

UNIVERSITÄTSKLINIKUM HAMBURG-EPPENDORF

Zentrum für Geburtshilfe, Kinder- und Jugendmedizin
Institut für Humangenetik

Direktor: Prof. Dr. med. Christian Kubisch

Mutationsanalyse der Kandidatengene *CATSPER3* und *SALL3* bei Patienten mit Intelligenzminderung und des *TGFB2*-Gens bei Patienten mit einer Erkrankung aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms

Dissertation

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

vorgelegt von:

Ruth Leutermann
aus Reinbek

Hamburg 2014

Angenommen von der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg am: 26.01.2015

Veröffentlicht mit Genehmigung der
Medizinischen Fakultät der Universität Hamburg.

Prüfungsausschuss, die Vorsitzende: Prof. Dr. K. Kutsche

Prüfungsausschuss, zweite Gutachterin: PD Dr. M. Rybczynski

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	Balancierte chromosomale Translokationen als Hilfsmittel zur Identifizierung neuer Krankheitsgene	1
1.1.1	Identifizierung von Kandidatengenomen Mendel'scher Erkrankungen mit Hilfe der Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung (FISH)	2
1.1.2	Bestätigung der möglichen Krankheitsgene durch Aufdecken weiterer Mutationen	3
1.2	Intelligenzminderung	3
1.2.1	Klinisches Spektrum der Intelligenzminderung	3
1.2.2	Ursachen der Intelligenzminderung	4
1.3	Bindegewbserkrankungen aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms	6
1.3.1	Marfan-Syndrom	6
1.3.2	Loeys-Dietz-Syndrom und familiäre thorakale Aortenaneurysmen und -dissektionen (TAAD)	9
1.3.3	<i>TFGB2</i> als neues Krankheitsgen für eine Erkrankung aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms	11
1.4	Ziel der Arbeit	12
2	Material und Methoden	14
2.1	Material	14
2.1.1	DNA- und Blutproben	14
2.1.2	Kits, Enzyme und Nukleinsäuren	14
2.1.3	Chemikalien und Lösungsmittel	15
2.1.4	Puffer und Lösungen	15
2.1.5	Oligonukleotide	16
2.1.6	Gerätschaften	19
2.1.7	Computerprogramme	20
2.1.8	Datenbanken	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Isolierung von genomischer DNA aus Leukozyten	23
2.2.2	Qualitätskontrolle der isolierten genomischen DNA	23
2.2.3	Amplifikation genomischer DNA	23
2.2.4	Polymerase-Kettenreaktion	24
2.2.5	Agarose-Gelelektrophorese	27
2.2.6	Aufreinigung von PCR-Produkten	28

2.2.7	Zyklische DNA-Sequenzierung	28
2.2.8	Aufreinigung von Sequenzierungsansätzen	30
2.2.9	Elektrophoretische Auftrennung der Sequenzprodukte	31
2.2.10	Quantifizierung von DNA mittels photometrischer Analyse	31
2.2.11	Quantitative Real-Time PCR	31
3	Ergebnisse	35
3.1	Mutationsanalyse des <i>CATSPER3</i> -Gens bei 150 Patienten mit Intelligenz- minderung	35
3.1.1	Vorarbeiten: Eingrenzung der Bruchpunktregion in 5q31.1 bei einem Patienten mit einer 1;5-Translokation und Intelligenzminderung	35
3.1.2	PCR-Amplifikation und Sequenzanalyse von <i>CATSPER3</i> bei 150 Patienten mit Intelligenzminderung	36
3.2	Mutationsanalyse des <i>SALL3</i> -Gens bei 150 Patienten mit Intelligenzmin- derung	39
3.2.1	Vorarbeiten: Eingrenzung der Bruchpunktregion in 18q23 bei einem Patienten mit einer 8;18-Translokation, Intelligenzminderung und Kleinwuchs	39
3.2.2	PCR-Amplifikation und Sequenzanalyse von <i>SALL3</i> bei 150 Pati- enten mit Intelligenzminderung	41
3.3	Mutationsanalyse des <i>TGFB2</i> -Gens bei 88 Patienten mit Bindegewebser- krankungen aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms	47
3.3.1	Vorbemerkungen	47
3.3.2	PCR-Amplifikation und Sequenzanalyse von <i>TGFB2</i> bei 88 Pati- enten mit Bindegewebserkrankungen aus dem Marfan-Formenkreis	47
3.3.3	Kopienzahlanalyse der <i>TGFB2</i> -Exons 2 und 8 mittels quantitativer Real-Time PCR	50
4	Diskussion	55
4.1	Keine eindeutig pathogene Mutation in <i>CATSPER3</i> und <i>SALL3</i> als Nach- weis für mit Intelligenzminderung assoziierte Krankheitsgene	55
4.2	Eine neue Mutation in <i>TGFB2</i> bei einem Patienten mit Aortenaneurysma und arterieller Tortuosität	60
4.2.1	Die Mutation c.1165dupA (p.S389Kfs*8) ist höchstwahrscheinlich für den Phänotyp des Patienten MARF# 218 ursächlich	60
4.2.2	Mit <i>TGFB2</i> -Mutationen assoziiertes phänotypisches Spektrum	62
5	Zusammenfassung	68

INHALTSVERZEICHNIS

Abkürzungsverzeichnis	vi
Literaturverzeichnis	vii
Publikationen	xv
Danksagung	xvi
Lebenslauf	xvii
Eidesstattliche Versicherung	xviii

1 Einleitung

1.1 Balancierte chromosomale Translokationen als Hilfsmittel zur Identifizierung neuer Krankheitsgene

Die Identifizierung neuer Krankheitsgene und die Aufklärung der zu Grunde liegenden Pathomechanismen ist eines der größten Forschungsfelder in der Humangenetik unserer Zeit. Derzeit sind 4311 Krankheitsgene für Mendel'sche Erbgänge bekannt. Bei weiteren 1681 Mendel'schen Krankheiten ist das krankheitsverursachende Gen noch unbekannt und bei 1845 Krankheiten wird ein Mendel'scher Erbgang vermutet (NCBI (*OMIM*), Stand Oktober 2014). Dies zeigt, dass erst ca. die Hälfte aller Krankheitsgene mit Mendel'scher Vererbung überhaupt identifiziert wurde.

Eine mögliche Methode zur Identifizierung neuer Krankheitsgene ist die molekulare Charakterisierung chromosomaler Aberrationen (Tommerup 1993). Die Inzidenz reziproker *de novo* Translokationen liegt in der Normalbevölkerung bei etwa 1:2000, ca. 6% dieser Fälle gehen mit phänotypischen Auffälligkeiten einher (Warburton 1991). Diese balancierten chromosomalen Aberrationen wie Translokationen und Inversionen können in Verbindung mit klinischen Auffälligkeiten hilfreich zur Identifizierung neuer Krankheitsgene sein. So können grundsätzlich drei Möglichkeiten in Betracht gezogen werden (Strachan u. Read 1999):

1. Der Zusammenfall von chromosomaler Aberration und klinischem Phänotyp ist rein zufällig.
2. Es bestehen submikroskopische Deletionen oder Duplikationen; das Rearrangement erscheint zytogenetisch nur balanciert.
3. Die Unterbrechung eines Gens oder eines regulatorischen Sequenzelementes stehen in direktem Zusammenhang mit der Erkrankung.

Im zweiten und dritten Fall lassen sich durch eine genaue Analyse der Bruchpunktregion und der dort ansässigen Gene wichtige Informationen über neue mögliche Krankheitsgene ableiten. Hierfür kann die Familienanamnese weitere wichtige Hinweise liefern: Liegt dieses Rearrangement nicht bei den Eltern des Patienten, also *de novo* vor, und zeigt nur der Indexpatient klinische Auffälligkeiten, steigt die Wahrscheinlichkeit einer kausalen Assoziation des chromosomalen Befundes mit der Erkrankung. Sollte das Rearrangement innerhalb der Familie mit dem Krankheitsphänotyp segregieren, erscheint ein Zusammenhang zwischen Chromosomenaberration und Krankheitsphänotyp als sehr wahrscheinlich.

1.1.1 Identifizierung von Kandidatengenem Mendel'scher Erkrankungen mit Hilfe der Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH)

Liegt das chromosomale Rearrangement *de novo* vor oder segregiert mit dem Krankheitsphänotyp, erscheint ein Zusammenhang zwischen Translokation und Krankheitsbild wahrscheinlich. Um zu untersuchen, ob keine submikroskopischen Imbalancen, z.B. im Bereich der Bruchpunkte, den Krankheitsphänotyp verursacht haben könnten, wird zunächst eine Array-basierte komparative Genomhybridisierung (Array-CGH) durchgeführt. Nach Ausschluss von krankheitsrelevanten Kopienzahlveränderungen werden die Translokationsbruchpunkte weiter eingegrenzt, wozu die Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung (FISH) angewandt wird. Dabei wird durch fluoreszenzmarkierte DNA-Sonden ein so genanntes *split signal* gesucht, also eine Sonde, die sowohl auf dem Wildtyp- als auch auf dem derivativen Chromosom hybridisiert und somit ein bruchpunktüberspannendes Signal liefert (siehe Abbildung 1.1). Dies erlaubt eine Eingrenzung der Bruchpunktregionen auf wenige Kilobasen (Liehr 2009).

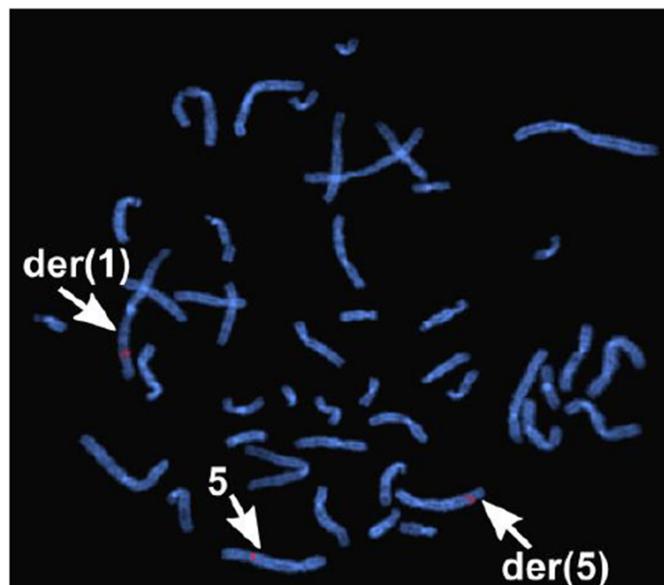


Abbildung 1.1: Fluoreszenz-*in-situ*-Hybridisierung an Metaphasechromosomen eines Patienten mit einer 1;5-Translokation

Das rot-fluoreszierende Signal der DNA-Sonde findet sich auf dem Wildtyp-Chromosom 5 und auf den derivativen Chromosomen 1 [der(1)] und 5 [der(5)]. Die Signale sind mit entsprechenden weißen Pfeilen markiert (Foto aus Chilian 2012).

Das Ergebnis einer Bruchpunkteingrenzung kann sein, dass das Rearrangement ein Gen direkt oder eine regulatorische Einheit des Gens unterbricht bzw. vom Gen entfernt und dies der Grund für die Krankheit ist (Strachan u. Read, 1999). Mittels Datenbankrecherche wird daher anschließend in den Bruchpunktregionen nach möglichen Kandidatengenem gesucht, die für den entsprechenden Phänotyp wahrscheinlich erscheinen.

1.1.2 Bestätigung der möglichen Krankheitsgene durch Aufdecken weiterer Mutationen

Nachdem ein entsprechendes Kandidatengen identifiziert wurde, ist eine Mutationsanalyse des Gens bei Patienten mit einem ähnlichen Phänotyp notwendig, um dieses Gen als Krankheitsgen bestätigen zu können (Strachan u. Read 1999). Dafür erfolgt die Rekrutierung einer Kohorte von Patienten mit einem ähnlichen Phänotyp und unauffälligem Karyotyp. Nach DNA-Isolierung und anschließender Sequenzierung des Kandidatengens wird nach weiteren Mutationen in diesem Gen gesucht. Dabei können nun auf DNA-Ebene beispielsweise Punktmutationen, wie Nonsense- oder Missense-Mutationen, detektiert werden. Ein *de novo*-Nachweis stellt meistens einen wichtigen Hinweis für die Pathogenität der entsprechenden Mutation dar (Robinson et al. 2011). Sollten in dem Gen mehrere Mutationen bei nicht-verwandten Patienten gefunden werden, so ist es sehr wahrscheinlich, dass dieses Gen auch tatsächlich mit dem klinischen Bild zusammenhängt. So führte dieses Vorgehen in der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche beispielsweise zur Identifizierung von *GRIN2A* und *GRIN2B* als Krankheitsgene für Intelligenzminderung und/oder Epilepsie (Endele et al. 2010).

1.2 Intelligenzminderung

1.2.1 Klinisches Spektrum der Intelligenzminderung

Intelligenzminderung ist nach der Einteilung der Weltgesundheitsorganisation (*World Health Organization*, WHO) ein Zustand verzögerter oder unvollständiger Entwicklung der geistigen Fähigkeiten, insbesondere der Wahrnehmung, Sprache, motorischen und sozialen Fertigkeiten. Verbunden ist dies mit einer verminderten Fähigkeit, den gewöhnlichen Anforderungen des Alltags gewachsen zu sein. Dies kann zusätzlich mit weiteren physischen oder geistigen Einschränkungen einhergehen (World Health Organization 2001).

Nach der 10. Version der ebenfalls von der Weltgesundheitsorganisation erarbeiteten Internationalen statistischen Klassifikation der Krankheiten und verwandter Gesundheitsprobleme (*International Statistical Classification of Diseases and Related Health Problems*, ICD-10) kann Intelligenzminderung wie folgt eingeteilt werden (Dilling u. World Health Organization 2011):

F70.- Leichte Intelligenzminderung

IQ-Bereiche von 50-69. Lernschwierigkeiten, Erwachsenen ist es oft möglich, zu arbeiten und soziale Beziehungen zu unterhalten.

F71.- Mittelgradige Intelligenzminderung

IQ-Bereiche von 35-49. Deutliche Entwicklungsverzögerung, den meisten Personen ist es

aber möglich, ein gewisses Maß an Unabhängigkeit und eine ausreichende Kommunikationsfähigkeit zu erlangen.

F72.- Schwere Intelligenzminderung

IQ-Bereiche von 20-34. Eine andauernde Unterstützung ist notwendig.

F73.- Schwerste Intelligenzminderung

IQ von unter 20. Die eigene Versorgung, Beweglichkeit und Kommunikation ist hochgradig beeinträchtigt.

F74.- Dissoziierte Intelligenz

Es besteht eine deutliche Diskrepanz (mindestens 15 IQ-Punkte) zwischen verschiedenen Teilbereichen.

Eine Einteilung nach den Ziffern F78.- (Andere Intelligenzminderung) und F79.- (Nicht näher bezeichnete Intelligenzminderung) ist möglich, wenn eine weitere Einteilung mit Hilfe der üblichen Verfahren auf Grund von begleitenden sensorischen oder körperlichen Beeinträchtigungen nicht möglich ist oder die Informationen über das Ausmaß der Intelligenzminderung nicht ausreichend gegeben sind.

1.2.2 Ursachen der Intelligenzminderung

Die Prävalenz der Intelligenzminderung wird insgesamt auf ca. 1-3% geschätzt (Roeleveld et al. 1997, World Health Organization 2001); die Angaben variieren stark, je nach Studie. Im Bereich der leichten Intelligenzminderung kann dies damit zusammenhängen, dass nicht jeder Fall diagnostiziert wird, insbesondere dann nicht, wenn die Kinder in der Schule in der Lage sind, zu folgen (Roeleveld et al. 1997). Flächendeckende Studien mit Intelligenztests erbrachten dagegen meist höhere Werte von knapp über 3% (Stein et al. 1976), dies mag jedoch auch mit *Overreporting* begründet sein (Roeleveld et al. 1997). Schwere Intelligenzminderung wird währenddessen relativ konstant mit einer Prävalenz von ca. 0,3% angegeben (Roeleveld et al. 1997, World Health Organization 2001), was auch darauf hinweist, dass schwere Intelligenzminderung weniger von exogenen Faktoren abhängt (Roeleveld et al. 1997). Die Ursachen für Intelligenzminderung sind vielfältig (siehe Abbildung 1.2), insgesamt sind ca. 20% mehr männliche Individuen betroffen, was sich durch X-chromosomale Vererbung erklären lässt (Roeleveld et al. 1997).

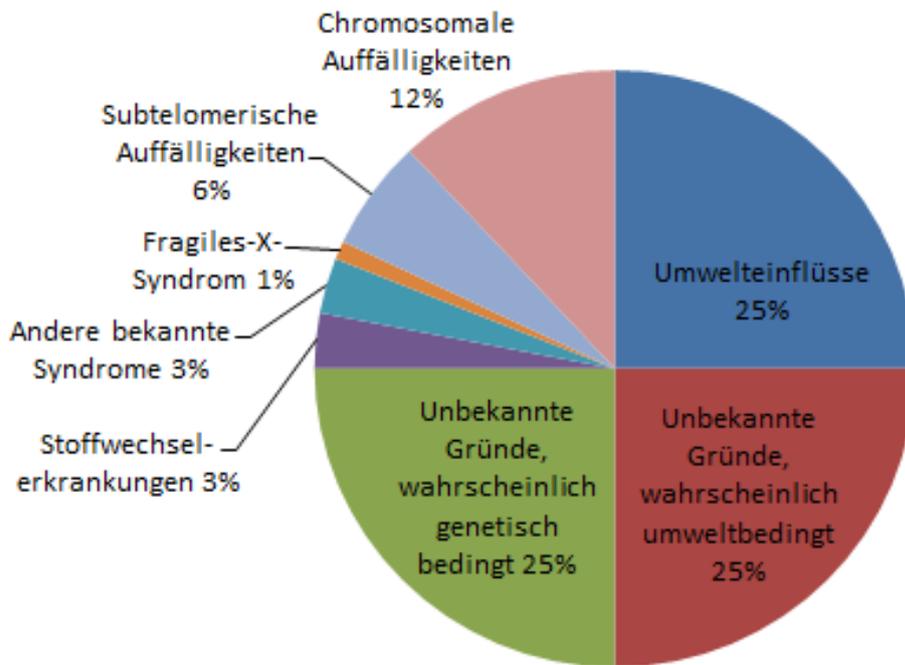


Abbildung 1.2: Übersicht zu Ursachen der Intelligenzminderung

Mögliche Ursachen der Intelligenzminderung und ihre Verteilung in der Gesellschaft sind dargestellt. (Abbildung modifiziert nach Winnepinckx et al. 2003)

Es kann zwischen genetisch bedingter und nicht-genetisch bedingter Intelligenzminderung unterschieden werden. Die häufigste verhinderbare nicht-genetische Ursache für Intelligenzminderung ist Iodmangel (Delange 2000). Weitere mögliche nicht-genetische Ursachen sind beispielsweise der Einfluss toxischer Substanzen, wie z.B. Alkohol, in der Schwangerschaft, Asphyxie, Frühgeburtlichkeit, Neugeboreneninfektionen oder auch schwere Traumata wie Hirnblutungen (Chelly et al. 2006). Genetische Ursachen sind auf chromosomaler, monogener, polygener und mitochondrialer Ebene möglich (siehe Tabelle 1.1).

Chromosomale Auffälligkeiten

- Nummerische Chromosomenaberrationen
- Strukturelle Chromosomenaberrationen
- Submikroskopische Aberrationen
 - Interstitielle Duplikationen und Deletionen
 - Subtelomerische Duplikationen und Deletionen

Monogene Ursachen

- Autosomal-dominant
- Autosomal-rezessiv
- X-chromosomal

Polygene Ursachen

Mitochondriale Ursachen

Tabelle 1.1: Übersicht über die verschiedenen genetischen Ursachen der Intelligenzminderung

Dargestellt sind die möglichen genetischen Ursachen der Intelligenzminderung und ihre Einteilungen (Tabelle nach Winnepinckx et al. 2003)

Die häufigste genetische Ursache für Intelligenzminderung ist die Trisomie 21 mit einer Prävalenz von 1/700 und einem breiten klinischen Erscheinungsbild (Rehder u. Fritz 2005). Die meisten monogenen Defekte sind zur Zeit auf dem X-Chromosom bekannt, die Anzahl der bekannten autosomal-rezessiven Krankheitsgene steigt allerdings zunehmend (Chelly et al. 2006). Derzeit sind ca. 450 Gene bekannt, in denen Mutationen Intelligenzminderung verursachen können (van Bokhoven 2011). Allerdings wird geschätzt, dass bis zu 1400 Gene krankheitsassoziiert sein könnten (Raymond 2010). Neuere Untersuchungen mittels Exomsequenzierung deuten zusätzlich darauf hin, dass der Großteil der mit Intelligenzminderung assoziierten Erkrankungen durch autosomal-dominante *de novo* Mutationen in bisher nicht bekannten Krankheitsgenen bedingt ist (Vissers et al. 2010).

