen, drei liegen in Exon 1, zwei in Exon 2 und eine im 3'untranslatierten Bereich des *EN2*-Gens. Alle gefundenen Varianten sind bereits als SNPs bekannt. Die vermutlich nicht pathogene Sequenzvariante c.28G>C in Exon 2 des *EN2*-Gens verursacht einen Aminosäure-Austausch und wurde bei einem Patienten in heterozygotem Zustand nachgewiesen. Im *PFN1*-Gen konnten nach erfolgreicher Sequenzanalyse zwei Veränderungen beobachtet werden. Die vermutlich nicht pathogene Sequenzvarianten c.*108T>C (*rs113941832*) und

61

c.334C>T (*rs13204*) sind bereits als SNPs bekannt. Bei der durchgeführten Sequenzanalyse des *CNPY1*-Gens wurden fünf Sequenzveränderungen festgestellt, alle fünf Veränderungen sind schon als SNPs in der Datenbank eingetragen. Die Veränderung c.16C>G in Exon 2 des *CNPY1*-Gens, die zu dem Aminosäure-Austausch p.L6V führt, konnte bei einem Patienten heterozygot nachgewiesen werden. c.16C>G ist bereits als Polymorphismus *rs73163379* bekannt, wurde aber erst bei drei Personen beobachtet. Dies deutet daraufhin, dass es sich hierbei nicht um einen Polymorphismus, sondern möglicherweise um eine krankheitsmitverursachende Mutation handelt.

7 <u>Anhang</u>

Patient	CNPY1	SHH	EN2	PFN1
ES1	/	/	c.361C>T (homo)	
ES2	/	c.570G>A (het)	c.111G>A (het)	
			c.361C>T (het)	
ES3	/	c125G>A (het)	c.361C>T (homo)	
ES4	/	/	c.952T>C (het)	
ER1	c240T>C (homo)	c.*50C>G (het)	c.361C>T (homo)	
	c61+27C>G (homo)		c.*3C>T (homo)	
ER2	c49T>C (het)	/	c.361C>T (homo)	
ER3	/	/	c.361C>T (homo)	
ER4	/	/	c.361C>T (homo)	
			c.952T>C (het)	
ER5	c49T>C (het)	/ (3c fehlt)	c.*3C>T (het)	
ER6	c49T>C (het)	/	c.361C>T (het)	
ER7	c49T>C (het)	/	/	
ER8	/	/	c.361C>T (homo)	
ER9	c240T>C (homo)	/	c.361C>T (homo)	
	c61+27C>G (homo)		c.952T>C (het)	
ER10	c240T>C (homo)	/	c.361C>T (homo)	
	c61+27C>G (homo)		c.952T>C (het)	
C1	c49T>C (het)	c.1232G>C (het)	c.361C>T (het)	
		c.1275T>C (het)	c.952T>C (homo)	
		(3c fehlt)		
C2	c49T>C (het)	/ (3c fehlt)	c.361C>T (homo)	
C3	/	/	c.952T>C (het)	
D1	c240T>C (homo)	/	c.361C>T (homo)	/
	c191A>G (homo)		c.952T>C (het)	
	c61+27C>G (homo)			
D2	c240T>C (het)	/	c.111G>A (het)	/
	c191A>G (het)		c.361C>T (het)	
	c61+27C>G (het)		c.952T>C (het)	
D3	c240T>C (homo)	/	c.361C>T (het)	/
	c61+27C>G (homo)		c.952T>C (het)	
			c.720G>A (het)	
D4	c240T>C (het)	/ (3c fehlt)	c.361C>T (het)	/
	c61+27C>G (het)		c.952T>C (het)	

Tabelle 7.1: Aufzählung der einzelnen Veränderungen zu dem jeweiligen Patient und Gen