1.3 Bindegewebserkrankungen aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms

1.3.1 Marfan-Syndrom

Das Marfan-Syndrom wurde erstmals 1896 von dem französischen Kinderarzt Antoine Marfan in einer Abhandlung über ein 5-jähriges Mädchen mit Arachnodaktylie beschrieben (Gott 1998). Es hat eine geschätzte Prävalenz von 1/10.000 und zeigt eine hohe Penetranz und klinische Variabilität, sowohl interfamiliär als auch zwischen verschiedenen Familienmitgliedern. Sogar neonatale Formen des Marfan-Syndroms sind beschrieben (Milewicz 1994). Ca. ein Viertel der Fälle ist durch eine Neumutation bedingt (Milewicz

1994). Das klinische Bild des Marfan-Syndroms ist gekennzeichnet durch eine Bindegewebsschwäche und Fehlbildungen des kardiovaskulären und des skelettalen Systems, der Augen und der Haut (Dietz 2011, Faivre et al. 2009). Am Herzen zeigen sich regelmäßig Mitral- oder Aortenklappeninsuffizienzen und frühe Aortenaneurysmen und -dissektionen, die eine Operation unumgänglich machen (Dietz 2011). Unbehandelt liegt, insbesondere durch akute Aortendissektionen (ca. 80%) bedingt, das mittlere Todesalter bei 32 Jahren; durch eine frühe operative Intervention konnte dies allerdings in den letzten 30 Jahren signifikant bis auf 61 Jahre gesteigert werden (Finkbohner et al. 1995, Mommertz et al. 2008). Skelettale Fehlbildungen zeigen sich oft an der Wirbelsäule, dem Sternum, den Händen und den Füßen. So entwickeln bis zu 2/3 aller Patienten mit Marfan-Syndrom ein Pectus excavatum oder carinatum, sowie bis zu 60% aller Patienten eine Skoliose (Dieckmann et al. 2003). Zu Diagnosezwecken zeigt sich ebenfalls oft ein reduzierter Quotient von oberer zu unterer Körperhälfte bzw. ein positives Verhältnis von Armspann zu Körpergröße sowie ein positives Daumen- und Handgelenkzeichen (siehe Abbildung 1.3) (Dieckmann et al. 2003). Arachnodaktylie, überstreckbare Gelenke, Plattfüße und ein hoher gotischer Gaumen kommen ebenfalls vor (Faivre et al. 2009). Die schwerwiegendste Komplikation des Auges ist die Subluxation der Linse an einem oder beiden Augen bei bis zu 80% der Patienten (Zheng et al. 2012); Myopie kommt ebenfalls regelmäßig vor (Dietz 2011). Weiterhin kann als schwerwiegende Komplikation ein Spontanpneumothorax auftreten (Dietz 2011). Die Bindegewebsschwäche der Haut zeigt sich in Striae distensae und rezidivierenden Hernien (Dietz 2011, Faivre et al. 2009). Eine Schwangerschaft bei betroffenen Frauen gestaltet sich oft komplikationsreich und erhöht das Risiko einer Aortendissektion weiter (Dietz 2011). Eine Duraektasie kommt ebenfalls häufig vor, hat jedoch keinen Krankheitswert. Sie stellt daher nur ein weiteres diagnostisches Kriterium für das Marfan-Syndrom dar (Dieckmann et al. 2003). Faziale Dysmorphien mit einem länglichen Gesicht und Enophthalmus, nach lateral absteigenden Lidachsen, flachen Wangenknochen und Retrognathie sind typisch (Dietz 2011). Beispielhafte klinische Merkmale des Marfan-Syndroms sind in Abbildung 1.3 gezeigt.

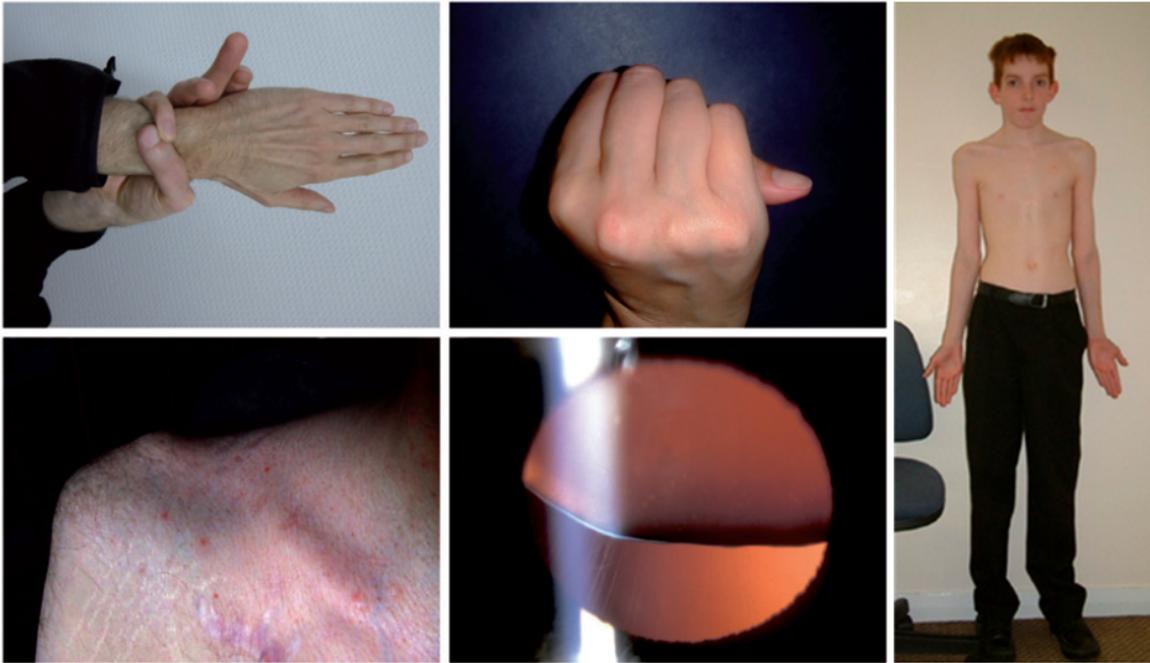


Abbildung 1.3: Typische klinische Auffälligkeiten des Marfan-Syndroms

Links oben: Positives Handgelenkszeichen; der Daumen und der kleine Finger überschneiden sich beim Umfassen des Handgelenks der anderen Hand. Mitte oben: Positives Daumenzeichen; der komplette Nagel des Daumens ist sichtbar, wenn locker eine Faust geschlossen wird. Links unten: Striae atrophicae der rechten Schulter eines männlichen Patienten mit Marfan-Syndrom. Mitte unten: Unter der Spaltlampe zeigt sich die typische Dislokation der Linse nach oben temporal. Rechts: Ein 12-jähriger Junge mit Marfan-Syndrom und Hochwuchs, Arachnodaktylie und Pes planus (Fotos aus Dean 2007, Sheikhzadeh et al. 2012).

Das Marfan-Syndrom wird autosomal-dominant vererbt; heterozygote Mutationen in dem *FBN1*-Gen sind für das Krankheitsbild ursächlich (Dietz et al. 1991). Bei 70 bis 93% der Patienten mit Marfan-Syndrom wird eine Mutation in diesem Gen gefunden (Dietz 2011). Haploinsuffizienz und/oder dominant-negative Effekte scheinen dabei die zu Grunde liegenden Krankheitsmechanismen zu sein (Dietz 2011, Jondeau 2011, Mátyás et al. 2007). *FBN1* kodiert für Fibrillin-1, ein 350 kDa schweres Glykoprotein der extrazellulären Matrix, welches ein molekulares Rückgrat der extrazellulären Mikrofibrillen bildet und in vielen Geweben und Organen des Körpers vertreten ist, insbesondere in den Arterienwänden (Booms et al. 2000). Fibrillin-1 bindet den *transforming growth factor-beta* (TGF- β) (Jondeau et al. 2011). Wird TGF- β vom Fibrillin-1 gelöst, kann dies über die TGF- β Rezeptoren 1 und 2 intrazellulär als Transkriptionsfaktor für verschiedene Gene (unter anderem für den *connective tissue growth factor* (CTGF) und TGF- β selbst, siehe Abbildung 1.5 und Abschnitt 1.3.2) wirken (Jondeau et al. 2011). Im Mausmodell für das Marfan-Syndrom konnten unter anderem erhöhte Werte von TGF- β in glatten Muskelzellen gemessen werden (Nataatmadja et al. 2006).

1.3.2 Loeys-Dietz-Syndrom und familiäre thorakale Aortenaneurysmen und -dissektionen (TAAD)

Das Loeys-Dietz-Syndrom wurde 2005 erstmals von Loeys und Dietz beschrieben (Loeys et al. 2005). Es gehört ebenfalls zum Formenkreis der Bindegewebserkrankungen und ist ein zum Marfan-Syndrom ähnliches Krankheitsbild. Es zeigen sich faziale Auffälligkeiten (siehe Abbildung 1.4), wie Hypertelorismus, Strabismus, Gaumenspalte bzw. gespaltene Uvula, Kraniosynostose, Retrognathie und Malarhypoplasie (Kalra et al. 2011).

Typisch ist die Trias aus Hypertelorismus, Gaumenspalte bzw. gespaltener Uvula und Aneurysmen der Arterien (Van Hemelrijk et al. 2010). Aneurysmen und Dissektionen zeigen sich hier deutlich aggressiver und früher (mittleres Todesalter 26 Jahre) und sind nicht auf die Aorta beschränkt (Loeys et al. 2006). Zusätzlich zeigen die Arterien bei einem Großteil der Patienten eine Tortuosität, die beim Marfan-Syndrom nicht beschrieben ist (Loeys et al. 2006). Andere Auffälligkeiten wie hyperflexible Gelenke, Thoraxdeformitäten, Skoliose, Klumpfüße oder Arachnodaktylie kommen ebenfalls regelmäßig vor, eine Augenbeteiligung zeigt sich allerdings nicht (Loeys et al. 2006, Stheneur et al. 2008, Van Hemelrijk et al. 2010).

Ursächlich für das Syndrom sind Mutationen in einem der beiden Gene *TGFBR1* und *TGFBR2*; die Vererbung erfolgt autosomal-dominant (Loeys et al. 2006). Diese Gene kodieren für transmembrane Serin/Threoninkinasen (TGF- β -Rezeptoren 1 und 2), die TGF- β binden und somit den weiteren TGF- β -Signalweg aktivieren können (siehe Abbildung 1.5) (Okadome et al. 1994).

TGF- β ist normalerweise über *latent TGF- β binding proteins* (LTBP) an die extrazelluläre Matrix, insbesondere Fibrillin (siehe 1.3.1), gebunden (Hayashi u. Sakai 2012). Wird TGF- β beispielsweise durch Proteolyse oder eine verminderte Bindungsfähigkeit des Fibrillins aus der Matrix gelöst, bindet es an den TGF- β -Rezeptor 2. Dieser kann nun zusammen mit dem TGF- β -Rezeptor 1 einen heteromeren Komplex bilden. Der TGF- β -Komplex aktiviert intrazellulär Smad 2 und 3 über Phosphorylierung, welche dann zusammen mit Smad 4 in den Zellkern gelangen und dort als Transkriptionsfaktoren wirken können. Dies führt unter anderem zur vermehrten Expression des *connective tissue growth factors* (CTGF) und TGF- β selbst (Jondeau et al. 2011). Mutationen in *SMAD3* sind ebenfalls



Abbildung 1.4: Kind mit Loeys-Dietz-Syndrom

Mädchen mit Loeys-Dietz-Syndrom und typischen fazialen Auffälligkeiten, insbesondere dem Hypertelorismus. (Foto aus Erkula et al. 2010)

beschrieben und führen zu dem Aneurysmen-Osteoarthritis-Syndrom (van de Laar et al. 2011). Dies geht neben frühen Aortendissektionen mit einer starken Gewundenheit der Arterien und früh auftretender Osteoarthritis einher (van de Laar et al. 2011).

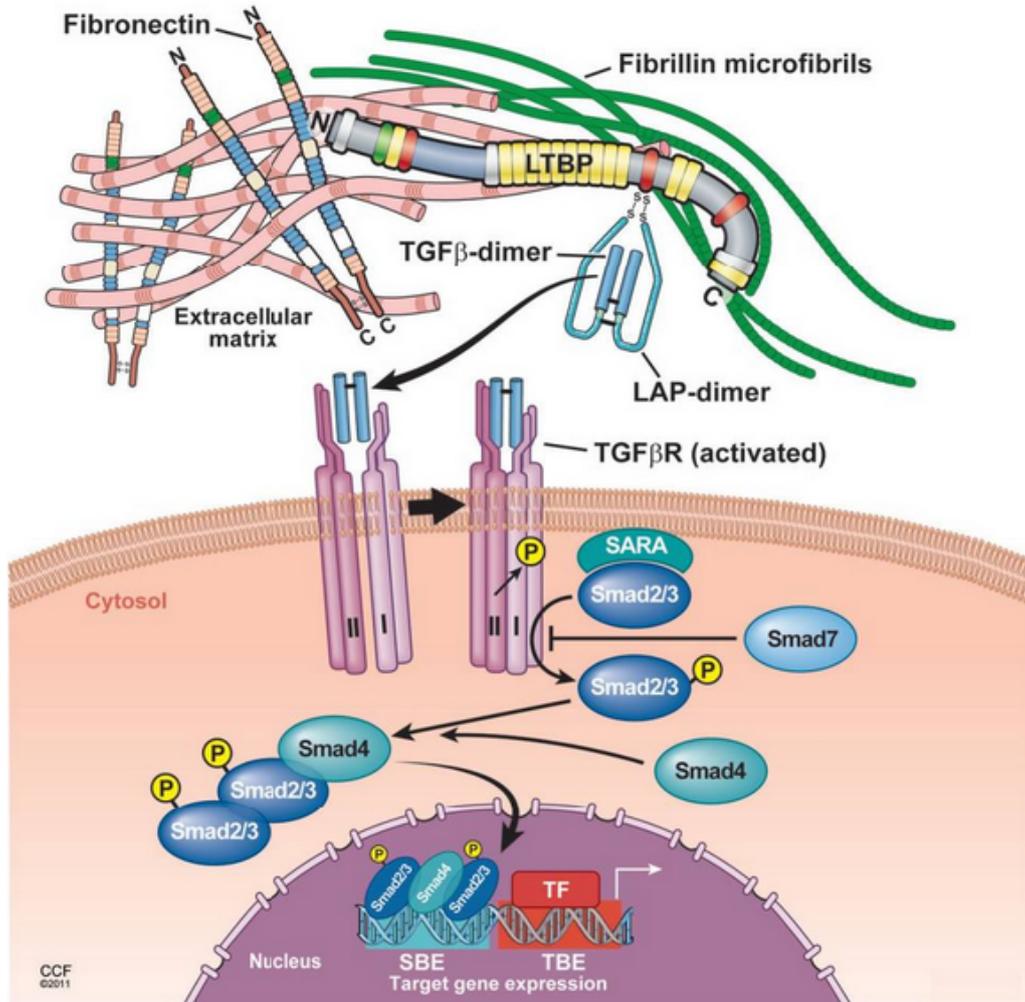


Abbildung 1.5: TGF- β Signalweg

Das *latent TGF- β binding protein* (LTBP) ist an die Extrazellulärmatrix (u. a. Fibrillin) gebunden. Als Antwort auf Gewebeverletzungen löst sich aktives TGF- β aus dem TGF- β -Komplex (mit dem *latency associated peptide*, LAP) vom LTBP und kann an den TGF- β -Rezeptor 2 binden. Dies führt über Phosphorylierung des TGF- β -Rezeptors 1 zur Bildung eines heteromeren TGF- β -Rezeptorkomplexes aus TGF- β -Rezeptor 1 und 2. Dieser kann durch die Serin/Threoninkinase-Aktivität über das *Smad anchor for receptor activation*-Protein (SARA) Smad 2 und 3 phosphorylieren, was wiederum zur Bindung von Smad4 führt. Dieser trimere Komplex wandert in den Zellkern, um dort die Gentranskription am *Smad-binding element* (SBE) von beispielsweise TGF- β 1 zusammen mit weiteren Transkriptionsfaktoren (TF) zu aktivieren (Abbildung aus Hayashi u. Sakai 2012).

Mutationen in anderen Genen können ursächlich für familiäre Aortenaneurysmen und -dissektionen sein, teils sind dabei vaskuläre Manifestationen die einzigen Auffälligkeiten. So haben bis zu 20% aller Patienten mit einem Aortenaneurysma oder einer -dissektion einen erstgradigen Verwandten mit TAAD (Milewicz u. Regalado 2012). Diagnostiziert

wird TAAD nach Ausschluss eines Marfan-Syndroms, Loeys-Dietz-Syndroms oder dem vaskulären Typ des Ehlers-Danlos-Syndroms [eine Bindegewebserkrankung mit nicht nur erhöhtem Risiko für Aortenaneurysmen, sondern auch für die Ruptur anderer Organe, wie z. B. der Intestinalorgane oder des Uterus; ursächlich ist eine Mutation im Gen *COL3A1* (Beridze u. Frishman 2012)], aber einer positiven Familienanamnese für Aortenaneurysmen und/oder -dissektionen (Milewicz u. Regalado 2012). Als kausale Gene wurden bisher *TGFBR1*, *TGFBR2*, *MYH11*, *ACTA2*, *FBN1*, *MYLK*, *SMAD3*, *TGFB2* und *PRKG1* beschrieben (Boileau et al. 2012, Guo et al. 2013, Lindsay et al. 2012, Milewicz u. Regalado 2012). Meist werden diese Formen der familiären TAAD autosomal-dominant, allerdings mit unvollständiger Penetranz vererbt (von Kodolitsch et al. 2010). Eine weitere Form der nicht-syndromalen TAAD ist mit dem Auftreten einer bikuspiden Aortenklappe (BAV) assoziiert, welche unter anderem durch Mutationen im *NOTCH1*-Gen verursacht wird (Garg et al. 2005).

1.3.3 *TFGB2* als neues Krankheitsgen für eine Erkrankung aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms

In zwei 2012 erschienenen Publikationen von Boileau et al. und Lindsay et al. wird *TGFB2* als ein neues Krankheitsgen für familiäre Aortenaneurysmen mit Marfan-ähnlichem Phänotyp beschrieben. Zehn heterozygote Mutationen (drei Missense- [p.Arg327Trp, p.Arg330Cys und p.Pro366His] und drei Nonsense-Mutationen [p.Tyr99*, p.Glu102* und p.Cys229*], zwei Frameshift-Mutationen [p.Tyr341Cysfs*25 und p.Tyr369Cysfs*26], eine Deletion *in frame* [p.Ala100_Tyr104del] sowie eine Duplikation [c.873_888dup führt zu p.Asn297*]) und zwei Patienten mit einer 6,5 Mb bzw. einer 3,5 Mb großen *de novo* Mikrodeletion, die jeweils das komplette *TGFB2*-Gen umfassten, wurden bisher beschrieben (Boileau et al. 2012, Lindsay et al. 2012). Diese Patienten wiesen insgesamt ein phänotypisches Spektrum auf, das Überschneidungen sowohl zum Marfan- als auch zum Loeys-Dietz-Syndrom hat. Das mittlere Erkrankungsalter für ein Aortenaneurysma betrug 35 Jahre, dies lag meist auf Höhe der Sinus valsalvae. Eine Tortuosität der Arterien wurde bei 60% der Patienten beschrieben (Boileau et al. 2012). Es zeigten sich ebenfalls skelettale Auffälligkeiten, wie Hochwuchs, Brustdeformitäten, Arachnodaktylie, Plattfüße, überbewegliche Gelenke, ein hoher gotischer Gaumen und seltener Skoliosen (Boileau et al. 2012, Lindsay et al. 2012). Striae atrophicae wurden bei ca. 50% der Patienten und Leistenhernien bei 35% beschrieben (Boileau et al. 2012). Duraektasien kamen ebenfalls regelmäßig vor (Boileau et al. 2012, Lindsay et al. 2012). Eine Augenbeteiligung fand sich nicht. Faziale Dismorphien zeigten sich nur bei einem kleinen Teil der Patienten. Sie umfassten eine gespaltene Uvula, einen Hypertelorismus, Malarhypoplasie und Retrognathie (siehe Abbildung 1.6, Lindsay et al. 2012). Die beiden Patienten mit den Mikrodeletionen

wiesen zusätzlich zu dem Marfan-Syndrom ähnlichen Phänotyp eine milde Entwicklungsverzögerung auf (Lindsay et al. 2012). Als Pathomechanismus wird hier auf Grund der Funktionsverlustmutationen Haploinsuffizienz angenommen (Boileau et al. 2012, Lindsay et al. 2012). Untersuchungen an *Tgfb2*^{+/-}-Mäusen bestätigten diese Annahme. Die heterozygoten Tiere hatten ebenfalls Aortenwurzlaneurysmen und zeigten biochemisch paradoxerweise eine erhöhte Aktivität des TGF- β -Signalwegs (Lindsay et al. 2012). Dies führte zu der Vermutung, dass kompensatorische autokrine oder parakrine Mechanismen zur Pathogenese dieser Vaskulopathie beitragen (Lindsay et al. 2012).



Abbildung 1.6: Phänotypische Merkmale einzelner Patienten mit *TGFB2*-Mutation

Die Auffälligkeiten beinhalteten Hypertelorismus (1-II:1, 3-III:1 und 7-III:1), Malarhypoplasie (1-II:1, 2-II:1, 3-III:1, 4-II:1 und 7-III:1), Retrognathie (1-II:1, 3-III:1, 4-II:1 und 7-III:1), Arachnodaktylie (1-II:1 und 4-II:1), Pectus excavatum (7-III:1), Pes planus (1-II:1 und 3-III:1) und Hammerzehen (1-II:1) (Abbildung aus Lindsay et al. 2012).

1.4 Ziel der Arbeit

Sowohl für Intelligenzminderung als auch für Bindegewebserkrankungen aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms konnten bisher nur bei einem Teil der Patienten ursächliche Mutationen in Genen gefunden werden bzw. existieren für das neu entdeckte Krankheits-

gen *TGFB2* erst sehr wenige Daten.

In der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche wurden 2012 von Frau Dr. Bettina Chilian durch serielle FISH-Analysen *CATSPER3* und *SALL3* als Kandidatengene für Intelligenzminderung identifiziert (Chilian 2012). *CATSPER3* kodiert für ein Calciumkanalprotein und war bei einem Translokationspatienten mit Entwicklungsverzögerung und Autismus mit dem Karyotyp 46,XY,t(1;5)(q41-q42;q31) direkt unterbrochen. Bei einem weiteren Translokationspatienten mit dem Karyotyp 46,XY,t(8;18)(q11.23-q12.1;q22.3-q23) befand sich der Bruchpunkt auf Chromosom 18 in der 5'-Region des *SALL3*-Gens oder kurz davor. Dieser Patient zeigte eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung, hypotone Muskulatur, Wachstumsretardierung und eine Epilepsie. Um diese beiden möglichen Kandidatengene für Intelligenzminderung zu bestätigen, sollten im Rahmen dieser Arbeit *CATSPER3* und *SALL3* bei 150 Patienten mit Intelligenzminderung mittels Sequenzanalyse untersucht werden und neue Varianten hinsichtlich ihrer Krankheitsrelevanz analysiert werden.

Im zweiten Teil dieser Arbeit sollten 88 Patienten mit einer Bindegewebserkrankung aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms mittels Sequenzanalyse und quantitativer Real-Time PCR hinsichtlich genetischer Veränderungen im *TGFB2*-Gen untersucht werden. *TGFB2* wurde erst kürzlich als ein neues Krankheitsgen für syndromale Aortenaneurysmen identifiziert (Boileau et al. 2012, Lindsay et al. 2012). Die Patienten mit den bisher identifizierten Mutationen zeigten ein variables klinisches Spektrum mit frühen Aortenaneurysmen, Skelettauffälligkeiten wie Hochwuchs, Skoliose oder überbeweglichen Gelenken und fazialen Dismorphien. Das Auffinden von neuen Mutationen sollte dazu beitragen, das phänotypische Spektrum, das mit *TGFB2*-Mutationen einhergeht, näher zu charakterisieren und in das klinische Bild des Marfan- und/oder Loeys-Dietz-Syndroms einordnen zu können.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 DNA- und Blutproben

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 150 DNA-Proben von Patienten mit unterschiedlich stark ausgeprägter Intelligenzminderung untersucht, wobei einige der Patienten noch zusätzlich eine Epilepsie unterschiedlichen Schweregrades aufweisen. Zur Verfügung gestellt wurden diese DNA-Proben aus den Instituten für Humangenetik der Universitätskliniken aus Lübeck (Patienten Nr. 1-29, 31-37, 39, 42-68, 70-72, 74-77, 80-105, 189-194, Ansprechpartnerin Dr. med. Irina Hüning) und Kiel (Patienten Nr. 142-188, Ansprechpartnerin Dr. med. Almuth Caliebe).

Ebenfalls untersucht wurden 88 aus EDTA-Blutproben isolierte DNA-Proben von Patienten (MARF-Nr. 7, 10, 14, 21, 23, 26, 29, 30, 34, 40, 42, 43, 45, 46, 53, 54, 57, 64, 67, 74, 90, 97, 99, 120, 121, 145, 147, 151, 153, 156, 157, 159, 161, 162, 166, 167, 168, 169, 170, 172, 173, 174, 176, 177, 180, 181, 183, 193, 194, 196, 198, 199, 201, 206, 210, 215, 218, 231, 234, 240, 244, 248, 250, 253, 255, 266, 270, 272, 273, 281, 286, 290, 294, 305, 313, 314, 315, 326, 328, 329, 332, 341, 350, 363, 366, 413, 414, 415) aus der Marfan-Sprechstunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf mit Bindegewebserkrankungen aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms. Dabei wiesen diese Patienten entweder ein entsprechend der Ghent-Nosologie (De Paepe et al. 1996) klinisch gesichertes Marfan-Syndrom, ein frühes Aortenaneurysma oder einzelne beim Marfan-Syndrom vorkommende Auffälligkeiten, wie beispielsweise skelettale Anomalien, auf. Mutationen in den bisher bekannten Krankheitsgenen *FBN1*, *TGFBR1* und *TGFBR2* lagen nicht vor.

Die Patienten selbst, oder im Falle von Minderjährigkeit die Eltern der Patienten, waren über die Art und das Ziel der Arbeit aufgeklärt, ihre Teilnahme erfolgte freiwillig.

2.1.2 Kits, Enzyme und Nukleinsäuren

illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit	GE Healthcare (Freiburg)
Exonuclease I (Exo I) (20 U/µl)	Thermo Scientific (Karlsruhe)
FastAP Thermosensitive Alkaline Phosphatase (1 U/µl)	Thermo Scientific (Karlsruhe)
<i>Taq</i> DNA Polymerase	Thermo Scientific (Karlsruhe)
<i>Taq</i> PCR [®] DNA Polymerase	Invitrogen (Darmstadt)
GC-RICH PCR System	Roche Applied Science (Mannheim)
SYBR [®] Green Jump Start [™] <i>Taq</i> ReadyMix [™]	Sigma-Aldrich (München)

QIAamp DNA Blood Mini Kit	Qiagen (Hilden)
BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems (Darmstadt)
DNA-Standard (100 Bp u. 1 kb Leiter)	Invitrogen (Darmstadt)
Nukleotidmix (dNTPs) (je 10 mM)	Invitrogen (Darmstadt)

2.1.3 Chemikalien und Lösungsmittel

Agarose	Invitrogen (Darmstadt)
Borsäure	Merck (Darmstadt)
Ethanol	J.T. Baker (Deventer, Niederlande)
Ethidiumbromid	Merck (Darmstadt)
Ethylendinitrilotetraessigsäure, Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Merck (Darmstadt)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems (Darmstadt)
HPLC-Wasser	Merck (Darmstadt)
Natriumacetat	Merck (Darmstadt)
Orange-G	Sigma-Aldrich (München)
Tris-(Hydroxymethyl-)aminomethan (Tris)	Sigma-Aldrich (München)

2.1.4 Puffer und Lösungen

10x TE Puffer	100 mM Tris 10 mM EDTA pH 7,5
10x TBE	890 mM Tris 890 mM Borsäure 20 mM EDTA pH 8,0
10x Ladepuffer	25 ml Glycerin (100%) 25 ml 1x TBE 20 mg Orange-G
Ethidiumbromid	0,05% (in Aqua dest.)

2.1.5 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide (Primer) für die PCR wurden so entworfen, dass sie bei einer Länge von 18-24 bp einen G/C-Gehalt von ca. 50% aufweisen und möglichst keine Sekundärstrukturen oder Primer-Dimere bilden. Ein Primerpaar deckte dabei möglichst ein gesamtes Exon inklusive der flankierenden Intronsequenzen ab. Sollte das Exon zu groß gewesen sein, wurde es in mehrere Fragmente aufgeteilt. Zusätzlich wurden an die Primer für *CATSPER3* und *TGFB2* noch M13-Sequenzen angehängt, die es erlaubten, für die Sequenzierungsreaktion aller Exons nur diesen einen M13 Vorwärts- oder Rückwärtsprimer zu verwenden.

Die Oligonukleotide für die qPCR wurden mit Hilfe des *qPCR Primer & Probe Design*-Programms der Firma Eurofins MWG Operon entworfen. Dabei deckten sie meist nicht das gesamte Exon ab, sondern nur einen Teil der Sequenz.

Alle Oligonukleotide wurden über die Firma Sigma-Aldrich (München) bezogen, die Oligonukleotide für die qPCR dabei zusätzlich noch HPLC-aufgereinigt. Sie wurden zuerst so in 10x TE gelöst, dass eine 100 pmol/µl Lösung entstand. Aliquots für die PCR wurden anschließend mit HPLC-H₂O auf 10 pmol/µl verdünnt.

Die nachstehenden Oligonukleotide wurden für die PCR und die Sequenzierung der drei Gene verwendet. Intronische Sequenzen sind in Kleinbuchstaben, exonische Sequenzen in Großbuchstaben dargestellt. Die Sequenz der M13-Primer ist kursiv.

Tabelle 2.4: Verwendete M13-Primer

Name	5'→3' Sequenz
M13F	<i>tgtaaaacgacggccagt</i>
M13R	<i>caggaaacagctatgacc</i>

Tabelle 2.5: Verwendete Primer für *CATSPER3*

Name	5'→3' Sequenz	Exon
CATSPER3_Ex1F	<i>tgtaaaacgacggccagtacacactggtaatgcaacagaatg</i>	1
CATSPER3_Ex1R	<i>caggaaacagctatgacctggtgtaagcagacgagtatctgagg</i>	1
CATSPER3_Ex2F	<i>tgtaaaacgacggccagtgagaaagcagagccttgccctac</i>	2
CATSPER3_Ex2R	<i>caggaaacagctatgaccatgtttccagaaataaagcatg</i>	2
CATSPER3_Ex3F2	<i>tgtaaaacgacggccagtctcatgtgggtgacttaggagcac</i>	3
CATSPER3_Ex3R2	<i>caggaaacagctatgaccatggtagtagagtcattatttcc</i>	3
CATSPER3_Ex4F2	<i>tgtaaaacgacggccagtctgggcacagttctgattcacttc</i>	4
CATSPER3_Ex4R2	<i>caggaaacagctatgaccatcacaggcctagagacagcgatg</i>	4

Tabelle 2.5: Verwendete Primer für *CATSPER3* – Fortsetzung

Name	5'→3' Sequenz	Exon
CATSPER3_Ex5F	<i>tgtaaacgacggccagtgctgggactcctctagcataggt</i>	5
CATSPER3_Ex5R	<i>tccacttcattgggaagacacagc</i>	5
CATSPER3_Ex6F	<i>aagtgctcctgctgaggcctgag</i>	6
CATSPER3_Ex6R	<i>caggaaacagctatgaccgaggccacctgctctctacacagg</i>	6
CATSPER3_Ex7F	<i>tgtaaacgacggccagtaaggctgaagcttccttcaggac</i>	7
CATSPER3_Ex7R	<i>caggaaacagctatgaccctgccatcagcacttcagtcac</i>	7
CATSPER3_Ex8F	<i>tgtaaacgacggccagttctacacctgtgcaggtgcaaac</i>	8
CATSPER3_Ex8R	<i>caggaaacagctatgaccggaatcacacttcatgagcacctg</i>	8

Für Exon 5 und 6 des *CATSPER3*-Gens konnte ein gemeinsames PCR-Produkt generiert werden; die Sequenzierung erfolgte allerdings getrennt. Daher fehlen dort die M13-Primer.

Tabelle 2.6: Verwendete Primer für *SALL3*

Name	5'→3' Sequenz	Exon
SALL3_e1_F	<i>cagcctaattgctcagccc</i>	1
SALL3_e1_R	<i>gaagcaggaactttctccc</i>	1
SALL3_e2f1_F	<i>tcatagaatacgcacgctgg</i>	2 (Fragment 1)
SALL3_e2f1_R	<i>CTCGGCCTCCTTCTCCAC</i>	2 (Fragment 1)
SALL3_e2f2b_F	<i>CTGCGCCGAGTTCTTCAAGT</i>	2 (Fragment 2)
SALL3_e2f2c_R	<i>AGGGCCATGAGCTGTTCCAG</i>	2 (Fragment 2)
SALL3_e2f3b_F	<i>AGCACCAACGTGACCCTGGA</i>	2 (Fragment 3/4)
SALL3_e2f4_R	<i>GCTCGAACACCGACACATT</i>	2 (Fragment 3/4)
SALL3_e2f5_F	<i>CCGCTTCTACCTCAGACTTCC</i>	2 (Fragment 5)
SALL3_e2f5_R	<i>TTGCTGTCCAGCCAGGTG</i>	2 (Fragment 5)
SALL3_e2f6_F	<i>CCGAGTACCTGGACAACGTG</i>	2 (Fragment 6)
SALL3_e2f6_R	<i>ACGGGCTCGGCTTTAGTG</i>	2 (Fragment 6)
SALL3_e2f7_F	<i>GAGTGCGCCTCCTTGTC</i>	2 (Fragment 7)
SALL3_e2f7_R	<i>CGAAGTGCGTCTTGAGGTTG</i>	2 (Fragment 7)
SALL3_e2f8_F	<i>AGAACATCGACAAGAAGATGACG</i>	2 (Fragment 8)
SALL3_e2f8_R	<i>CGTTCTCCACGGACTTGAG</i>	2 (Fragment 8)
SALL3_e2f9_F	<i>TGAGCAGCTACGATGACGAC</i>	2 (Fragment 9)
SALL3_e2f9_R	<i>CTCTCACCATTGCTGGGG</i>	2 (Fragment 9)
SALL3_e2f10_F	<i>GAGAGTGACCGCCTGAGC</i>	2 (Fragment 10)

Tabelle 2.6: Verwendete Primer für *SALL3* – Fortsetzung

Name	5'→3' Sequenz	Exon
SALL3_e2f10_R	AAAAGGCTTGCCACAGACAC	2 (Fragment 10)
SALL3_e2f11_F	AGGAAATCCCGCTCAAGACC	2 (Fragment 11)
SALL3_e2f11_R	GGCCCATCACTGTCTGAGG	2 (Fragment 11)
SALL3_e2f12_F	AGTTATTTGACCCCAACTTTGC	2 (Fragment 12)
SALL3_e2f12_R	ctggccaggataggagcag	2 (Fragment 12)
SALL3_e3f1_F	acctgtgttttgtgtccgtaag	3 (Fragment 1)
SALL3_e3f1_R	CAGTGCCTGCTTTGTCCATC	3 (Fragment 1)
SALL3_e3f2_F	AAATGTTCCAGAAGGACCTGG	3 (Fragment 2)
SALL3_e3f2_R	CATGCAGCGCTTACAAGACC	3 (Fragment 2)

Tabelle 2.7: Verwendete Primer für *TGFB2*

Name	5'→3' Sequenz	Exon
TGFB2_Ex1F	<i>tgtaaacgacggccagt</i> TCTTCTTACTCGCCAAAGTCAGGG	1
TGFB2_Ex1R	<i>caggaaacagctatgaccagcatacaactgaaaaggaggtgg</i>	1
TGFB2_Ex2F	<i>tgtaaacgacggccagtcaggtagcaggaccttatttctg</i>	2
TGFB2_Ex2R	<i>caggaaacagctatgaccctcaggtacaaggctgcatttcag</i>	2
TGFB2_Ex3F2	<i>caccagtctgtcagccttca</i>	3
TGFB2_Ex3R2	<i>aaggttgcagtgagctgtga</i>	3
TGFB2_Ex4F	<i>tgtaaacgacggccagttgcatggctatactacagtagagc</i>	4/5
TGFB2_Ex5R	<i>caggaaacagctatgaccactgtccaaatgaatgaaactcc</i>	4/5
TGFB2_Ex6F	<i>tgtaaacgacggccagtggtgtgcatatctatttccatgg</i>	6
TGFB2_Ex6R	<i>caggaaacagctatgacctctggccttagcagtgagttccac</i>	6
TGFB2_Ex7F	<i>tgtaaacgacggccagtgtcagggtatagaactcataagg</i>	7
TGFB2_Ex7F4	AATTGCTGCCTACGTCCAC	7
TGFB2_Ex7R	<i>caggaaacagctatgaccatgtgtgatggtaagacagcacg</i>	7
TGFB2_Ex8F	<i>tgtaaacgacggccagttattgcctactcagtgctgtgactg</i>	8
TGFB2_Ex8R	<i>caggaaacagctatgaccTAACACTGATGAACCAAGGCTCTC</i>	8

Die Sequenzierung von Exon 3 des *TGFB2*-Gens wurde ohne den M13-Primer durchgeführt, daher fehlt dort die entsprechende Sequenz. Für Exon 7 existiert für die exaktere Analyse der Mutationsregion ein weiterer Vorwärts-Primer.