Patient	CNPY1	SHH	EN2	PFN1
D5	c240T>C (homo)	/	c.361C>T (homo)	c.334C>T (het)
	c61+27C>G (homo)			
	c49T>C (het)			
D6	c191A>G (het)	/	c.111G>A (het)	c.334C>T (het)
	c61+27C>G (homo)		c.952T>C (het)	
D7	c240T>C (homo)	/	c.361C>T (het)	/
	c191A>G (het)		c.952T>C (het)	
	c61+27C>G (het)			
D8	c240T>C (homo)	/	c.361C>T (het)	/
	c191A>G (het)		c.*3C>T (het)	
	c61+27C>G (homo)			
D9	c240T>C (homo)	/	c.28G>C (het)	/
	c191A>G (het)		c.952T>C (homo)	
	c61+27C>G (homo)			
	c49T>C (het)			
D10	c61+27C>G (het)	/ (3c fehlt)	c.361C>T (het)	/
	c49T>C (het)		c.952T>C (het)	
D11				c.334C>T (het)
H1	c240T>C (homo)	/	c.111G>A (het)	
	c61+27C>G (homo)		c.361C>T (het)	
			c.952T>C (homo)	
H2	c240T>C (homo)	/ (3c fehlt)	c.361C>T (het)	
	c61+27C>G (homo)		c.952T>C (het)	
	c49T>C (homo)			
Н3	c240T>C (homo)	c125G>A (het)	c.361C>T (homo)	
	c191A>G (het)	(3b fehlt)	c.952T>C (het)	
	c61+27C>G (homo)			
H4	c240T>C (homo)	/	c.361C>T (het)	
	c61+27C>G (homo)		c.952T>C (het)	
	c49T>C (homo)			
Н5	c240T>C (homo)	c125G>A (het)	c.361C>T (het)	
	c191A>G (het)		c.952T>C (het)	
	c61+27C>G (homo)			
H6	c191A>G (het)	/ (3c fehlt)	c.361C>T (het)	
	c61+27C>G (homo)		c.952T>C (homo)	
	c.16C>G (het)			
B1				/
B2				/
B3				/
B4				/

Patient	CNPY1	SHH	EN2	PFN1
B5				/ (1 fehlt)
B6				/
B7				/
B8				/
B9				/
B10				/
B11				/
B12				/
B13				/
B14				/
B15				/
B16				/
B17				/
B18				/
B19				/
B20				/
B21				/
B22				/
B23				/
B24				/
B25				/
B26				/
B27				/
B28				/
B29				/
B30				/
B31				/
B32				/ (1 fehlt)
B33				/ (1 fehlt)
B34				/ (1+2 fehlen)
B35				/ (1 fehlt)
B36				/ (1 fehlt)
B37				/ (1 fehlt)
B38				c.334C>T (het)
				c.*108T>C (het)
				(1 fehlt)

Patient	CNPY1	SHH	EN2	PFN1
B39				/ (1 fehlt)
B40				/ (1 fehlt)
B41				/
B42				/
B43				/
B44				/ (1 fehlt)

/: keine Veränderung gefunden; homo: Patient ist Homozygot für diese Veränderung; het: Patient ist Heterozygot für diese Veränderung; leeres Feld: Patient wurde nicht auf dieses Gen hin untersucht; (fehlt): dieses Exon konnte nicht amplifiziert werden
8 Abkürzungsverzeichnis

А	Adenin
Abb.	Abbildung
AS	Aminosäure
Вр	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
С	Cytosin
°C	Grad Celsius
ca.	Circa
Chr	Chromosom
cm, mm, µm, nm	Centimeter, Millimeter, Mikrometer, Nanometer
CNPY1	Canopy1-Gen
СТ	Computertomographie
DNA	Desoxyribonucleic Acid
dNTP, ddNTP	Desoxy-Nukleosid-Triphosphat, Didesoxy-Nukleosid- Triphosphat
DWM	Dandy-Walker-Malformation
DWV	Dandy-Walker-Variante
E. coli	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EN2	Engrailed2-Gen
et al.	et alii (dt.: und andere)
FGF	Fibroblast growth factor
Fwd	Forward
G	Guanin
g, mg, µg, ng	Gramm, Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
HPLC	High pressure liquid chromatography
μ	Mikro