Tabelle 2.8: Verwendete qPCR-Primer

Name	5'→3' Sequenz	Exon
qTGFB2_Ex2F	ccaggtagcagggaccttatttc	2
qTGFB2_Ex2R	TGTAACAACCTGGGCAGACAGc	2
qTGFB2_Ex3F	ttttttacagATGCCATCCCGCC	3
qTGFB2_Ex3R	AAAGACTCTGAACTCTGCTTTCACC	3
qTGFB2_Ex7F	GGAAATGGATACACGAACCCAAAG	7
qTGFB2_Ex7R	ccaagaacagaggcaacaggtaag	7
qTGFB2_Ex8F	cgttcattttccgttttcctatg	8
qTGFB2_Ex8R	TCTAAATCTTGGGACACGCAGC	8
qFBN1_35F	agaaagcccctaaccgaggaag	35
qFBN1_35R	AGCCCATGTCGCATTCACAG	35
qFBN1_63F	CCAGAACATCATTGGGGGCTAC	63
qFBN1_63R	ttcataggacctgatagccatgc	63
qCFTR_4F	agtcaccaaagcagtacagc	4
qCFTR_4R	gctattctcatctgcattcc	4

2.1.6 Gerätschaften

3500 Genetic Analyzer	Applied Biosystems (Darmstadt)
96 Well Multiply [®] -PCR-Platte	Sarstedt (Nümbrecht)
Autoklav	Tecnomara (Fernwald)
CELLSTAR [®] Kunststoff-Tubes (Falcon)	Greiner Bio-One (Frickenhausen)
Digitalkamera <i>FOculus IEEE1394</i>	PHASE (Lübeck)
Drucker <i>Digital Graphic Printer</i>	SONY (Japan)
Gelelektrophoresekammer	BioRad (München)
Heizblock (Typ: 51326101)	Liebisch (Bielefeld)
Heizblock (Typ: 50126101)	Liebisch (Bielefeld)
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf AG (Hamburg)
Magnetrührer MR 3000	Heidolph Instruments (Schwabach)
Magnetrührer <i>RCT basic</i>	IKA [®] -Werke (Staufen)
NanoDrop Spectrophotometer ND1000	Peqlab Biotechnologie (Erlangen)
PCR-Cycler <i>MJ Research PTC 200</i>	MJ Research, Inc. (Watertown, USA)
PCR-FlexCycler	Analytik Jena (Jena)

PCR-Tubes (0,5 ml)	Biozym Diagnostik GmbH (Oldenburg)
PCR-Tubes (0,5 ml)	Sarstedt (Nümbrecht)
Pipetten <i>Finnpipetten</i>	Thermo Labsystems (Mannheim)
Rotor Gene <i>RG3000</i>	Corbett Research/Qiagen (Hilden)
Spannungsgeber <i>Power Pac 300</i>	BioRad (München)
Spannungsgeber <i>Electrophoresis power supply ST305</i>	Life Technologies (Darmstadt)
Strip Tubes für Rotor-Gene	LTF Labortechnik (Wasserburg)
Tischzentrifuge <i>Biofuge Pico</i>	Heraeus (Hannover)
UV-Transilluminator <i>IL-200M</i>	Bachofer (Reutlingen)
Vortex-Gerät <i>Vortex Genie 2</i>	Scientific Industries, INC. (Bohemia, NY, USA)
Waage <i>Sartorius ISO 9001</i>	Sartorius (Göttingen)

2.1.7 Computerprogramme

Folgende Computerprogramme wurden für diese Arbeit verwendet:

Tabelle 2.10: Verwendete Computerprogramme

Computerprogramm	Anwendung
FireCamControl (PHASE)	Dokumentation von Agarosegelen
Chromas Lite 2.01 (Technelysium)	Auswertung von Elektropherogrammen
SeqPilot 3.5.2 (JSI medical systems)	Auswertung von Elektropherogrammen und Auffinden von Mutationen
EditSeq (Dnastar)	Editieren von DNA-Sequenzen
RotorGene 6.0 (Corbett Research)	Steuerung und Auswertung von quantitativen Real-Time PCRs
BLAT (<i>Basic Local Alignment Tool</i>) http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat?command=start	Erstellung der Exon/Intron-Struktur von Genen
Repeat Masker http://www.repeatmasker.org/cgi-bin/WEBRepeatMasker	Auffinden von repetitiven Elementen
qPCR Primer & Probe Design Eurofins MWG Operon https://ecom.mwgdna.com/register/index.tcl?return_url=%2fservices%2fwebgist%2fdual_probe_design	Design der qPCR Primer

Tabelle 2.10: Verwendete Computerprogramme – Fortsetzung

Computerprogramm	Anwendung
MutationTaster http://www.mutationtaster.org/	Pathogenitätsvorhersage
PolyPhen-2 http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/	
Panther http://www.pantherdb.org/	
SIFT http://sift.jcvi.org/	
SNAP http://rostlab.org/services/snap/help	
BDGP http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html	Spleißstellenvorhersage
NetGene 2.0 http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/	
HSF 2.4.1 http://www.umd.be/HSF/	

Eine Pathogenitätsvorhersage für Missense-Mutationen wurde mit den Programmen MutationTaster, PolyPhen-2, Panther, SIFT und SNAP durchgeführt. Hohe Werte beim MutationTaster, PolyPhen-2 und Panther (jeweils ein Maximalwert von 1) ergeben eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine krankheitsverursachende Mutation. Ein Score < 0.05 bei SIFT indiziert ebenfalls eine wahrscheinlich krankheitsverursachende Veränderung.

Die drei Programme BDGP (*The Berkeley Drosophila Genome Project*), NetGene 2.0 und der Human Splicing Finder (HSF) 2.4.1 dienen zur Spleißstellenanalyse. Sie geben für sehr wahrscheinliche Spleißstellen hohe Werte (mit einem Maximalwert von 1 für BDGP und NetGene 2.0 und von 100 für den HSF 2.4.1) und entsprechend niedrige Werte (minimal von 0) für unsichere Spleißstellen aus. Da beim HSF 2.4.1 nur wenige aktive Spleißstellen Werte zwischen bzw. unter 70 und 65 besitzen, wurde 65 als Cut-off-Wert gesetzt (Desmet et al. 2009). Werte über 80 werden als starke Spleißstellen gewertet. Von einer neuen Spleißstelle wird also ausgegangen, wenn bei der Wildtyp-Variante ein Wert unter 65, bei der neuen Sequenzvariante dagegen ein Wert von über 65 gegeben ist. Die Größe der Abweichung wird in dem Fall mit beurteilt. Eine Spleißstelle gilt als verloren im umgekehrten Fall, wenn also in der Wildtyp-Variante ein Wert über 65, bei der neuen Variante nur noch unter 65 gegeben ist. Auch hier gilt es, die Größe der Abweichung mitzubeurteilen. Bei den Programmen BDGP und NetGene 2.0 liegen die Cut-off-Werte dementsprechend bei 0.4 bzw. 0.65, um nicht mehr als 5% falsch-positive Ergebnisse zu erhalten.

2.1.8 Datenbanken

Folgende Datenbanken fanden in dieser Arbeit Verwendung:

Tabelle 2.11: Verwendete Datenbanken

Datenbank	Anwendung
NCBI (<i>National Center for Biotechnology Information</i>) http://www.ncbi.nlm.nih.gov/	Darstellung von Genomsequenzen Physikalische Darstellung der Organisation des humanen Genoms Aminosäuresequenzvergleiche Literaturrecherche
Ensembl (<i>The European Bioinformatics Institute and Genome Research</i>) http://www.ensembl.org/index.html 1000 Genomes http://www.1000genomes.org/ EVS (<i>Exome Variant Server</i>) http://evs.gs.washington.edu/EVS/	Darstellung von Genomsequenzen Auffinden von bekannten Sequenz- varianten
UCSC Genome Browser (<i>University of California, Santa Cruz</i>) http://genome.ucsc.edu/	Darstellung von physikalischen Karten von humanen Genomsequenzen
HPRD (<i>Human Protein Reference Database</i>) http://www.hprd.org/ SMART (<i>Simple Modular Architecture Research Tool</i>) http://smart.embl-heidelberg.de/	Bestimmung von Proteindomänen

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von genomischer DNA aus Leukozyten

Die Isolierung von DNA aus Leukozyten erfolgte mit dem *QIAamp DNA Blood Mini Kit* (Qiagen, Hilden) nach dem Protokoll des Herstellers. Dabei wurden die Zellen zunächst mittels Proteinase K bzw. Protease-Lösung in Lysepuffer lysiert und 15 Minuten bei 56 °C inkubiert. Nach Zugabe von Ethanol wurden die Proben auf Zentrifugationssäulen transferiert und zentrifugiert. Diese enthalten eine Silica-Gel-Membran, an die spezifisch DNA binden kann. Nach zwei weiteren Waschschritten mit Waschpuffern wurde die DNA von Proteinen, Salzen und anderen Kontaminationen gereinigt und konnte anschließend in einem Elutionspuffer gelöst werden.

2.2.2 Qualitätskontrolle der isolierten genomischen DNA

Um die Qualität der isolierten DNA untersuchen zu können, wurden jeweils 5 µl der DNA zusammen mit 5 µl Ladepuffer auf ein 0,8%-iges Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen (siehe 2.2.5). Nach Einfärbung mit Ethidiumbromid ließ sich anhand der Stärke der DNA-Banden eine erste Einschätzung darüber treffen, wie viel DNA isoliert wurde bzw. ob die Isolierung funktioniert hatte.

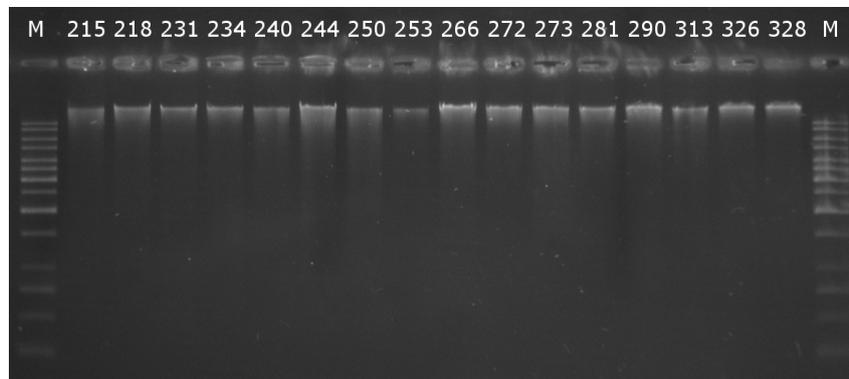


Abbildung 2.1: Qualitätskontrolle von isolierter DNA aus Leukozyten

Die Abbildung zeigt ein 0,8%-iges Agarosegel, auf welches die isolierte DNA von 16 Patienten (weiße Zahlen) aufgetragen wurde. Links und rechts davon befindet sich jeweils eine 1 kb Leiter (M).

2.2.3 Amplifikation genomischer DNA

Da für einige Proben nur sehr wenig DNA in unterschiedlichen Konzentrationen zur Verfügung stand, wurde in diesen Fällen die genomische DNA mittels des *illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kits* (GE Healthcare, Freiburg) nach Angaben des Herstellers vervielfältigt. Dafür wurde zuerst 1 µl der zu vervielfältigenden DNA mit einem Probenpuffer bei 95 °C denaturiert und anschließend über 1,5 Std. bei 30 °C mit Hilfe der Phi29

DNA-Polymerase amplifiziert. Die Phi29-DNA Polymerase besitzt neben einem Korrekturlesemechanismus auch eine *strand displacement*-Aktivität, die es erlaubt, dass die neu synthetisierten Stränge gleich als neue Matrize zur Verfügung stehen und so keine Temperaturzyklen notwendig sind. Insgesamt konnte so aus 1 µl Ausgangsmaterial 4-7 µg DNA in 20 µl Reaktionsansatz gewonnen werden.

2.2.4 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR – *polymerase chain reaction*) ist eine *in vitro* Methode, um spezifische DNA-Fragmente vervielfältigen zu können. Hierfür werden zwei flankierende Oligonukleotide (Primer) benötigt, die jeweils zu dem Abschnitt der DNA, der den zu amplifizierenden Bereich umspannt, komplementär sind. Mit Hilfe einer hitzestabilen *Taq*-Polymerase ist es nun möglich, genau diesen Bereich in mehreren aufeinander folgenden Reaktionszyklen zu vervielfältigen. Die neu synthetisierten DNA-Abschnitte stehen dabei in jedem darauffolgenden Zyklus ebenfalls als Matrize zur Verfügung, was zu einer exponentiellen Amplifikation der DNA führt.

Die PCR lässt sich in fünf Schritte unterteilen, wobei die mittlereren drei beliebig oft (meist 30-40 mal) wiederholt werden:

1. Initiale Denaturierung	95 °C	2 (3) Min.	} 30-40 Zyklen
2. Denaturierung	95 °C	20 (30) Sek.	
3. Annealing	54 - 64 °C	10 (30) Sek.	
4. Elongation	72 °C	1 Min.	
5. Finale Elongation	72 °C	5 (7) Min.	

Die verwendeten Temperaturen variieren dabei je nachdem, welche Polymerase zum Einsatz kam oder welche Primer verwendet wurden. Die Zeiten in Klammern repräsentieren die Bedingungen für das GC-Rich PCR System. Hier mussten die PCR-Zeiten aufgrund der GC-reichen Regionen in den beiden Amplikons 1 und 2.3/4 von *SALL3* (78% bzw. 76% GC) verlängert werden.

Zuerst wurde die DNA über einen längeren Zeitraum bei 95 °C denaturiert, was zu einer Trennung der doppelsträngigen DNA-Abschnitte führte. In den einzelnen Zyklen konnten diese Zeiten dann verkürzt werden. Anschließend folgte die Hybridisierung (*Annealing*) der Primer bei einer jeweils der spezifischen Schmelztemperatur angepassten Temperatur. Im Allgemeinen wurde dabei ein so genanntes *touch down* (TD)-Programm verwendet, bei dem zuerst mit einer höheren Temperatur begonnen wurde, diese aber im Verlauf (jeweils nach drei Zyklen) zwei mal um 2 °C gesenkt wurde. Die eigentliche Elongation

erfolgte bei einer für die jeweils verwendete Polymerase spezifischen Temperatur. Durch die Abfolge der verschiedenen Zyklen wurde die DNA exponentiell amplifiziert, da die neu synthetisierten Stränge im nächsten Zyklus als neue Matrizen zur Verfügung standen. Folgende Ansätze wurden dabei verwendet:

Standard PCR-Ansatz mit der *Taq*-Polymerase von Thermo Scientific,
Elongationstemperatur 72 °C

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

PCR_x-Ansatz mit der *Taq*-PCR_x DNA-Polymerase von Invitrogen,
Elongationstemperatur 68 °C

15,65 µl	HPLC-H ₂ O
2,5 µl	10x Amplifikationspuffer
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
0,75 µl	MgSO ₄ (50 mM)
2,5 µl	10x PCR _x Enhancer Solution
1 µl	Primer for (10 pmol/µl)
1 µl	Primer rev (10 pmol/µl)
0,1 µl	<i>Taq</i> -PCR _x DNA Polymerase (5 U/µl)
1,0 µl	DNA (~100 ng/µl)
<hr/>	
25 µl	Gesamtvolumen

GC-RICH PCR System von Roche,
Elongationstemperatur 72 °C

14,5/12 µl	HPLC-H ₂ O
5 µl	5x Reaktionspuffer
0,5 µl	dNTPs (10 mM)
2,5/5 µl	Resolution Solution (5 M)
0,5 µl	Primer for (10 pmol/µl)
0,5 µl	Primer rev (10 pmol/µl)
0,5 µl	Enzyme Mix (2 U/µl)
1,0 µl	DNA (~100 ng/µl)
<hr/>	
25 µl	Gesamtvolumen

Für Exon 1 von *SALL3* wurde 5 µl Resolution Solution verwendet, für das Amplikon 2.3/4 dagegen 2,5 µl.

Die nachfolgenden Tabellen geben einen Überblick, welche PCR-Bedingungen für welches Amplikon verwendet wurden.

Tabelle 2.15: PCR-Bedingungen für *CATSPER3*

Exon	Primer fwd	Primer rev	PCR-Ansatz	PCR-Programm
1	CATSPER3_Ex1F	CATSPER3_Ex1R	Standard PCR	TD64 °C
2	CATSPER3_Ex2F	CATSPER3_Ex2R	Standard PCR	TD64 °C
3	CATSPER3_Ex3F2	CATSPER3_Ex3R2	Standard PCR	TD64 °C
4	CATSPER3_Ex4F2	CATSPER3_Ex4R2	PCR _x	TD64 °C
5/6	CATSPER3_Ex5F	CATSPER3_Ex6R	Standard PCR	TD64 °C
7	CATSPER3_Ex7F	CATSPER3_Ex7R	Standard PCR	TD64 °C
8	CATSPER3_Ex8F	CATSPER3_Ex8R	Standard PCR	TD64 °C

Tabelle 2.16: PCR-Bedingungen für *SALL3*

Amplikon	Primer fwd	Primer rev	PCR-Ansatz	PCR-Programm
1	SALL3_e1_F	SALL3_e1_R	GC-Rich	TD58 °C
2.1	SALL3_e2f1_F	SALL3_e2f1_R	PCR _x	TD58 °C
2.2	SALL3_e2f2b_F	SALL3_e2f2c_R	PCR _x	TD58 °C
2.3/4	SALL3_e2f3b_F	SALL3_e2f4_R	GC-Rich	TD58 °C
2.5	SALL3_e2f5_F	SALL3_e2f5_R	PCR _x	TD58 °C
2.6	SALL3_e2f6_F	SALL3_e2f6_R	PCR _x	TD58 °C
2.7	SALL3_e2f7_F	SALL3_e2f7_R	PCR _x	TD58 °C
2.8	SALL3_e2f8_F	SALL3_e2f8_R	PCR _x	TD58 °C
2.9	SALL3_e2f9_F	SALL3_e2f9_R	PCR _x	TD58 °C
2.10	SALL3_e2f10_F	SALL3_e2f10_R	PCR _x	TD60 °C
2.11	SALL3_e2f11_F	SALL3_e2f11_R	PCR _x	TD58 °C
2.12	SALL3_e2f12_F	SALL3_e2f12_R	PCR _x	TD58 °C
3.1	SALL3_e3f1_F	SALL3_e3f1_R	PCR _x	TD58 °C
3.2	SALL3_e3f2_F	SALL3_e3f2_R	PCR _x	TD58 °C

Tabelle 2.17: PCR-Bedingungen für *TGFB2*

Exon	Primer fwd	Primer rev	PCR-Ansatz	PCR-Programm
1	TGFB2_Ex1F	TGFB2_Ex1R	PCRx	TD62 °C
2	TGFB2_Ex2F	TGFB2_Ex2R	Standard PCR	TD64 °C
3	TGFB2_Ex3F2	TGFB2_Ex3R2	Standard PCR	TD64 °C
4/5	TGFB2_Ex4F	TGFB2_Ex5R	Standard PCR	TD64 °C
6	TGFB2_Ex6F	TGFB2_Ex6R	Standard PCR	TD64 °C
7	TGFB2_Ex7F	TGFB2_Ex7R	Standard PCR	TD64 °C
8	TGFB2_Ex8F	TGFB2_Ex8R	Standard PCR	TD64 °C

2.2.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Überprüfung von PCR-Produkten hinsichtlich Qualität und Quantität, wurde eine Agarose-Gelelektrophorese durchgeführt. Da die DNA insgesamt negativ geladen ist, wandert sie im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode, ihre Wandergeschwindigkeit ist dabei umgekehrt proportional zum Logarithmus des Molekulargewichts. Dies wird bei der Gelelektrophorese dahingehend ausgenutzt, dass kleinere Fragmente schneller wandern und sich so verschieden große Fragmente voneinander trennen lassen. Verwendet wurden dafür 2%-ige Agarosegele [bzw. 0,8%-ige Gele für die Qualitätskontrolle der DNA (siehe 2.2.3)], diese hatten eine optimale Dichte, um die eher kleinen PCR-Produkte nach ihrer Größe zu trennen.

Hergestellt wurden die Gele, indem die entsprechende Menge Agarose in 1x TBE aufgekocht und anschließend auf ca. 60 °C abgekühlt wurde. Das noch flüssige Gel konnte so in Gelschlitten mit entsprechend positionierten Kämmen gegossen werden und dort weiter abkühlen, um schließlich auszupolymerisieren. War das Gel nach ca. 30 Min. ausgehärtet, wurden der Schlitten in eine Gelkammer transferiert und die Kämmen entfernt. Die entstandenen Geltaschen wurden mit 1x TBE soweit begossen, dass das gesamte Gel bedeckt war. Die PCR-Produkte wurden jeweils mit 5 µl Ladepuffer (Orange G) versetzt und dann die Taschen mit jeweils 10 µl beladen. Nach einer Laufzeit von ca. 30 Minuten bei einer Spannung von ca. 160 V wurde das Gel in einer 0,05%-ige Ethidiumbromidlösung für ca. 15 Min. gefärbt. Das Ethidiumbromid interkaliert zwischen die Basenpaare der DNA und fluoresziert unter UV-Licht (254 nm), sodass die DNA-Banden sichtbar gemacht werden. Ein ebenfalls auf das Gel aufgetragener 100 bp Marker mit Fragmenten bekannter Größe erlaubte eine Abschätzung der Größe der PCR-Fragmente. Zur Dokumentation der Gele wurden Fotos angefertigt.

2.2.6 Aufreinigung von PCR-Produkten

Um die überschüssigen Primer und dNTPs aus den PCR-Reaktionen zu entfernen, wurden die PCR-Produkte mit Hilfe der beiden Enzyme Exonuklease I und der thermosensitiven Alkaline Phosphatase aufgereinigt, wobei die beiden Enzyme für den ExoSAP-Enzymmix vorher in einem Verhältnis von 1:2 gemischt wurden. Die Exonuklease I ist durch ihre Exonuklease-Aktivität in der Lage einzelsträngige DNA, also Primer, abzubauen, während die Alkaline Phosphatase dNTPs hydrolysiert.

Folgender Ansatz wurde dabei verwendet:

4 µl	HPLC-H ₂ O
1 µl	ExoSAP-Enzymmix
2 µl	PCR-Produkt
7 µl	Gesamtvolumen

Der Ansatz wurde bei 37 °C für 15 Min. inkubiert und anschließend bei 80 °C über 15 Min. inaktiviert.

2.2.7 Zyklische DNA-Sequenzierung

Die zyklische DNA-Sequenzierung wurde nach der Kettenabbruchmethode von Sanger (Sanger et al. 1977) durchgeführt. Als Bausteine werden neben 2'-Desoxyribo-nukleotiden (dNTPs) auch 2',3'-Dideoxyribonukleotide (ddNTPs) verwendet. Diese sind je nach Base mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert, der so eine genaue Zuordnung erlaubt. Die Sequenzierung selbst besteht aus den drei Schritten Denaturierung, Annealing und Elongation. Wird zufällig an Stelle eines dNTPs ein ddNTP eingebaut, kommt es durch das Fehlen der 3'-Hydroxygruppe zum Kettenabbruch, da keine neue Phosphodiesterbrücke zum nächsten Nukleotid geknüpft werden kann. Dadurch entstehen Fragmente unterschiedlicher Längen, die ein fluoreszierendes Nukleotid an ihrem Ende tragen. Daraus kann computergestützt eine Sequenz ermittelt und in ein Chromatogramm überführt werden.

Der auf der nächsten Seite folgende Ansatz wurde für die Sequenz-Reaktion verwendet:

3,5 µl	aufgereinigtes PCR-Produkt
9,5 µl	HPLC-H ₂ O
2 µl	BigDye Mix
4 µl	BigDye Sequenzpuffer (5x)
1 µl	Primer fwd oder rev (10 pmol/µl)
20 µl	Gesamtvolumen

Die zyklische Sequenzreaktion lief dabei unter folgenden Bedingungen ab:

96 °C	5 Min.	}	30 Zyklen
96 °C	30 Sek.		
55 °C	15 Sek.		
60 °C	4 Min.		

Dabei wurden für die verschiedenen Gene folgende Primer verwendet:

Tabelle 2.18: Verwendete Sequenzierprimer für *CATSPER3*

Exon	Primer	M13-Primer	Richtung
1	CATSPER3_Ex1R	M13R	rev
2	CATSPER3_Ex2R	M13R	rev
3	CATSPER3_Ex3F2	M13F	fwd
4	CATSPER3_Ex4R2	M13R	rev
5	CATSPER3_Ex5R	-	rev
6	CATSPER3_Ex6F	-	fwd
7	CATSPER3_Ex7R	M13R	rev
8	CATSPER3_Ex8F	M13F	fwd

Tabelle 2.19: Verwendete Sequenzierprimer für *SALL3*

Amplikon	Primer	M13-Primer	Richtung
1	SALL3_e1_R	-	rev
2.1	SALL3_e2f1_F	-	fwd
2.2	SALL3_e2f2b_F	-	fwd
2.3	SALL3_e2f3b_F	-	fwd
2.4	SALL3_e2f4_R	-	rev
2.5	SALL3_e2f5_F	-	fwd
2.6	SALL3_e2f6_F	-	fwd
2.7	SALL3_e2f7_F	-	fwd
2.8	SALL3_e2f8_F	-	fwd
2.9	SALL3_e2f9_F	-	fwd
2.10	SALL3_e2f10_F	-	fwd
2.11	SALL3_e2f11_F	-	fwd
2.12	SALL3_e2f12_F	-	fwd

Tabelle 2.19: Verwendete Sequenzierprimer für *SALL3* – Fortsetzung

Amplikon	Primer	M13-Primer	Richtung
3.1	SALL3_e3f1_F	-	fwd
3.2	SALL3_e3f2_F	-	fwd

Tabelle 2.20: Verwendete Sequenzierprimer für *TGFB2*

Exon	Primer	M13-Primer	Richtung
1	TGFB2_Ex1R	M13R	rev
2	TGFB2_Ex2F	M13F	fwd
3	TGFB2_Ex3F3	-	fwd
4	TGFB2_Ex4F	M13F	fwd
5	TGFB2_Ex5R	M13R	rev
6	TGFB2_Ex6R	M13R	rev
7	TGFB2_Ex7R	M13R	rev
7	ggf. TGFB2_Ex7F4	-	fwd
8	TGFB2_Ex8F	M13F	fwd

2.2.8 Aufreinigung von Sequenzierungsansätzen

Um einen Sequenzieransatz von überschüssigen dNTPs und ddNTPs zu reinigen, wurde eine Natriumacetat (NaAc)-Fällung durchgeführt:

20 µl	Sequenzieransatz
30 µl	HPLC-H ₂ O
5 µl	NaAc (3 M; pH 5,2)
125 µl	Ethanol (abs.)
<hr/>	
180 µl	Gesamtvolumen

Dieser Ansatz wurde kurz gevortext und bei 14.000 rpm über 20 Min. zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgenommen und erneut 300 µl Ethanol (70%) hinzugefügt. Dies wurde ebenfalls noch einmal kurz gevortext und über 5 Min. bei 14.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde nun erneut verworfen und das Pellet anschließend bei 37 °C ca. 15 Min. getrocknet. Bis zur weiteren Verwendung wurde es bei -20 °C gelagert.

2.2.9 Elektrophoretische Auftrennung der Sequenzprodukte

Vor der elektrophoretischen Auftrennung der Sequenzprodukte wurden die aufgereinigten Ansätze in 20 µl Hi-Di™ Formamide gelöst, gevortext und für ca. 2 Min. auf 95 °C erhitzt, um die DNA vollständig zu denaturieren. Anschließend wurde der komplette Ansatz in eine Mikrotiterplatte pipettiert. Die elektrophoretische Auftrennung des Sequenzprodukte erfolgte mit dem Kapillarsequenziergerät 3500 Genetic Analyzer von Applied Biosystems. Die Fragmente werden mittels eines Lasers zur Fluoreszenz angeregt und können so vom Detektor erkannt werden. Das Elektropherogramm gibt direkt die Sequenz der Basen des sequenzierten DNA-Stranges wieder und wird mit Hilfe des Programms SeqPilot 3.5.2 (JSI medical systems) ausgewertet.

2.2.10 Quantifizierung von DNA mittels photometrischer Analyse

Der Berechnung der DNA-Konzentration liegt die Tatsache zu Grunde, dass die Absorptionsmaxima der aromatischen Ringe der Purin- und Pyrimidinbasen bei 260 nm liegt. Eine Lösung, die 50 µl/ml doppelsträngige DNA enthält, hat eine optische Dichte (OD) von 1. Mit Hilfe des gemessenen OD-Wertes bei 260 nm jeder DNA lässt sich bei einem proportionalen Verhältnis von OD und DNA-Konzentration die Konzentration der DNA in jeder Probe bestimmen. Die Messung der Absorptionswerte und die Berechnung der Konzentration der DNA erfolgte mit einem NanoDrop ND1000 Spectrophotometer.

2.2.11 Quantitative Real-Time PCR

Die quantitative Real-Time PCR (qPCR) ist ein hochsensitives Verfahren, mit dem neben Untersuchungen zur Expression von Genen auch Kopienzahlanalysen (von sog. *copy number variations* - CNVs) durchgeführt werden. Die Methode basiert auf der Quantifizierung der im Verlaufe der Reaktion entstehenden DNA-Moleküle. Dies geschieht mit Hilfe des *SYBR Green*-Fluoreszenzfarbstoffes, der zwischen die Basenpaare der DNA interkaliert und bei Anregung von blauem Licht ($\lambda = 498$ nm) grünes Licht ($\lambda = 522$ nm) emittiert. Der Vorgang wird kontinuierlich (Real-Time) dokumentiert und mit Hilfe des Programms RotorGene 6.0 (Corbett Research) ausgewertet (siehe Abbildung 2.2).

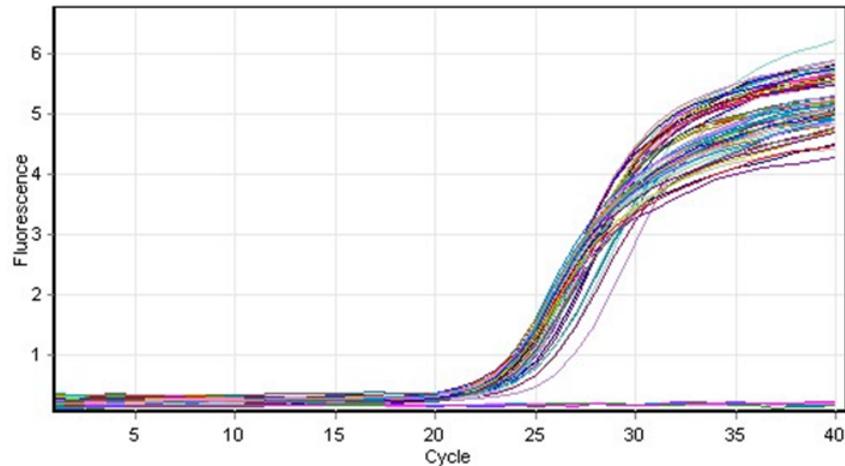


Abbildung 2.2: Beispiel einer quantitativen Verlaufsdocumentation einer qPCR

Die Fluoreszenz (Ordinate) ist gegen die Zyklen (Abszisse) aufgetragen. Jede Probe ist einer anderen Farbe zugeordnet.

In diese Kurven wurde innerhalb der exponentiellen Phase ein Schwellenwert gelegt. Der Zyklus, an dem dieser Schwellenwert zum ersten mal überschritten wurde, markiert den *cycle threshold* (Ct)-Wert. Anhand dieses Wertes ließen sich Rückschlüsse darauf ziehen, wie viele Kopien von einer bestimmten DNA-Sequenz vorhanden waren. Zur Berechnung müssen immer gleiche Mengen DNA eingesetzt werden.

Folgender Ansatz wurde für die Reaktion verwendet:

3,4 µl	HPLC-H ₂ O (autoklaviert)
10 µl	SYBR [®] Green JumpStart [™] Taq ReadyMix [™]
0,8 µl	Primer fwd (10 pmol/µl)
0,8 µl	Primer rev (10 pmol/µl)
5 µl	DNA (5 ng/µl)
20 µl	Gesamtvolumen

Die qPCR lief unter folgenden Bedingungen:

95 °C	5 Min.	
95 °C	30 Sek.	}
58 °C	30 Sek.	
72 °C	45 Sek.	
72→95 °C	in 1 °C Schritten von jeweils 5 Sek.	

Um die Kopienzahlen bestimmen zu können, wurden die Primer so gewählt (siehe 2.1.5), dass sie eine Produktgröße von 250 bp nicht überschreiten, aber dennoch einen möglichst großen Teil des Exons abdecken.

Die folgenden Primer wurden dafür verwendet:

Tabelle 2.21: Verwendete Primer für die Kopienzahlanalyse

Exon	Primer fwd	Primer rev
<i>TGFB2</i> Exon 2	qTGFB2_Ex2F	qTGFB2_Ex2R
<i>TGFB2</i> Exon 3	qTGFB2_Ex3F	qTGFB2_Ex3R
<i>TGFB2</i> Exon 7	qTGFB2_Ex7F	qTGFB2_Ex7R
<i>TGFB2</i> Exon 8	qTGFB2_Ex8F	qTGFB2_Ex8R
<i>FBN1</i> Exon 35	qFBN1_35F	qFBN1_35F
<i>FBN1</i> Exon 63	qFBN1_63F	qFBN1_63F
<i>CFTR</i> Exon 4	qCFTR_4F	qCFTR_4F

Mit Hilfe der ermittelten Ct-Werte ließ sich eine Quantifizierung nach der *comparative $\Delta\Delta Ct$ methode* (Livak u. Schmittgen, 2001) durchführen. Diese Methode basiert auf einem Vergleich der ausgewählten DNA-Sequenz mit einem Referenzgen, dessen Kopienzahl bekannt und unter den Patienten unverändert ist. In diesem Fall wurde das *CFTR*-Gen als Referenzgen ausgesucht. *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator*) kodiert für ein Chloridkanalprotein auf Chromosom 7. Mutationen in diesem Gen sind ursächlich für die Zystische Fibrose (Riordan et al. 1989).

Zur Berechnung der relativen Kopienzahl wurde zuerst zum Ausgleich quantitativer und qualitativer Unterschiede der DNA-Proben der gemittelte Ct-Wert des Referenzgens vom gemittelten Ct-Wert des Zielgens (je zwei Bestimmungen) abgezogen.

$$\Delta Ct = Ct_{\text{Zielgen}} - Ct_{\text{Referenzgen}} \quad (1)$$

Durch Subtraktion eines Kalibrator Ct-Wertes ließ sich die Abweichung relativ zu einer Kontroll-DNA-Probe berechnen. Als Kontroll-DNA wurde eine Probe gewählt, von der sicher ist, dass sie an der interessierenden Stelle keine Kopienzahlabweichung aufweist.

$$\Delta\Delta Ct = \Delta Ct - \Delta Ct_{\text{Kalibrator}} \quad (2)$$

Dies wurde in einen absoluten Wert umgerechnet.

$$2^{-\Delta\Delta Ct} \quad (3)$$

Die so berechneten Werte geben die relative Kopienzahl im Verhältnis zu dem vorher ausgewählten Kalibratorgen *CFTR* an. Liegt das Gen mit gleicher Anzahl vor, so ergeben sich Werte von 0,8 bis 1,2. Niedrigere Werte ($\sim 0,5$) deuten auf eine Deletion in diesem Gen hin, höhere Werte ($\sim 1,5$) auf eine Duplikation. Ergaben sich Werte in einem Zwischenbereich, wurde die Kopienzahlbestimmung wiederholt und das Ergebnis gemittelt.

3 Ergebnisse

3.1 Mutationsanalyse des *CATSPER3*-Gens bei 150 Patienten mit Intelligenzminderung

3.1.1 Vorarbeiten: Eingrenzung der Bruchpunktregion in 5q31.1 bei einem Patienten mit einer 1;5-Translokation und Intelligenzminderung

In Vorarbeiten von Frau Dr. med. Bettina Chilian (Chilian 2012) wurden die Bruchpunkte einer mütterlicherseits vererbten 1;5-Translokation bei einem Patienten (im Folgenden Translokationspatient 1) feinkartiert. Eine Chromosomenanalyse ergab den Karyotyp 46,XY,t(1;5)(q41-q42;q31). Der damals 4-jährige Patient zeigte klinisch eine Entwicklungsverzögerung und Autismus. Weitere Daten liegen nicht vor. Seine Mutter ist dagegen normal intelligent. Auffällig zeigten sich bei ihr jedoch eine Brachydaktylie und invertierte Brustwarzen. Da für bereits bekannte Gene für Autismus unvollständige Penetranz beschrieben wurde (Toro et al. 2010), kann dieses Rearrangement durchaus ursächlich für den Phänotyp des Patienten sein. Durch serielle FISH-Analysen erfolgte eine Feinkartierung der Bruchpunktregion des Chromosoms 5 (siehe Abbildung 3.1). Ein Fosmid (G248P86998H1) lieferte ein *split signal*, also ein bruchpunktüberspannendes Signal. Mit Hilfe der beiden angrenzenden Fosmide ließ sich die Bruchpunktregion auf 10 bis 15 kb eingrenzen.

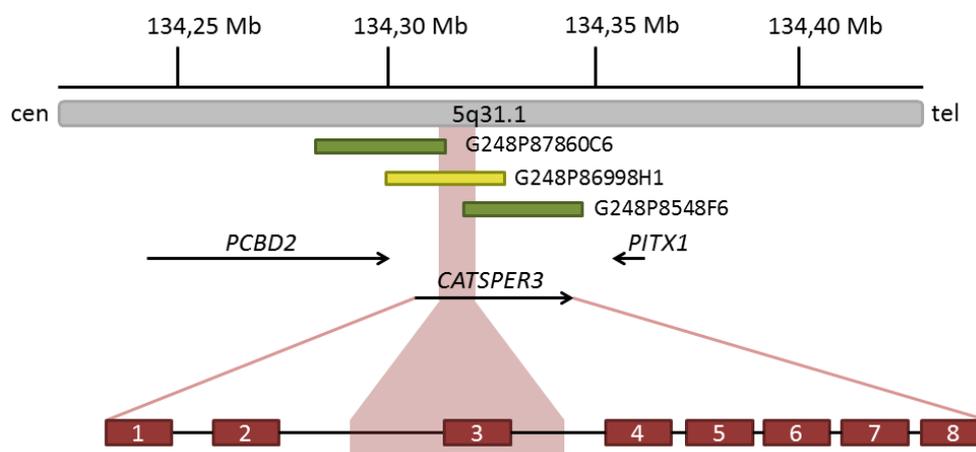


Abbildung 3.1: 5q31.1-Bruchpunktregion der 1;5-Translokation

Der graue Balken markiert einen Ausschnitt der Region 5q31.1. Eine Größeneinteilung in Mb ist über der Abbildung gegeben. Links liegt die Zentromerregion (cen), rechts das Telomer (tel). Das bruchpunktüberspannende Fosmid G248P86998H1 ist durch einen gelben Balken repräsentiert, die beiden angrenzenden Fosmide durch grüne Balken. Die hellrot hinterlegte Fläche markiert die Bruchpunktregion. Die schwarzen Pfeile symbolisieren Gene in der Region in 5'→3'-Transkriptionsrichtung, die darunterliegenden roten Kästen die acht Exons von *CATSPER3* in Vergrößerung. Die waagerechte schwarze Linie stellt intronische Regionen dar. Das Gen *CATSPER3* wird direkt unterbrochen, der Bruchpunkt liegt zwischen Intron 2 und 3. Die physikalische Karte wurde nach GRCh37/hg19 erstellt.

Durch die Translokation kommt es zu einer direkten Unterbrechung des *CATSPER3*-Gens. Der Bruchpunkt liegt wahrscheinlich innerhalb einer Region zwischen den beiden Introns 2 und 3. *CATSPER3* steht für *cation channel of sperm* und kodiert für einen spannungsgesteuerten Calciumkanal, der sowohl im Hoden als auch im Gehirn von Mäusen exprimiert wird (Kim et al. 2010). Besonders stark ist die Expression im Cortex, Hippocampus, Hypothalamus und Cerebellum. Der Kanal selbst besteht aus sechs membrandurchspannenden Domänen und einer *Coiled-Coil*-Region, mit der es möglich wäre, mit anderen Proteinen aus der *CATSPER*-Familie zu interagieren (Lobley et al. 2003). Zusätzlich ist bekannt, dass Mutationen in Genen für Calciumkanalproteine, wie beispielsweise *SCN5A*, mit Autismus assoziiert sind (Splawski et al. 2004). Dies und die direkte Disruption des Gens machen *CATSPER3* zu einem interessanten Kandidatengen für Intelligenzminderung und/oder Autismus.

3.1.2 PCR-Amplifikation und Sequenzanalyse von *CATSPER3* bei 150 Patienten mit Intelligenzminderung

Um die Mutationsanalyse von *CATSPER3* bei 150 Patienten mit Intelligenzminderung durchführen zu können, wurde zuerst die Exon/Intron-Struktur mit Hilfe des BLAT-Programmes abgeleitet und Primerpaare für jedes der acht kodierenden Exons bestimmt. Da die Exons 5 und 6 sehr nah beieinander liegen, wurden diese für eine PCR-Amplifikation zusammengefasst, allerdings später getrennt sequenziert. Bei der Auswahl der Primer wurde zusätzlich darauf geachtet, dass auch die Exon/Intron-Übergänge ausreichend (bis zu 40 bp) mitsequenziert werden, um auch dort etwaige Veränderungen, wie z.B. mutierte Spleißstellen, identifizieren zu können. Um auszuschließen, dass die Primer in repetitiven Elementen liegen oder SNPs (engl. *single nucleotide polymorphism*, Einzelnukleotid-Polymorphismen) beinhalten, wurde die Sequenz mit dem *Repeat Masker* bzw. den verzeichneten SNPs in *Ensembl* abgeglichen. Die Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen für jedes Primerpaar wurde mit DNA-Proben von Kontrollpersonen durchgeführt. Anschließend wurde die genomische DNA von 150 Patienten mit Intelligenzminderung für jedes Exon amplifiziert und die Amplikons zur Qualitäts- und Quantitätskontrolle auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 3.2).