kb, Mb	Kilobasen, Megabasen
KCl	Kaliumchlorid
l, ml, µl	Liter, Milliliter, Mikroliter
LCH	Lissenzephalie mit zerebellärer Hypoplasie
LIS	Lissenzephalie
LMBR1	Limb-region1-Gen
М	Mol
mM	Millimol
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minuten
MRT	Magnetresonanztomographie
mu	Mutante
n	Anzahl der untersuchten Fälle
NaAc	Natriumacetat
NOM1	Nucleolar protein with MIF4G domain1-Gen
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFN1	Profilin1–Gen
Rev	Revers
8	Sekunde
s. Abb.	siehe Abbildung
s. Tab.	siehe Tabelle
SHH	Sonic hedgehog-Gen
SNP	Single-nucleotide polymorphisms
Т	Thymin
TD	Touchdown
TBE	TRIS-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
Tris	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan
Tris-HCL	Tris-(hydroxymethyl)aminomethan-hydrochlorid
U	Units

u.a.	unter anderem	
UKE	Universitätsklinikum Eppendorf	
Upm	Umdrehungen pro Minute	
UTR	Untranslated Region	
UV	Ultraviolet	
V	Volt	
v. a.	vor allem	
wt	Wildtyp	
z.B.	zum Beispiel	
ZNS	zentrales Nervensystem	

Buchstabencode der Aminosäuren:

А	Alanin	Μ	Methionin
С	Cystein	Ν	Asparagin
D	Asparaginsäure	Р	Prolin
Е	Glutaminsäure	Q	Glutamin
F	Phenylalanin	R	Arginin
G	Glycin	S	Serin
Н	Histidin	Т	Threonin
Ι	Isoleucin	V	Valin
Κ	Lysin	W	Tryptophan
L	Leucin	Y	Tyrosin

9 Literaturverzeichnis

- Aldinger KA, Lehmann QJ, Hudgins L, Chizhikov W, Bassuk AG, Ades LC, Krantz ID, Dobyns WB, Millen KJ (2009) FOXC1 is required for normal cerebellar development and is a major contributor to chromosome 6p25.3 Dandy-Walker malformation. *Nat Genet*, 41(9):1037-42.
- Aruga J (2004) The role of Zic genes in neural development. *Mol Cell Neurosci*, 26(2):205-21.
- Belloni E, Muenke M, Roessler E, Traverso G, Siegel-Bartelt J, Frumkin A, Mitchell HF, Donis-Keller H, Helms C, Hing AV, Heng HH, Koop B, Martindale D, Rommens JM, Tsui LC, Scherer SW (1996) Identification of Sonic hedgehog as a candidate gene responsible for holoprosencephaly. *Nat Genet*, 14(3):353-6.
- Blank MC, Grinberg I, Aryee E, Laliberte C, Chizhikov W, Henkelman RM, Millen KJ (2011) Multiple developmental programs are altered by loss of Zic1 and Zic4 to cause Dandy-Walker malformation cerebellar pathogenesis. *Development*, 138(6):1207-16.
- **Bragg** TW, St George EJ, Wynne-Jones GA, Hockley A, Morton JE (2006) Familial Dandy-Walker syndrome: a case report supporting an autosomal inheritance. *Childs Nerv Syst*, 22(5):539-41.
- Chédotal A (2010) Should I stay or should I go? Becoming a granule cell. *Trends Neurosci*, 33(4):163-72.
- Chen CP, Lin SP, Lin CC, Li YC, Hsieh LJ, Huang JK, Lee CC, Wang W (2006) Spectral karyotyping and fluorescence in situ hybridization analysis of de novo partial trisomy 7p (7p21.2→pter) and partial monosomy 12q (12q24.33→qter). *Genet Couns*, 17(1):57-63.
- Ciemerych MA, Kenney AM, Sicinska E, Kalaszczynska I, Bronson RT, Rowitch DH, Gardner H, Sicinski P (2002) Development of mice expressing a single D-type cyclin. *Genes Dev*, 16(24):3277-89.