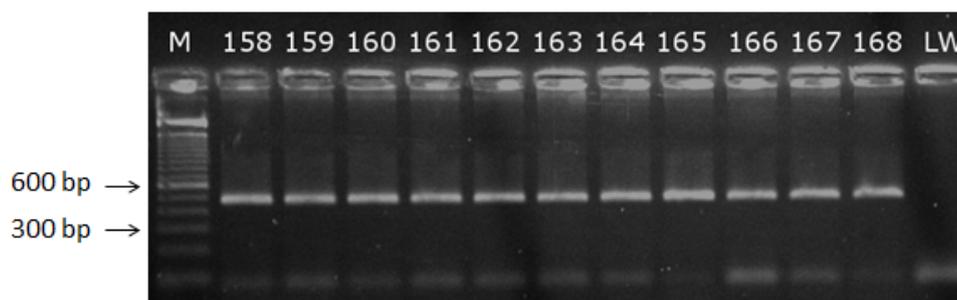


Abbildung 3.2: Exemplarisches, mit Ethidiumbromid gefärbtes 2%-iges Agarosegel mit PCR-Produkten des Exons 3 des *CATSPER3*-Gens

Die Abbildung zeigt die 443 bp großen PCR-Produkte des Exons 3 von *CATSPER3* von 11 Patienten (158 - 168). Der Leerwert (LW) ist die Kontrolle ohne DNA. Eine 100 bp Leiter (M) wurde zusätzlich zur Orientierung und Überprüfung der Produktgröße aufgetragen. Die 300 bp- und 600 bp-Banden sind mit einem Pfeil markiert.

Nach anschließender Sequenzierung aller PCR-Produkte wurden 15 verschiedene Sequenzvarianten in den 150 Patienten-DNAs gefunden (siehe Tabelle 3.1).

Tabelle 3.1: Gefundene Sequenzvarianten in *CATSPER3*

Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
c.252+17G>A		1/300	<i>rs149202644</i>
c.433G>A	p.A145T	10/300	<i>rs114447625</i>
c.507C>T	p.(=)	110/300 (25)	<i>rs10044000</i>
c.508G>A	p.V170M	2/300	<i>rs139800400</i>
c.581T>G	p.L194W	1/300	<i>rs149130443</i>
c.612T>G	p.N204K	2/300	<i>rs3896260</i>
c.645A>G	p.(=)	87/300 (15)	<i>rs177252</i>
c.676-34T>C		265/300 (117)	<i>rs299376</i>
c.816+35C>A		1/300	<i>rs112278352</i>
c.818A>G	p.D273G	3/300	<i>rs72800379</i>
c.881A>G	p.K294R	2/300	<i>rs142494932</i>
c.1047C>T	p.(=)	1/300	<i>rs140770176</i>
c.1056C>T	p.(=)	1/300	<i>rs17167765</i>
c.1095-40T>C		1/300	<i>rs7719733</i>
c.1125T>C	p.(=)	1/300	<i>rs7719874</i>

Die Tabelle fasst alle gefundenen Sequenzvarianten in *CATSPER3* im untersuchten Patientenkollektiv zusammen. Zusätzlich sind die SNP-Referenznummern (rs) aus *Ensembl* und die Häufigkeit der Allele verzeichnet. Die Zahlen in Klammern repräsentieren die Anzahl an Patienten mit einer homozygoten Sequenzvariante.

Von diesen 15 Sequenzvarianten sind vier in intronischen Regionen und elf in Exons lokalisiert. Darunter waren fünf stille Mutationen und sechs Missense-Mutationen. Der SNP c.581T>G (p.L194W) (siehe Abbildung 3.3) wurde nur einmal bei Patient 176 gefunden und ist in *Ensembl* mit einer Häufigkeit von 3/17553 (< 0,01%) gelistet.

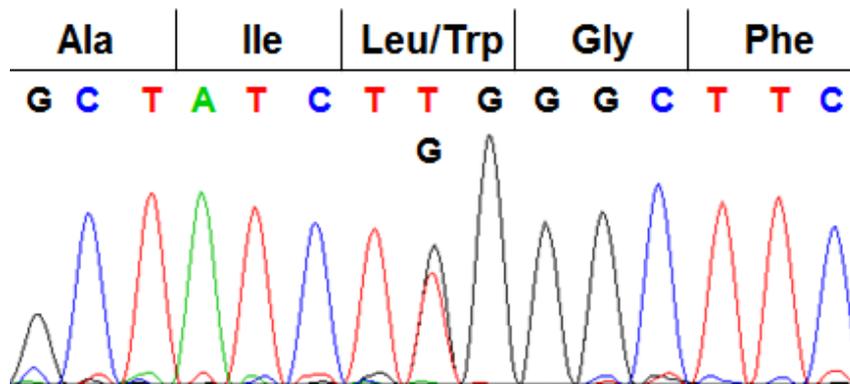


Abbildung 3.3: Ausschnitt aus einem Sequenzelektropherogramm des Exons 4 von Patient 176 mit der Sequenzvariante c.581T>G (p.L194W)

Die Buchstabenfolge am oberen Rand des Bildes gibt die Basenabfolge wieder und wird durch Peaks in unterschiedlichen Farben repräsentiert. Der untere Buchstabe G markiert den Austausch. Darüber sind die Aminosäuren im Drei-Buchstaben-Code gegeben. Die vertikalen Striche markieren die Triplettgrenzen. An der Stelle des Basenaustausches steht die Wildtyp-Aminosäure links, die mutierte Aminosäure rechts.

Im Vergleich mit sechs anderen Spezies zeigte sich eine hohe Konservierung der Aminosäure Leucin (siehe Abbildung 3.4) innerhalb der membrandurchspannenden Region 5 von CATSPER3 (Lobley et al. 2003).

		141	TM4	160		177	TM5	199																																												
<i>M. musculus</i>	136	Q	S	L	R	I	L	K	L	I	S	S	R	G	I	R	T	L	I	I	A	V	G	E	T	V	V	T	V	A	S	V	L	T	L	L	F	L	L	M	F	V	F	A	I	L	G	F	C	L	185	
<i>R. norvegicus</i>	129	Q	S	L	R	V	L	K	L	I	S	S	R	G	I	R	T	L	I	I	A	V	G	E	T	V	V	T	V	A	S	V	L	T	L	L	F	L	L	M	F	V	F	A	I	L	G	F	C	L	178	
<i>M. mulatta</i>	76	Q	S	L	R	I	L	K	L	I	G	Y	S	R	G	I	R	T	L	I	I	A	V	G	Q	T	V	V	T	V	A	S	V	L	L	L	L	F	L	L	M	Y	I	F	A	I	L	G	F	C	L	125
<i>H. sapiens</i>	149	Q	S	L	R	I	L	K	L	I	G	Y	S	Q	G	I	R	T	L	I	I	A	V	G	Q	T	V	V	T	V	A	S	V	L	L	L	L	F	L	L	M	Y	I	F	A	I	L	G	F	C	L	198
<i>P. troglodytes</i>	149	Q	S	L	R	I	L	K	L	I	G	Y	S	Q	G	I	R	T	L	I	I	A	V	G	Q	T	V	V	T	V	A	S	V	L	L	L	L	F	L	L	M	Y	I	F	A	I	L	G	F	C	L	198
<i>C. lupus</i>	151	Q	S	L	R	I	L	K	L	I	T	Y	S	R	G	I	R	T	L	I	I	A	V	G	Q	T	A	I	V	A	S	V	L	L	L	L	F	L	L	M	Y	I	F	A	I	L	G	F	C	L	200	
<i>B. taurus</i>	150	Q	S	L	R	I	L	K	L	I	T	Y	S	R	G	I	R	T	L	I	I	A	M	G	Q	T	A	I	V	A	S	V	L	L	L	F	F	L	M	Y	I	F	A	I	L	G	F	C	L	199		

Abbildung 3.4: Ausschnitt aus dem Aminosäuresequenzvergleich von CATSPER3 verschiedener Spezies

Die Aminosäure Leucin an Position 194 ist an übereinstimmenden Positionen blau hinterlegt. Es zeigt sich eine Konservierung durch alle Spezies. Über der Abbildung sind die Transmembrandomänen TM4 und TM5 (nach Lobley et al. 2003) mit der jeweiligen Start- und Endposition im humanen Protein in rot gegeben. Die Zahlen links und rechts geben die Position der jeweiligen randständigen Aminosäure an.

Eine Analyse mit Vorhersageprogrammen hinsichtlich einer möglichen pathogenen Relevanz der Missense-Mutation c.581T>G (p.L194W) ergab eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine krankheitsverursachende Mutation (siehe Tabelle 3.2).

Tabelle 3.2: *In silico*-Vorhersagen zur Pathogenität von p.L194W in CATSPER3

MutationTaster	PolyPhen-2	Panther	SIFT	SNAP
<i>Disease causing Probability</i>	<i>Probably damaging</i> Score 1.000	<i>Probably damaging</i> $P_{deleterious}$	<i>Damaging</i> Score 0.00	<i>Non-neutral</i> Accuracy 78%
0.9181		0.9966		

Der Aminosäureaustausch wurde mit MutationTaster, PolyPhen-2, Panther, SIFT und SNAP analysiert. Hohe Werte beim MutationTaster, PolyPhen-2 und Panther (jeweils ein Maximalwert von 1) ergeben eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine krankheitsverursachende Mutation. Ein Score < 0.05 bei SIFT indiziert ebenfalls eine wahrscheinlich krankheitsverursachende Veränderung. Der Accuracy-Wert bei SNAP gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die getroffene Vorhersage zutrifft.

Spleißstellenveränderungen ergaben sich nach einer *in silico*-Analyse mit Hilfe der drei Programme BDGP, NetGene 2.0 und HSF 2.4.1 (siehe 2.1.7) nicht.

3.2 Mutationsanalyse des *SALL3*-Gens bei 150 Patienten mit Intelligenzminderung

3.2.1 Vorarbeiten: Eingrenzung der Bruchpunktregion in 18q23 bei einem Patienten mit einer 8;18-Translokation, Intelligenzminderung und Kleinwuchs

Ebenfalls durch Frau Dr. med. Bettina Chilian wurden die Bruchpunkte einer *de novo* vorliegenden 8;18-Translokation bei einem weiteren Patienten (im Folgenden Translokationspatient 2) feinkartiert (Chilian 2012). Eine im Institut für Humangenetik in Hamburg erfolgte Chromosomenanalyse ergab den Karyotyp $46,XY,t(8;18)(q11.23-q12.1;q22.3-q23)$, und eine im Zentrum für Humangenetik in Mannheim durchgeführte Array-CGH-Untersuchung ergab eine von der Mutter vererbte, ca. 100 kb große Deletion in 5q21.1 und eine etwa 300 kb große Duplikation in 14q31.1, die nicht weiter abgeklärt wurde. Der damals 2-jährige Patient fiel im Alter von neun Monaten erstmalig durch eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung auf. Eine körperliche Untersuchung zeigte eine große Fontanelle, eine breite Stirn und bläuliche Skleren. Untersuchungen der Hände und Füße ergaben jeweils breite Endphalangen, die jedoch auch bei der Mutter vorlagen, und tiefe Handfurchen. Zusätzlich hatte der Junge eine hypotone Muskulatur, während sich die Extremitäten überwiegend in Beugehaltung befanden. Seitens der Mutter wurde eine leichte Reizbarkeit beschrieben, ansonsten zeigte der Patient guten Blickkontakt. Mit etwa 17 Monaten zeigte sich sowohl eine motorische als auch eine sprachliche Entwicklungsverzögerung. Der Patient konnte nicht frei laufen und eine Wortbildung war noch

nicht vorhanden. Bei einer Größe von 74 cm wurde eine Wachstumsretardierung (-2,7 SD) diagnostiziert. Hinzu kamen rezidivierende generalisierte Krampfanfälle, die mit Phenobarbital behandelt wurden.

Serielle FISH-Analysen grenzten die Bruchpunktregion auf dem Chromosom 18 ein (siehe Abbildung 3.5). Zwei Fosmide (G248P80448H4 und G248P87560B5) lieferten dabei ein *split signal*, somit ließ sich auch hier die Bruchpunktregion auf 10 bis 15 kb eingrenzen.

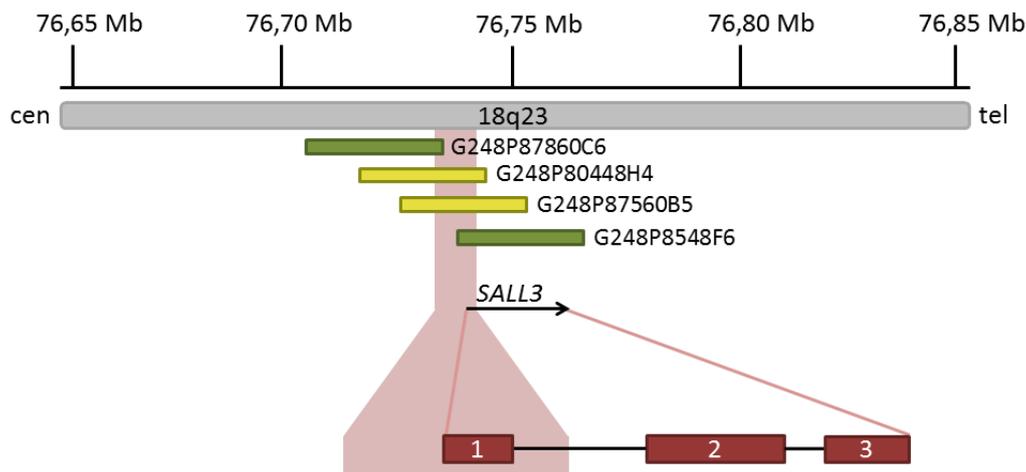


Abbildung 3.5: 18q23-Bruchpunktregion der 8;18-Translokation

Der graue Balken markiert einen Ausschnitt der Region 18q23. Eine Größeneinteilung in Mb ist über der Abbildung gegeben. Links liegt die Zentromerregion (cen), rechts das Telomer (tel). Die beiden bruchpunktüberspannenden Fosmide G248P80448H4 und G248P87560B5 sind durch gelbe Balken repräsentiert, die beiden angrenzenden Fosmide durch grüne Balken. Die hellrot hinterlegte Fläche markiert die Bruchpunktregion. Der schwarze Pfeil symbolisiert das Gen *SALL3* in 5'→3'-Transkriptionsrichtung, die darunterliegenden roten Kästen die drei Exons des Gens in Vergrößerung. Die waagerechte schwarze Linie stellt intronische Regionen dar. Der Bruchpunkt liegt entweder direkt vor dem *SALL3*-Gen oder in Exon 1 oder Intron 1. Die physikalische Karte wurde nach GRCh37/hg19 erstellt.

Der Bruchpunkt in 18q23 liegt somit entweder direkt vor dem *SALL3*-Gen oder innerhalb von Exon oder Intron 1 des Gens.

SALL3 gehört zur Familie der Spalt-Proteine, die aus vier Mitgliedern (*SALL1-4*) besteht. Es wird angenommen, dass *SALL3* mit Hilfe seiner vier Zinkfinger-Domänen als Transkriptionsfaktor wirkt und somit wahrscheinlich an der Regulation des Zellzyklus bzw. der Zelladhäsion beteiligt ist (Parrish et al. 2004). Alle vier Mitglieder dieser Familie spielen wahrscheinlich eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems, der Extremitäten und anderer Organe, wie z.B. der Niere und des Herzens (Sweetman u. Münsterberg 2006). *Sall3* wird im Tiermodell besonders stark im zentralen Nervensystem exprimiert, u.a. in primären Motorneuronen, im Telencephalon, Diencephalon, Rhombencephalon und entlang des gesamten, sich entwickelnden Rückenmarks und der Hinterhörner (Camp et al. 2003).

Stromaufwärts von *SALL3* befindet sich eine ca. 2 Mb große, genleere Region mit hochkonservierten, nicht-kodierenden DNA-Elementen (*highly conserved non-coding elements*, HCNEs). Diese HCNEs besitzen teilweise regulatorisches Potential und könnten somit die Expression von *SALL3* regulieren (Rizzolio et al. 2008). In der Literatur wurde bereits eine Patientin mit einer X;18-Translokation beschrieben, deren Bruchpunkt auf Chromosom 18 ca. 80 kb stromaufwärts von *SALL3* liegt und die mit dem Translokationspatienten 2 phänotypische Überschneidungen aufweist. Die Patientin zeigte ebenfalls eine breite Stirn und einen Kleinwuchs (Larizza et al. 1993, Rizzolio et al. 2008). Als Pathomechanismus wurde hier die Abtrennung von *SALL3* von den HCNEs angenommen, sodass sich hierdurch eine veränderte Expression von *SALL3* ergeben haben könnte (Rizzolio et al. 2008). Dieser Mechanismus wäre auch bei dem Translokationspatienten 2 denkbar. Insgesamt gesehen scheint *SALL3* also ein sehr attraktives Kandidatengen für Intelligenzminderung und/oder Kleinwuchs zu sein.

3.2.2 PCR-Amplifikation und Sequenzanalyse von *SALL3* bei 150 Patienten mit Intelligenzminderung

Die Primersequenzen für die PCR und Sequenzanalyse wurden von Herrn PD Dr. med. Christian Thiel des Humangenetischen Instituts des Universitätsklinikums Erlangen zur Verfügung gestellt, der *SALL3* bereits in einer großen Kohorte von Patienten mit Kleinwuchs sequenziert hatte, aber keine krankheitsrelevante Mutation gefunden hat. Exon 2 (ca. 3800 bp) und 3 (ca. 800 bp) des *SALL3*-Gens sind so groß, dass für Exon 2 zwölf (2.1 bis 2.12) und für Exon 3 zwei (3.1 und 3.2) sich überlappende Amplikons generiert werden mussten. Die PCRs wurden mit DNAs von Kontrollpersonen etabliert und die jeweils optimalen DNA-Polymerasen ausgewählt. Anschließend wurde, wie auch unter 3.1.2 beschrieben, die genomische DNA von 150 Patienten mit Intelligenzminderung für jedes Amplikon mittels PCR vervielfältigt und zur Qualitäts- und Quantitätskontrolle auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 3.6).

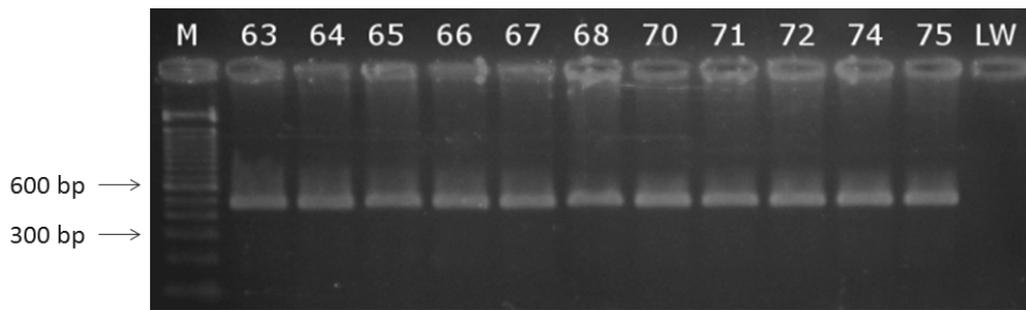


Abbildung 3.6: Exemplarisches, mit Ethidiumbromid gefärbtes 2%-iges Agarosegel mit PCR-Produkten des Amplikons 3.2 des *SALL3*-Gens

Die Abbildung zeigt die 477 bp großen PCR-Produkte des Amplikons 3.2 von *SALL3* von 11 Patienten (63 - 68 und 70 - 75). Der Leerwert (LW) ist die Kontrolle ohne DNA. Eine 100 bp Leiter (M) ist zusätzlich zur Orientierung und Überprüfung der Produktgröße aufgetragen. Die 300 bp- und 600 bp-Banden sind mit einem Pfeil markiert.

Nach anschließender Sequenzierung aller PCR-Produkte wurden 20 verschiedene Sequenzvarianten in den 150 Patienten-DNAs gefunden (siehe Tabelle 3.3).

Tabelle 3.3: Gefundene Sequenzvarianten in *SALL3*

Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
c.272C>A	p.P91H	37/300 (1)	<i>rs35091814</i>
c.553_554delGCinsTT ^a	p.A185L	15/300	<i>rs18655572</i> u. <i>rs191414199</i>
c.883C>T	p.P295S	7/300	
c.987G>A	p.(=)	13/300	<i>rs137944092</i>
c.1072C>T	p.(=)	30/300	<i>rs2472643</i>
c.1500C>T	p.(=)	9/300	<i>rs7233194</i>
c.1507C>T	p.(=)	1/300	<i>rs200189990</i>
c.1597A>G	p.T533A	239/300 (95)	<i>rs7240860</i>
c.1777C>G	p.L593V	250/300 (102)	<i>rs2447437</i>
c.2235G>A	p.(=)	1/300	<i>rs117543046</i>
c.2376C>T	p.(=)	28/300 (1)	<i>rs2927258</i>
c.2475C>T	p.(=)	250/300 (102)	<i>rs2472644</i>
c.2499G>A	p.(=)	1/300	<i>rs201571077</i>
c.2558T>C	p.V853A	14/300	<i>rs35578880</i>
c.2593G>A	p.V865M	3/300	<i>rs139777889</i>
c.2766G>C	p.(=)	14/300	<i>rs61747126</i>
c.2880G>T	p.(=)	29/300	<i>rs2615613</i>
c.2888G>A	p.S963N	1/300	

Tabelle 3.3: Gefundene Sequenzvarianten in *SALL3* – Fortsetzung

Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
c.3507C>T	p.(=)	1/300	
c.3754C>A	p.P1252T	1/300	<i>rs138463518</i>

Die Tabelle stellt alle gefundenen Sequenzvarianten in *SALL3* im untersuchten Patientenkollektiv dar. Zusätzlich sind die SNP-Referenznummern (rs) aus *Ensembl* und die Häufigkeit der Allele verzeichnet. Die Zahlen in Klammern repräsentieren dabei die Anzahl an Patienten mit einer homozygoten Sequenzvariante. ^a Die beiden in *Ensembl* getrennt gelisteten SNPs c.553G>T (*rs18655572*) und c.554C>T (*rs191414199*) kamen bei jeweils 15 Patienten nur gemeinsam in heterozygotem Zustand vor und führen zusammen zu dem Aminosäureaustausch p.A185L. Es ist daher von einer del/ins-Variante auszugehen.

17 der 20 Varianten sind in *Ensembl* als SNP gelistet, drei hingegen nicht. Zwei dieser drei Varianten [c.883C>T (p.P295S) und c.2888G>A (p.S963N)] sind Missense-Mutationen, die Variante c.3507C>T dagegen eine stille Mutation. Zusätzlich sind die beiden bereits beschriebenen Varianten c.1507C>T und c.2499G>A bei *Ensembl* mit nur sehr niedrigen Allelfrequenzen von weit <1% gelistet. Es handelt sich bei beiden ebenfalls um stille Mutationen.

Die Variante c.883C>T (p.P295S) (siehe Abbildung 3.7) kommt bei sieben (Patienten Nr. 1, 2, 52, 56, 71, 81 und 186) von 150 Patienten vor.

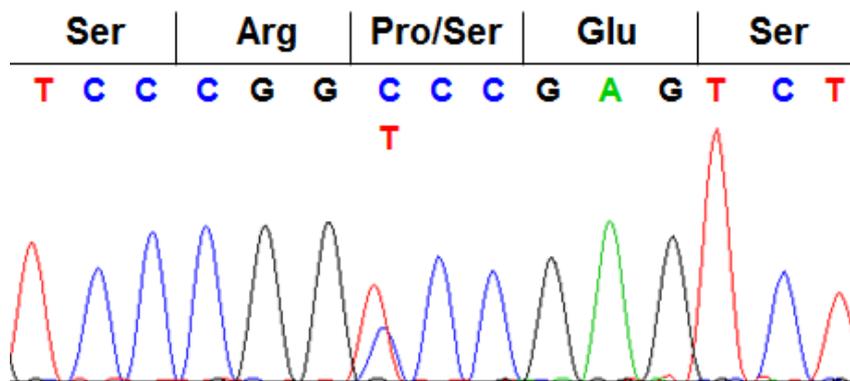


Abbildung 3.7: Ausschnitt aus einem Sequenzelektropherogramm des Exons 2 von Patient 1 mit der heterozygoten Sequenzvariante c.883C>T (p.P295S)

Die Buchstabenfolge am oberen Rand des Bildes gibt die Basenabfolge wieder und wird durch Peaks in unterschiedlichen Farben repräsentiert. Der untere Buchstabe T markiert den Austausch. Darüber sind die Aminosäuren im Drei-Buchstaben-Code gegeben. Die vertikalen Striche markieren die Tripletgrenzen. An der Stelle des Basenaustausches steht die Wildtyp-Aminosäure links, die mutierte Aminosäure rechts.

Die Variante c.2888G>A (p.S963N) (siehe Abbildung 3.8) kommt dagegen nur bei dem Patienten 94 in heterozygotem Zustand vor.

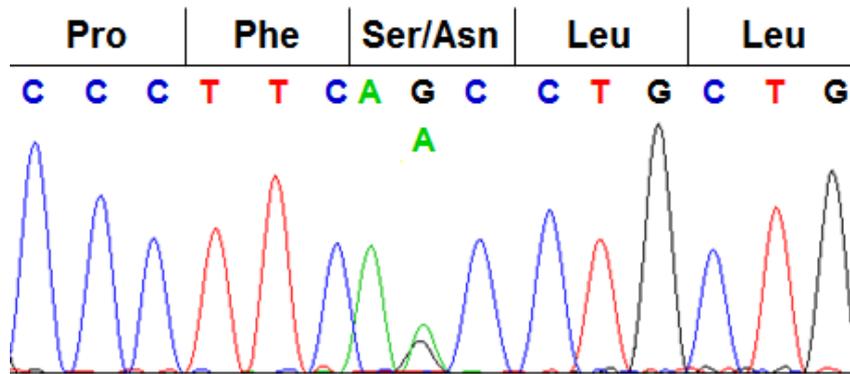


Abbildung 3.8: Ausschnitt aus einem Sequenzelektropherogramm des Exons 2 von Patient 94 mit der heterozygoten Sequenzvariante c.2888G>A (p.S963N)

Die Buchstabenfolge am oberen Rand des Bildes gibt die Basenabfolge wieder und wird durch Peaks in unterschiedlichen Farben repräsentiert. Der untere Buchstabe A markiert den Austausch. Darüber sind die Aminosäuren im Drei-Buchstaben-Code gegeben. Die vertikalen Striche markieren die Triplettgrenzen. An der Stelle des Basenaustausches steht die Wildtyp-Aminosäure links, die mutierte Aminosäure rechts.

Eine Analyse hinsichtlich der Konservierung der Aminosäuren ergab für Prolin an Position 295 keine evolutionäre Konservierung (siehe Abbildung 3.9).

<i>D. rerio</i>	316	VAVSSALDVACTSVPPAGGQLASSGMKSNIAINSLYPTTNGVSPQMPPC	365
<i>G. gallus</i>	278	IQLTAVLPPAIMGQAAGAQPFAFDGSQHIS--RPTSGASTPNISSGSSA	325
<i>B. taurus</i>	269	-----APAC	272
<i>C. lupus</i>	708	LQLSGGAPAAPAAPGPAAPPAAAYEGAPLLA--QPASGASAPHAPSGGPAV	755
<i>M. mulatta</i>	251	-----PSAPAA	256
<i>H. sapiens</i>	264	LPLSAGAPAAA IAGSGPAAPAAFEQAQPLSRPESGASTPGGPAEPSAPAA	313
<i>P. troglodytes</i>	264	LPLSAGAPAAA TAGSGPAAPAAFEQAQPLSRPESGASTPGGPAEPSAPAA	313
<i>M. musculus</i>	269	LQLSAG-PATASAGSGSTLPAAFDGPQHLS--QPASGTSTPCSTSAAPPD	315
<i>R. norvegicus</i>	137	LQLSAG-PATASAGSGSTLSAAFDGPQHLSQPASGTSTPCSTSAGPTD	185

Abbildung 3.9: Ausschnitt aus dem Aminosäuresequenzvergleich von SALL3 verschiedener Spezies

Die Aminosäure Prolin an Position 295 ist an übereinstimmenden Positionen blau hinterlegt. Ein - (gelb hinterlegt) markiert das Fehlen der Aminosäure an dieser Position, andere Aminosäuren sind ebenfalls gelb hinterlegt. Die Zahlen links und rechts geben die Position der jeweiligen randständigen Aminosäure an.

Eine Analyse mittels der *Human Protein Reference Database* (HPRD) und des *Simple Modular Architecture Research Tools* (SMART) ergab, dass sich Prolin an Position 295 in keiner wichtigen Domäne von SALL3 befindet.

Für Serin an Position 963 ergab sich im Gegensatz dazu eine hohe Konservierung (siehe Abbildung 3.10).

<i>D. rerio</i>	999	STSAHAMVKSEQLDIHSPGSENTGALDLTATQPTRSFVKDENPF	SLLFLG	1048
<i>G. gallus</i>	959	-----LKTEKPDSPPPATENGALDLTSTNPGRPVIKEEAPF	SLLFLN	1001
<i>B. taurus</i>	896	-----LKTEKPDSPPLPGENGALDLTATHPCRPSVKEEAPF	SLLFLS	938
<i>C. lupus</i>	1391	-----LKTERPDSPPPAPENGALDLTAAPPGRPAIKEEAPF	SLLFLS	1433
<i>M. mulatta</i>	876	-----LKTERPDSPAPAPGSGGA-----PGRAGIKEEAPF	SLLFLN	911
<i>H. sapiens</i>	933	-----LKTERPDSPAAAPGSGGA-----PGRAGIKEEAPF	SLLFLS	968
<i>P. troglodytes</i>	926	-----LKTERPDSPAPAPGSGGA-----PGRAGIKEEAPF	SLLFLS	961
<i>M. musculus</i>	946	-----LKTERLDSPPPFGNGGALDLTAGHPGRPLIKEEAPF	SLLFLS	988
<i>R. norvegicus</i>	816	-----LKTERLDSPPPFGNGGALDLTAGHPGRPLIKEEAPF	SLLFLS	858

Abbildung 3.10: Ausschnitt aus dem Aminosäuresequenzvergleich von SALL3 verschiedener Spezies

Die Aminosäure Serin an Position 963 ist an übereinstimmenden Positionen blau hinterlegt. Es zeigt sich ein Vorkommen der Aminosäure Serin bei allen neun verglichenen Spezies. Die Zahlen links und rechts geben die Position der jeweiligen randständigen Aminosäure an.

Ein Abgleich mittels HPRD und SMART ergab allerdings auch hier kein Vorkommen von Serin 963 in einer der Zinkfinger-Domänen von SALL3.

Die beiden Varianten c.883C>T (p.P295S) und c.2888G>A (p.S963N) wurden zusätzlich mit Hilfe verschiedener Vorhersage-Programme hinsichtlich einer möglichen Pathogenität analysiert (siehe Tabelle 3.4).

Tabelle 3.4: In silico-Vorhersagen zur Pathogenität von p.P295S und p.S963N in SALL3

Variante	Mutation Taster	PolyPhen-2	Panther	SIFT	SNAP
p.P295S	<i>Disease causing</i>	<i>Benign</i>	<i>Probably damaging</i>	<i>Affects protein function</i>	<i>Non-neutral</i>
	Probability 0.9152	Score 0.01	P _{deleterious} 0.8012	Score 0.00 (low confidence)	Accuracy 58%
p.S963N	<i>Disease causing</i>	<i>Benign</i>	NA	<i>Tolerated</i>	<i>Neutral</i>
	Probability 0.9493	Score 0.11	-	Score 0.33	Accuracy 89%

Die Aminosäureaustausche wurden mit MutationTaster, PolyPhen-2, Panther, SIFT und SNAP analysiert. Hohe Werte beim MutationTaster, PolyPhen-2 und Panther (jeweils ein Maximalwert von 1) ergeben eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine krankheitsverursachende Mutation. Ein Score < 0.05 bei SIFT indiziert ebenfalls eine wahrscheinlich krankheitsverursachende Veränderung. Der Accuracy-Wert bei SNAP gibt die Wahrscheinlichkeit an, mit der die getroffene Vorhersage zutrifft. NA: not applicable

Für c.883C>T (p.P295S) ergaben sich daraus sehr unterschiedliche Vorhersagen von *benign* bis *disease causing*, für c.2888G>A (p.S963N) dagegen ließ sich eher keine Pathogenität ableiten. Anschließend wurden alle fünf potentiell pathogenen Varianten im Hinblick auf mögliche neue Spleißstellen mit Hilfe der Programme BDGP, NetGene 2.0 und HSF 2.4.1 untersucht. Dabei ergab sich nur durch HSF 2.4.1 für die Variante c.883C>T eine mögliche neue Donor-Spleißstelle mit einem *consensus value* von 79.09 (siehe Abbildung 3.11).

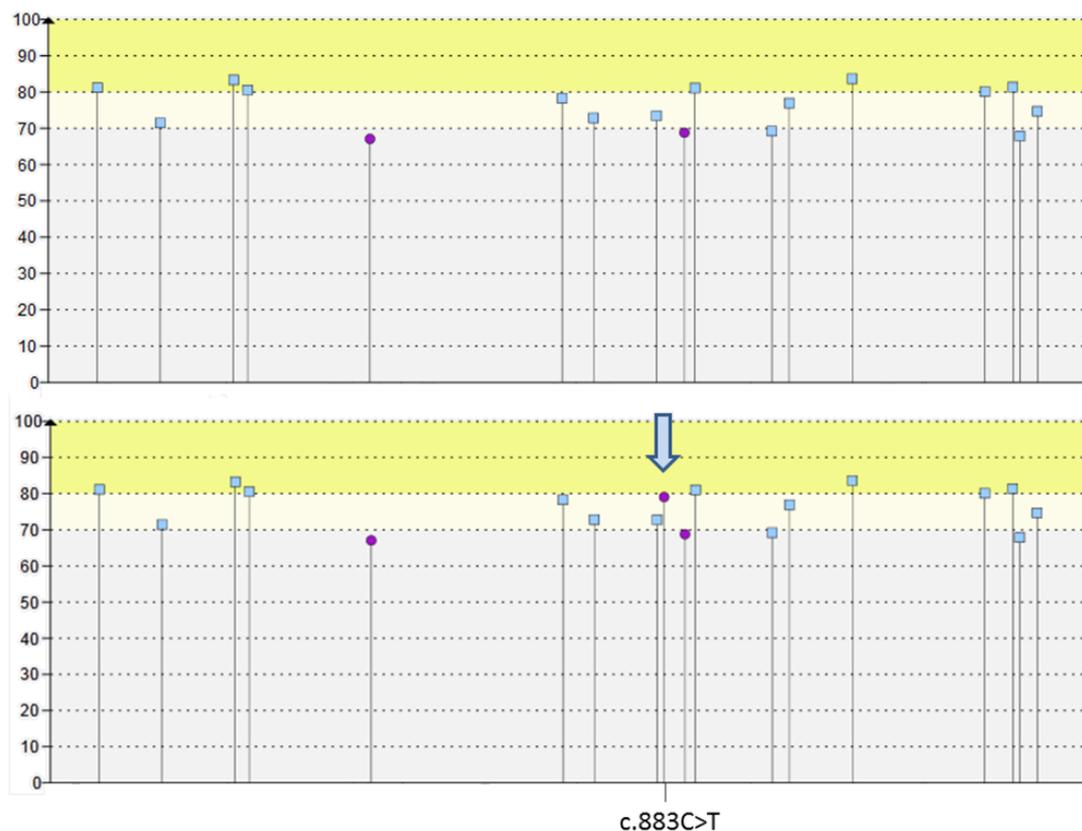


Abbildung 3.11: Spleißstellenvorhersage von HSF 2.4.1 für c.883C>T in SALL3

Das Diagramm stellt mögliche Spleißstellen von Position c.704 bis c.1003 dar. Oben ist das Ergebnis für die Wildtyp-Sequenz dargestellt, unten für die Variante c.883C>T. Die Abszisse zeigt die Position in der Basenabfolge an, die Position c.883C>T ist durch einen Strich markiert. Die Ordinate gibt die Wahrscheinlichkeit für eine Spleißstelle an dieser Position wieder. Der gelbe Bereich gibt sehr wahrscheinliche, beige mögliche und der graue Bereich unwahrscheinliche Spleißstellen an. Mögliche Akzeptor-Spleißstellen sind durch einen hellblauen Kasten, Donor-Spleißstellen durch einen lilafarbenen Kreis dargestellt. Der blaue Pfeil markiert die neu entstandene mögliche Donor-Spleißstelle. Eine natürliche Spleißstelle kommt in dieser Kodierregion nicht vor.

3.3 Mutationsanalyse des *TGFB2*-Gens bei 88 Patienten mit Bindegewebserkrankungen aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms

3.3.1 Vorbemerkungen

Vor Kurzem wurde *TGFB2* als ein neues Krankheitsgen für ein zum Marfan-Syndrom/Loeys-Dietz-Syndrom ähnliches Krankheitsbild veröffentlicht. Beschrieben wurden bisher zehn verschiedene heterozygote Mutationen in *TGFB2* und zwei das *TGFB2*-Gen umfassende Mikrodeletionen sowie die damit assoziierten Phänotypen (Boileau et al. 2012, Lindsay et al. 2012).

Im Rahmen dieser Arbeit sollte eine Kohorte von 88 Patienten, die mutationsnegativ in den bisher bekannten Krankheitsgenen *FBN1*, *TGFBR1* und *TGFBR2* waren, auf Veränderungen im *TGFB2*-Gen untersucht werden. Die Blutproben der Patienten stammen aus der Marfan-Sprechstunde des Universitätsklinikums Hamburg-Eppendorf. Die Patienten weisen klinische Merkmale eines Marfan-Syndroms und/oder ein frühes Aortenaneurysma/-dissektion auf. Es wurde zunächst eine Sequenzanalyse aller acht kodierenden Exons des *TGFB2*-Gens durchgeführt. Im Anschluss folgte eine quantitative Real-Time PCR für ausgewählte Exons bei mutationsnegativen Patienten.

3.3.2 PCR-Amplifikation und Sequenzanalyse von *TGFB2* bei 88 Patienten mit Bindegewebserkrankungen aus dem Marfan-Formenkreis

Zur Mutationsanalyse von *TGFB2* wurden zuerst Primerpaare für alle acht Exons abgeleitet. Die Exon/Intron-Struktur wurde mit Hilfe des BLAT-Programmes bestimmt. Exons 4 und 5 liegen sehr nah beieinander, sodass hier sowohl die PCR als auch die Sequenzierung mit nur einem Primerpaar durchgeführt wurde. Bei der Auswahl der Primer wurde zusätzlich darauf geachtet, dass auch die Exon/Intron-Übergänge ausreichend (bis zu 40 bp) mitsequenziert wurden, um auch dort etwaige Veränderungen identifizieren zu können. Um auszuschließen, dass die Primer in repetitiven DNA-Elementen liegen oder SNPs beinhalten, wurde die Sequenz mit dem *Repeat Masker* bzw. den verzeichneten SNPs in *Ensembl* abgeglichen. Die Etablierung der optimalen PCR-Bedingungen für jedes Primerpaar wurde mit DNA-Proben von Kontrollpersonen durchgeführt. Anschließend wurde die genomische DNA von 88 Patienten mit Bindegewebserkrankungen aus dem Marfan-Formenkreis (siehe 2.1.1) für jedes Exon amplifiziert und die Amplikons zur Qualitäts- und Quantitätskontrolle auf ein 2%-iges Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 3.12).

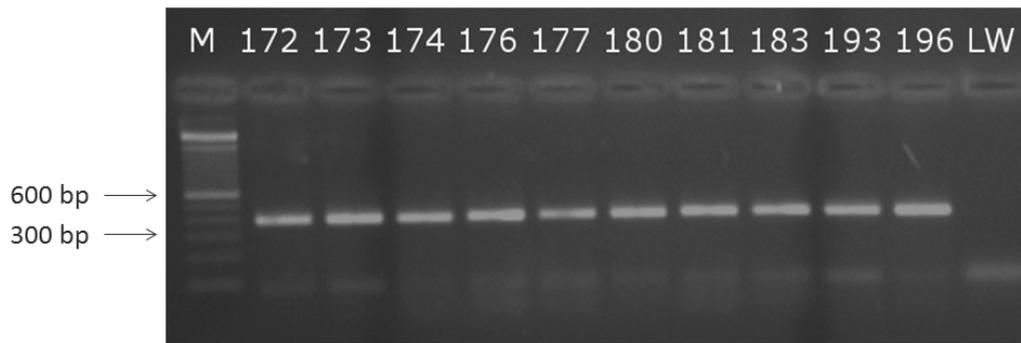


Abbildung 3.12: Exemplarisches, mit Ethidiumbromid gefärbtes 2%-iges Agarosegel mit PCR-Produkten des Exons 2 des *TGFB2*-Gens

Die Abbildung zeigt die 350 bp großen PCR-Produkte des Exons 2 von *TGFB2* von 10 Patienten (MARF# 172 - 174, 176, 177, 180, 181, 183, 193, 196). Der Leerwert (LW) ist die Kontrolle ohne DNA. Eine 100 bp Leiter (M) ist zusätzlich zur Orientierung und Überprüfung der Produktgröße aufgetragen. Die 300 bp- und 600 bp-Banden sind mit einem Pfeil markiert.