- **Corrales** JD, Blaess S, Mahoney EM, Joyner AL (2006) The level of sonic hedgehog signaling regulates the complexity of cerebellar foliation. *Development*, 133(9):1811-21.
- **Dahmane** N, Ruiz I Altaba A (1999) Sonic hedgehog regulates the growth and the patterning of the cerebellum. *Development*, 126(14):3089-100.
- **Dandy** WE, Blackfan KD (1914) Internal hydrocephalus: an experimental, clinical and pathological study. *Am J Dis Child*, 8:406-482.
- **Drews** U (2006) Taschenatlas Embryologie, 2. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 206-257.
- Ecker JL, Shipp TD, Bromley B, Benacerraf B (2000) The sonographic diagnosis of Dandy-Walker and Dandy-Walker variant: associated findings and outcomes. *Prenat Diagn*, 20(4):328-32.
- **Estroff** JA, Scott MR, Benacerraf BR (1992) Dandy-Walker variant: prenatal sonographic features and clinical outcome. *Radiology*, 185(3):755-8.
- Faivre-Sarrailh C, Lena JV, Had L, Vignes M, Lindberg U (1993) Location of profilin at presynaptic sites in the cerebellar cortex; implication for the regulation of the actin-polymerization state during axonal elongation and synaptogenesis. J Neurocytol, 22(12):1060-72.
- **Gharani** N, Benayed R, Mancuso V, Brzustowicz LM, Millonig JH (2004) Association of the homeobox transcription factor, ENGRAILED 2, 3, with autism spectrum disorder. *Mol Psychiatry*, 9(5):474-84.
- Grinberg I, Northrup H, Ardinger H, Prasad C, Dobyns WB, Millen KJ (2004) Heterozygous deletion of the linked genes ZIC1 and ZIC4 involved in Dandy-Walker malformation. *Nat Genet*, 36(10):1053-5.
- **Guerrini** R, Dobyns WB, Barkovich AJ (2008) Abnormal development of the human cerebral cortex: genetics, functional consequences and treatment options. *Trends Neurosci*, 31(3):154-62.
- **Gunawardena** SR, Ruis BL, Meyer JA, Kapoor M, Conklin KF (2008) NOM1 targets protein phosphatase I to the nucleolus. *J Biol Chem*, 283(1):398-404.

- Haarer BK, Brown SS (1990) Structure and function of profilin. *Cell Motil Cytoskeleton*, 17(2):71-4.
- Hart MN, Malamud N, Ellis WG (1972) The Dandy-Walker syndrome. A clinicopathological study based on 28 cases. *Neurology*, 22(8):771-80.
- Hartmann W, Koch A, Brune H, Waha A, Schüller U, Dani I, Denkhaus D, Langmann W, Bode U, Wiestler OD, Schilling K, Pietsch T (2005) Insulin-like growth factor II is involved in the proliferation control of medulloblastoma and its cerebellar precursor cells. *Am J Pathol*, 166(4):1153-62.
- Hellenbroich Y, Sperner J, Petersen D, Gillessen-Kaesbach G (2008) Klinische und genetische Aspekte von Kleinhirnfehlbildungen – eine interdisziplinäre Herausforderung. *Neuropädiatrie*, 7(3): 81-86.
- **Hirate** Y, Okamoto H (2006) Canopy1, a novel regulator of FGF signaling around the midbran-hindbrain boundary in zebrafish. *Curr Biol*, 16(4):421-7.
- Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A, Clark GD, Ledbetter DH, McBain CJ, Wynshaw-Boris A (1998) Graded reduction of Pafah1b1 (Lis1) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet*, 19(4):333-9.
- Hirsch JF, Pierre-Kahn A, Renier D, Sainte-Rose C, Hoppe-Hirsch E (1984) The Dandy-Walker malformation. A review of 40 cases. *J Neurosurg*, 61(3):515-22.
- **Imataka** G, Yamanouchi H, Arisaka O (2007) Dandy-Walker syndrome and chromosomal abnormalities. *Congenit Anom (Kyoto)*, 47(4):113-8.
- Kenney AM, Rowitch DH (2000) Sonic hedgehog promotes G(1) cyclin expression and sustained cell cycle progression in mammalian neuronal precursors. *Mol Cell Biol*, 20(23):9055-67.
- Kenney AM, Cole MD, Rowitch DH (2003) Nmyc upregulation by sonic hedgehog signaling promotes proliferation in developing cerebellar granule neuron precursors. *Development*, 130(1):15-28.
- Kleinjan DJ, van Heyningen V (1998) Position effect in human genetic disease. *Hum Mol Genet*, 7(10):1611-8.

- Knoepfler PS, Cheng PF, Eisenman RN (2002) N-myc is essential during neurogenesis for the rapid expansion of progenitor cell populations and the inhibition of neuronal differentiation. *Genes Dev*, 16(20):2699-712.
- Kullmann JA, Neumeyer A, Gurniak CB, Friauf E, Witke W, Rust MB (2011) Profilin 1 is required for glial cell adhesion and radial migration of cerebellar granule neurons. *EMBO Rep*, 13(1):75-82.
- Kumar RA, Pilz DT, Babatz TD, CushionTD, Harvey K, Topf M, Yates L, Robb S, Uyanik G, Mancini GM, Rees MI, Harvey RJ, Dobyns WB (2010) TUBA1A mutations cause wide spectrum lissencephaly (smooth brain) and suggest that multiple neuronal migration pathways converge on alpha tubulins. *Hum Mol Genet*, 19(14):2817-27.
- **Kwiatkowski** DJ, Aklog L, Ledbetter DH, Morton CC (1990) Identification of the functional profiling gene, its localization to chromosome subband 17p13.3, and demonstration of its deletion in some patients with Miller-Dieker syndrome. *Am J Hum Genet*, 46(3):559-67.
- Lanoue L, Dehart DB, Hinsdale ME, Maeda N, Tint GS, Sulik KK (1997) Limb, genital CNS, and facial malformations result from gene/environment-induced cholesterol deficiency: further evidence for a link to sonic hedgehog. *Am J Med Genet*, 73(1):24-31.
- Léna JY, Sri Widada J, Ferraz C, Liautard JP, Rabié A, Faivre-Sarrailh C (1991) Profilin and profilin mRNA in the cerebellum of the developing rat. *Neuroreport*, 2(3):117-20.
- Lettice LA, Heaney SJ, Purdie LA, Li L, de Beer P, Oostra BA, Goode D, Elgar G, Hill RE, de Graaff E (2003) A long-range Shh enhancer regulates expression in the developing limb and fin and is associated with preaxial polydactyly. *Hum Mol Genet*, 12(14):1725-35.
- Leventer RJ, Pilz DT, Matsumoto N, Ledbetter DH, Dobyns WB (2000) Lissencephaly and subcortical band heterotopias: molecular basis and diagnosis. *Mol Med Today*, 6(7):277-84.