Nach anschließender Sequenzierung aller PCR-Produkte wurden zwei verschiedene Sequenzvarianten in den 88 Patienten-DNAs gefunden (siehe Tabelle 3.5).

Tabelle 3.5: Gefundene Sequenzvarianten in *TGFB2*

Nukleotidaustausch	Aminosäureaustausch	Häufigkeit des seltenen Allels	dbSNP
c.1165dupA	p.S389Kfs*8	1/176	
c.*39G>A		2/176	rs11466412

Die Tabelle stellt alle gefundenen Sequenzvarianten in *TGFB2* im untersuchten Patientenkollektiv dar. Zusätzlich ist die SNP-Referenznummer (rs) aus *Ensembl* und die Häufigkeit des jeweiligen Allels verzeichnet.

Durch die Mutation c.1165dupA in Exon 7 kommt es bei dem Patienten MARF# 218 zu einer Duplikation der Base Adenin an der Position 1165 der Kodierregion (siehe Abbildung 3.13), was zu einer Leserasterverschiebung und dadurch zu einem vorzeitigen Stopp-Codon in Exon 8 führt.

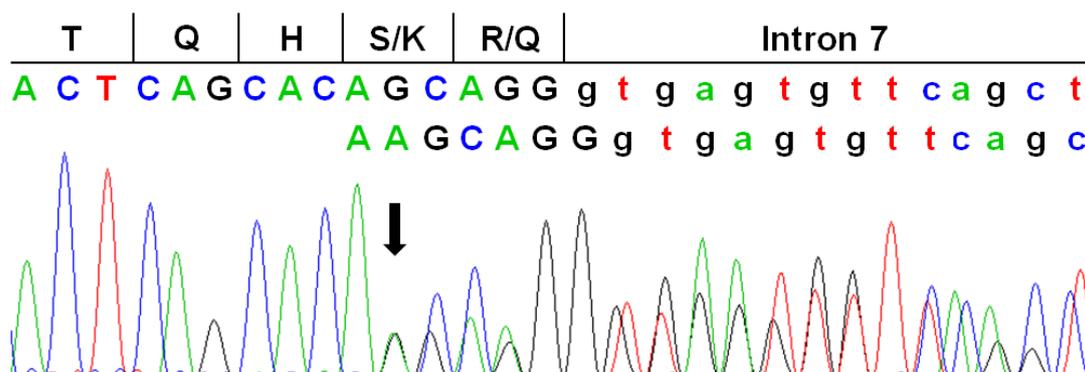


Abbildung 3.13: Ausschnitt aus einem Sequenzelektropherogramm des Exons 7 von Patient MARF# 218 mit der heterozygoten Mutation c.1165dupA (p.S389Kfs*8)
 Die Buchstabenfolge am oberen Rand des Bildes gibt die Wildtyp-Basenabfolge wieder und wird durch Peaks in unterschiedlichen Farben repräsentiert. Die Buchstaben in der zweiten Reihe markieren die jeweils um eine Position verschobene Basenabfolge. Der Pfeil markiert die Duplikation. Darüber sind die Aminosäuren im Ein-Buchstaben-Code gegeben. Die vertikalen Striche markieren die Triplettgrenzen. An der Stelle eines Basenaustausches steht die Wildtyp-Aminosäure links, die mutierte Aminosäure rechts.

Durch die Rasterschubmutation könnte ein TGFB2-Protein mit einem verkürzten COOH-Terminus entstehen, das sieben proteinfremde Aminosäuren aufweist und dann vorzeitig endet (p.S389Kfs*8). Höchstwahrscheinlich ist dieses Protein nicht mehr voll funktionsfähig, sodass diese 1 bp-Duplikation sehr wahrscheinlich pathogen ist.

Der Indexpatient MARF# 218 selbst war zum Untersuchungszeitpunkt 51 Jahre alt und war bereits an einem Aortenaneurysma von 51 mm Größe operiert worden. In der MR-Angiographie zeigte sich eine starke Tortuosität sowohl der kranialen als auch der zervikalen Arterien. Der Patient war 191 cm groß, 85 kg schwer und zeigte ein positives Verhältnis von Armlänge zu Körpergröße. Zusätzlich hatte er eine geringgradige Skoliose und Pes planus. Faziale Auffälligkeiten waren eine milde malare Hypoplasie und Retrognathie, ein langes Gesicht und eine prominente Uvula. Eine Hodentorsions- und Leistenhernien-Operation sowie eine Appendektomie und Sigmaresektion nach akuter Divertikulitis finden sich ebenfalls in der Vorgeschichte.

Der Vater (I-1, siehe Abbildung 3.14) des Indexpatienten verstarb mit 52 Jahren an einer Aortendissektion. Ein 47-jähriger Bruder (II-4, siehe Abbildung 3.14) wurde mutationspositiv getestet. Spätere Analysen am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Eppendorf ergaben ebenfalls einen Mutationsnachweis bei seinem 13-jährigen Sohn, dem Neffen des Indexpatienten (III-2, siehe Abbildung 3.14). Der 47-jährige Bruder hatte eine Körpergröße von 186 cm und wog 104 kg. Er wurde ebenfalls bereits an einem Aortenaneurysma von 58 mm Größe und auf Grund einer Leistenhernie operiert. In der MR-Angiographie zeigte sich auch bei ihm eine Tortuosität der Halsarterien, sowie in der klinischen Untersuchung eine milde Skoliose, überstreckbare Gelenke, ein hoher gotischer

Gaumen und eine Retrognathie. Der Neffe III-2 des Indexpatienten wies ebenfalls milde klinische Auffälligkeiten wie eine Skoliose, Brustkorbdeformitäten, überstreckbare Gelenke und Klumpfüße auf. Ein weiterer Bruder des Indexpatienten (II-6, siehe Abbildung 3.14) wurde ebenfalls an einem Aortenaneurysma operiert und zeigte klinische Merkmale, die stark auf eine dem Marfan-Syndrom ähnelnde Krankheit hinweisen. Eine genetische Diagnostik lehnte er ab. Die Tochter (III-1, siehe Abbildung 3.14) des Indexpatienten war mutationsnegativ. Auch bei einem vierten Bruder (II-5, siehe Abbildung 3.14) erbrachten spätere Analysen am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Eppendorf keinen Mutationsnachweis.

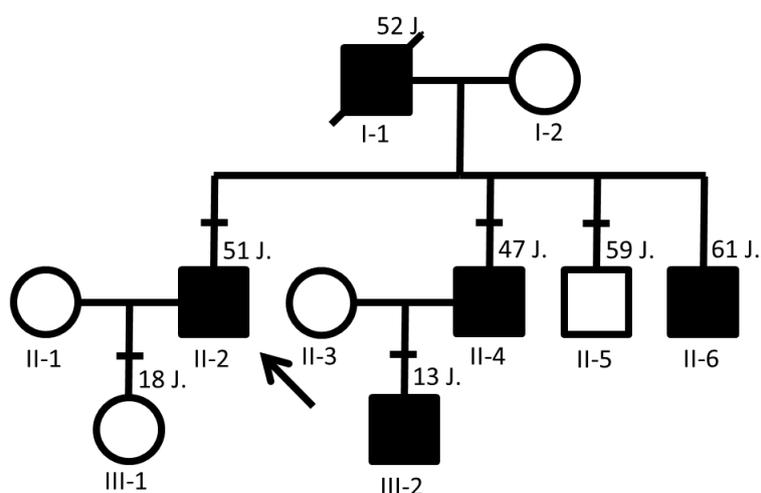


Abbildung 3.14: Stammbaum des Indexpatienten MARF# 218

Der Indexpatient ist durch einen Pfeil markiert. Männliche Individuen sind durch einen Kasten dargestellt, weibliche durch einen Kreis. Bei phänotypisch auffälligen Personen ist der Kasten schwarz ausgefüllt. Die waagerechten schwarzen Balken zeigen an, welche Patienten genetisch getestet wurden. Das Alter der Patienten ist über dem jeweiligen Symbol gegeben. Eine Nummerierung der Familienmitglieder erfolgte unterhalb des entsprechenden Symbols im Stammbaum.

Bei den Patienten MARF# 166 und MARF# 170 wurde in der Sequenzanalyse die heterozygote Variante c.*39G>A in der 3'-untranslatierten Region (3'-UTR) des *TGFB2*-Gens gefunden. Sie ist bei *Ensembl* bereits als SNP hinterlegt und weist eine Allelfrequenz von ca. 2% in der Normalbevölkerung auf, sodass eher nicht von einer Krankheitsrelevanz auszugehen ist.

3.3.3 Kopienzahlanalyse der *TGFB2*-Exons 2 und 8 mittels quantitativer Real-Time PCR

Da zwei Patienten mit einer zum Marfan-Syndrom ähnlichen Erkrankung und einer 3,5 Mb bzw. 6,5 Mb großen Deletion, die beide das komplette *TGFB2*-Gen umfassen, beschrieben wurden (Lindsay et al. 2012), wurde bei den verbliebenen 87 Patienten eine

Kopienzahlanalyse ausgewählter Exons des *TGFB2*-Gens mittels quantitativer Real-Time PCR (qPCR) durchgeführt. Für die initiale Analyse wurden die *TGFB2*-Exons 2 und 8 ausgewählt, um das gesamte *TGFB2*-Gen umfassende Duplikationen und Deletionen bei den Patienten aufzudecken. Im Fall von uneindeutigen Werten wurden weitere *TGFB2*-Exons und/oder auch ausgewählte *FBN1*-Exons bei den entsprechenden Patienten untersucht. Die relative Quantifizierung erfolgte mittels der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (siehe 2.2.11). Es erfolgte jeweils eine Doppelbestimmung pro Durchlauf, die Ergebnisse wurden vor Einsatz der Methode gemittelt und sind in Abbildung 3.15 dargestellt.

Von den 87 Patienten wurden bei 84 Werte zwischen 0,8 und 1,2, also eine normale Kopienzahl für die Exons 2 und 8, gemessen. Der Patient MARF# 157 zeigte allerdings sowohl für Exon 2 als auch für Exon 8 einen niedrigeren Wert von 0,7. Eine Deletion wäre daher möglich. Die beiden Patienten MARF# 166 und 172 zeigten dagegen für beide Exons Werte von deutlich größer 1,5, was auf eine mögliche Duplikation hinweist. Aus diesem Grund erfolgte bei allen drei Patienten eine weitere qPCR für zwei weitere Exons von *TGFB2* (Exons 3 und 7) und zwei Exons von *FBN1* (Exon 35 und 63). Die Ergebnisse sind in Abbildung 3.16 dargestellt.

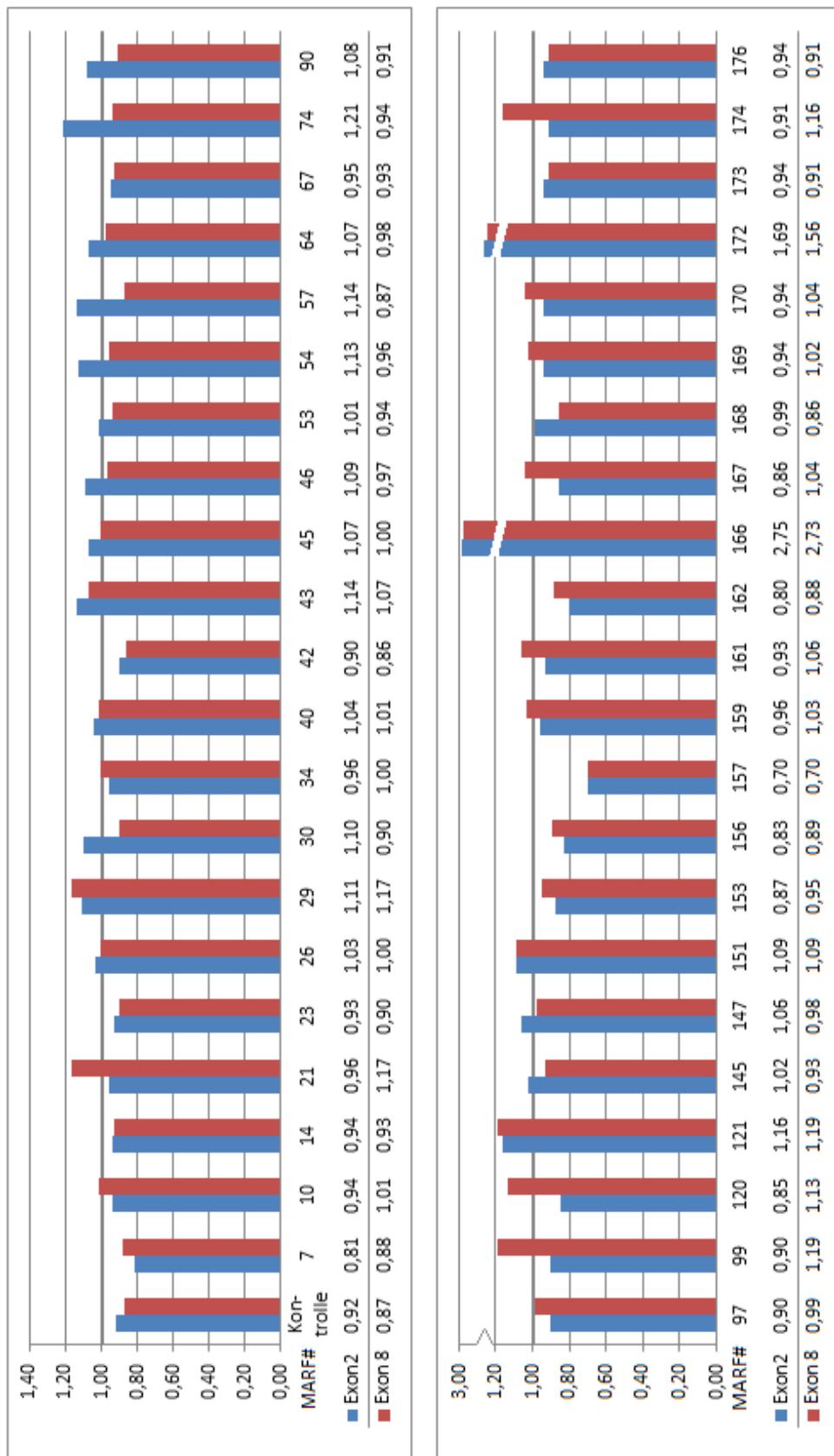


Abbildung 3.15: Kopienzahlanalyse der Exons 2 und 8 des TGFB2-Genes bei 87 Patienten

Die Grafik zeigt die Ergebnisse der Kopienzahlanalyse aus der quantitativen Real-Time PCR für Exon 2 und 8 des TGFB2-Genes. Die Ordinate gibt die Werte der quantitativen Analyse an, die Abszisse die jeweilige MAF-Nr. der Patienten. Blaue Balken repräsentieren die Kopienzahl für das Exon 2, rote Balken für das Exon 8. Werte in einem Bereich von ca. 0,8 bis 1,2 bedeuten eine zweifache Kopienzahl; Werte von unter 0,6 zeigen eine mögliche Deletion und Werte über 1,4 eine mögliche Duplikation des jeweiligen Exons an.

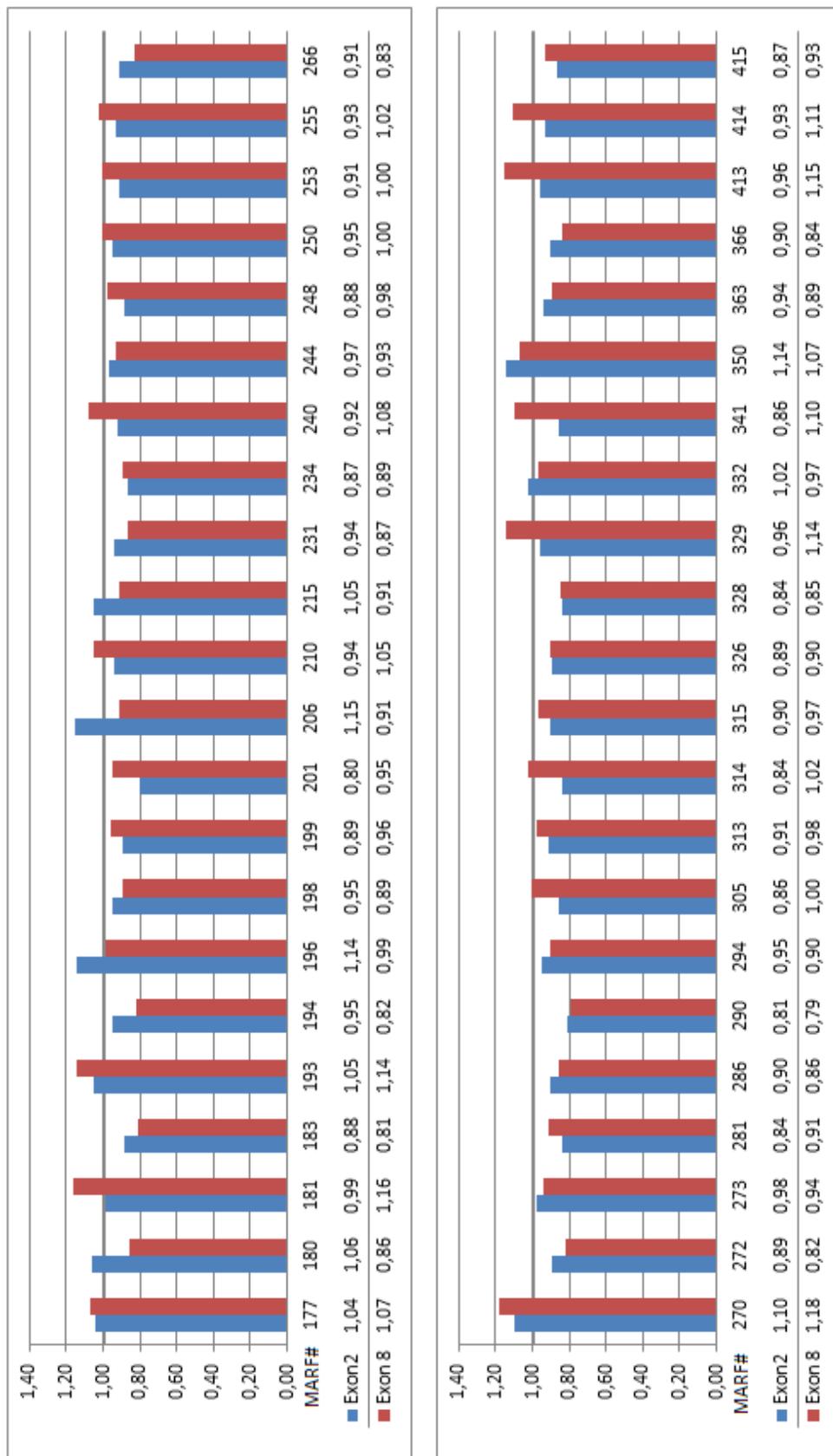


Abbildung 3.15: Kopienzahlanalyse der Exons 2 und 8 des TGFB2-Gens bei 87 Patienten

Die Grafik zeigt die Ergebnisse der Kopienzahlanalyse aus der quantitativen Real-Time PCR für Exon 2 und 8 des TGFB2-Gens. Die Ordinate gibt die Werte der quantitativen Analyse an, die Abszisse die jeweilige MARF-Nr. der Patienten. Blaue Balken repräsentieren die Kopienzahl für das Exon 2, rote Balken für das Exon 8. Werte in einem Bereich von ca. 0,8 bis 1,2 bedeuten eine zweifache Kopienzahl; Werte von unter 0,6 zeigen eine mögliche Deletion und Werte über 1,4 eine mögliche Duplikation des jeweiligen Exons an.