- Lewis PM, Gritli-Linde A, Smeyne R, Kottmann A, McMahon AP (2004) Sonic hedgehog signaling is required for expansion of granule neuron precursors and patterning of the mouse cerebellum. *Dev Biol*, 270(2):393-410.
- Liu A, Joyner AL (2001) EN and GBX2 play essential roles downstream of FGF8 in patterning the mouse mid/hindbrain region. *Development*, 128(2):181-91.
- Matsui T, Thitamadee S, Murata T, Kakinuma H, Nabetani T, Hirabayashi Y, Hirate Y, Okamoto H, Bessho Y (2011) Canopy1, a positive feedback regulator of FGF signaling, controls progenitor cell clustering during Kupffer's vesicle organo genesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 108(24):9881-6.
- Millen KJ, Gleeson JG (2008) Cerebellar development and disease. *Curr Opin Neurobiol*, 18(1):12-9.
- Millen KJ, Wurst W, Herrup K, Joyner AL (1994) Abnormal embryonic cerebellar development and patterning of postnatal foliation in two mouse Engrailed-2 mutants. *Development*, 120(3):695-706.
- Moore K, Persaud T (2007) Embryologie, Entwicklunsstadien Frühentwicklung Organogenese – Klinik, 5. Auflage, Elsevier Urban & Fischer Verlag, München, 469-509.
- **Mullis** KB, Faloona FA (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerasecatalyzed chain reaction. *Methods Enzymol*, 155:335-50.
- Murru P, Coscia A, Martano C, Tibaldi M, Stefanini L, Pepe E, Battistoni G, Silengo M (2002) Complex cerebral malformation including Dandy-Walker in a newborn with trisomy 9 mosaicism. *Radiol Med*, 103(3):261-3.
- Neuhoff H, Sassoè-Pognetto M, Panzanelli P, Maas C, Witke W, Kneussel M (2005) The actin-binding protein profiling 1 is localized at synaptic sites in an activitiyregulated manner. *Eur J Neurosci*, 21(1):15-25.
- **O'Rahilly** R, Müller F (1999) Embryologie und Teratologie des Menschen, Verlag Hans Huber, Bern, 67-77; 379-435.
- Parathath SR, Mainwaring LA, Fernandez-L A, Campbell DO, Kenney AM (2008) Insulin receptor substrate 1 is an effector of sonic hedgehog mitogenic signaling in cerebellar neural precursors. *Development*, 135(19):3291-300.

- **Parisi** MA, Dobyns WB (2003) Human malformations of the midbrain and hindbrain: review and proposed classification scheme. *Mol Genet Metab*, 80(1-2):36-53.
- Pons S, Trejo JL, Martínez-Morales JR, Martí E (2001) Vitronectin regulates Sonic hedgehog activity during cerebellum development through CREB phosphorylation. *Development*, 128(9):1481-92.
- **Rohatgi** R, Milenkovic L, Scott MP (2007) Patched1 regulates hedgehog signaling at the primary cilium. *Science*, 317(5836):372-6.
- Rohen J, Lütjen-Drecoll E (2006) Funktionelle Embryologie Die Entwicklung der Funktionssysteme des menschlichen Organismus, 3. Auflage, Schattauer, Stuttgart, 43-53; 139-159.
- **Ross** ME, Swanson K, Dobyns WB (2001) Lissencephaly with cerebellar hypoplasia (LCH): a heterogeneous group of cortical malformations. *Neuropediatrics*, 32(5):256-63.
- **Russ** PD, Pretorius DH, Johnson MJ (1989) Dandy-Walker syndrome: a review of fifteen cases evaluated by prenatal sonography. *Am J Obstet Gynecol*, 161(2):401-6.
- Sadler T (2008) Medizinische Embryologie Die normale menschliche Entwicklung und ihre Fehlbildungen, 11. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 91-98; 383-430.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463-7.
- Sarnat HB, Benjamin DR, Siebert JR, Kletter GB, Cheyette SR (2002) Agenesis of the mesencephalon and metencephalon with cerebellar hypoplasia: putative mutation in the EN2 gene—report of the 2 cases in early infancy. *Pediatr Dev Pathol*, 5(1):54-68.
- Schiebler T, Arnold G, Beier H, Herrmann M, Kaufmann P, Kretschmann H, Kühnel W, Schmidt W, Steiniger B, Winckler J, van der Zypen E, Zilles K (2002) Anatomie, 8. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, 720-772.
- Shuman S (1991) Recombination mediated by vaccinia virus DNA topoisomerase I in Escherichia coli is sequence specific. Proc Natl Acad Sci U S A, 88(22):10104-8.

- Simmons HM, Ruis BL, Kapoor M, Hudacek AW, Conklin KF (2005) Identification of NOM1, a nucleolar, eIF4A binding protein encoded within the chromosome 7q36 breakpoint region targeted in cases of pediatric acute myeloid leukemia. *Gene*, 347(1):137-45.
- **Sjostrom** SK, Finn G, Hahn WC, Rowitch DH, Kenney AM (2005) The Cdk1 complex plays a prime role in regulating N-myc phosphorylation and turnover in neural precursors. *Dev Cell*, 9(3):327-38.
- Starck D (1975) Embryologie, 3. Auflage, Georg Thieme Verlag, Stuttgart, 354-415.
- Stephens JC, Schneider JA, Tanguay DA, Choi J, Acharya T, Stanley SE, Jiang R, Messer CJ, Chew A, Han JH, Duan J, Carr JL, Lee MS, Koshy B, Kumar AM, Zhang G, Newell WR, Windemuth A, Xu C, Kalbfleisch TS, Shaner SL, Arnold K, Schulz V, Drysdale CM, Nandabalan K, Judson RS, Ruano G, Vovis GF (2001) Haplotype variation and linkage disequilibrium in 313 human genes. *Science*, 293(5529):489-93.
- Stranger BE, Forrest MS, Dunning M, Ingle CE, Beazley C, Thorne N, Redon R, Bird CP, de Grassi A, Lee C, Tyler-Smith C, Carter N, Scherer SW, Tavaré S, Deloukas P, Hurles ME, Dermitzakis ET (2007) Relative impact of nucleotide and copy number variation on gene expression phenotypes. *Science*, 315(5813):848-53.
- Taylor MD, Liu L, Raffel C, Hui CC, Mainprize TG, Zhang X, Agatep R, Chiappa S, Gao L, Lowrance A, Hao A, Goldstein AM, Stavrou T, Scherer SW, Dura WT, Wainwright B, Squire JA, Rutka JT, Hogg D (2002) Mutations in SUFU predispose to medulloblastoma. *Nat Genet*, 31(3):306-10.
- Traiffort E, Charytoniuk DA, Faure H, Ruat M (1998) Regional distribution of Sonic Hedgehog, patched, and smoothened mRNA in the adult rat brain. *J Neurochem*, 70(3):1327-30.
- Untergasser A, Nijveen H, Rao X, Bisseling T, Geurts R, Leunissen JA (2007) Primer3Plus, an enhanced web interface to Primer3. *Nucleic Acids Res*, 35(Web Server issue):W71-4.

- **Uyanik** G, Hehr U, Winkler J (2008) Genetik von neuronalen Migrationsstörungen. *Neuropaediatrie*, 7(3):87-95.
- Vaillant C, Michos O, Orolicki S, Brellier F, Taieb S, Moreno E, Té H, Zeller R, Monard D (2007) Protease nexin 1 and its receptor LRP modulate SHH signaling during cerebellar development. *Development*, 134(9):1745-54.
- Vaillant C, Monard D (2009) SHH pathway and cerebellar development. *Cerebellum*, 8(3):291-301.
- Wakeling EL, Jolly M, Fisk NM, Gannon C, Holder SE (2002) X-linked inheritance of the Dandy-Walker variant. *Clin Dysmorphol*, 11(1):15-8.
- Wallace VA (1999) Purkinje-cell-derived Sonic hedgehog regulates granule neuron precursor cell proliferation in the developing mouse cerebellum. *Curr Biol*, 9(8):445-8.
- Wang L, Jia M, Yue W, Tang F, Qu M, Ruan Y, Lu T, Zhang H, Yan H, Liu J, GuoY, Zhang J, Yang X, Zhang D (2008) Association of the ENGRAILED 2 (EN2) gene with autism in Chinese Han population. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet*, 147B(4):434-8.
- Ward KJ, Ellard S, Yajnik CS, Frayling TM, Hattersley AT, Venigalla PN, Chandak GR (2006) Allelic drop-out may occur with a primer binding site polymorphism for the commonly used RFLP assay for the -1131T>C polymorphism of the Apolipoprotein AV gene. *Lipids Health Dis*, 5:11.
- Warf BC, Dewan M, Mugamba J (2011) Management of Dandy-Walker complexassociated infant hydrocephalus by combined endoscopic third ventriculostomy and choroid plexus cauterization. J *Neurosurg Pediatr*, 8(4):377-83.
- **Wassef** M, Joyner AL (1997) Early mesencephalon/metencephalon patterning and development of the cerebellum. *Perspect Dev Neurobiol*, 5(1):3-16.
- Wechsler-Reya RJ, Scott MP (1999) Control of neuronal precursor proliferation in the cerebellum by Sonic Hedgehog. *Neuron*, 22(1):103-14.
- Weiner HL, Bakst R, Hurlbert MS, Ruggiero J, Ahn E, Lee WS, Stephen D, Zagzag D, Joyner AL, Turnbull DH (2002) Induction of medulloblastomas in mice by sonic hedgehog, independent of Gli1. *Cancer Res*, 62(22):6385-9.

- Wu CH, Fallini C, Ticozzi N, Keagle PJ, Sapp PC, Piotrowska K, Lowe P, Koppers M, McKenna-Yasek D, Baron DM, Kost JE, Gonzalez-Perez P, Fox AD, Adams J, Taroni F, Tiloca C, Leclerc AL, Chafe SC, Mangroo D, Moore MJ, Zitzewitz JA, Xu ZS, van den Berg LH, Glass JD, Siciliano G, Cirulli ET, Goldstein DB, Salachas F, Meininger V, Rossoll W, Ratti A, Gellera C, Bosco DA, Bassell GJ, Silani V, Drory VE, Brown RH, Landers JE (2012) Mutations in the profilin 1 gene cause familial amyotrophic lateral sclerosis. *Nature*, 11280.
- Yu H, Patel SB (2005) Recent insights into the Smith-Lemli-Opitz syndrome. *Clin Genet*, 68(5):383-91.
- Zanni G, Barresi S, Travaglini L, Bernardini L, Rizza T, Digilio MC, Mercuri E, Cianfarani S, Valeriani M, Ferraris A, Da Sacco L, Novelli A, Valente EM, Dallapiccola B, Bertini ES (2011) FGF17, a gene involved in cerebellar development, is downregulated in a patient with Dandy-Walker malformation carrying a de novo 8p deletion. *Neurogenetics*, 12(3):241-5.
- Zec N, Rowitch DH, Bitgood MJ, Kinney HC (1997) Expression of the homeoboxcontaining genes EN1 and EN2 in human fetal midgestational medulla and cerebellum. *J Neuropathol Exp Neurl*, 56(3):236-42.
- Zhao Q, Kho A, Kenney AM, Yuk Di DI, Kohane I, Rowitch DH (2002) Identification of genes expressed with temporal-spatial restriction to developing cerebellar neuron precursors by a functional genomic approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(8):5704-9.

10 Danksagung

Ich danke Professor Dr. Andreas Gal und Professor Dr. Kerstin Kutsche für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Humangenetik und die Ermöglichung der Anfertigung einer Doktorarbeit. Frau Dr. Kerstin Kutsche danke ich auch für das Korrekturlesen und die vielen hilfreichen Anregungen, die mir sehr geholfen haben.

Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. Gökhan Uyanik für die engagierte und herzliche Betreuung bedanken. Vielen Dank für die ständige Hilfsbereitschaft und das Korrekturlesen meiner Arbeit.

Für die gute Zusammenarbeit und die herzliche Hilfsbereitschaft im Labor möchte ich mich vor allem bei Marisol Heise bedanken. Ich danke auch allen anderen Mitgliedern der AG Kutsche für die angenehme Arbeitsatmosphäre und die Unterstützung im Labor.

Danken möchte ich allen anderen, die mich immer wieder unterstützt und motiviert haben. Dazu zählen insbesondere mein Freund Johannes, meine Eltern und mein Bruder.

11 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.

Unterschrift: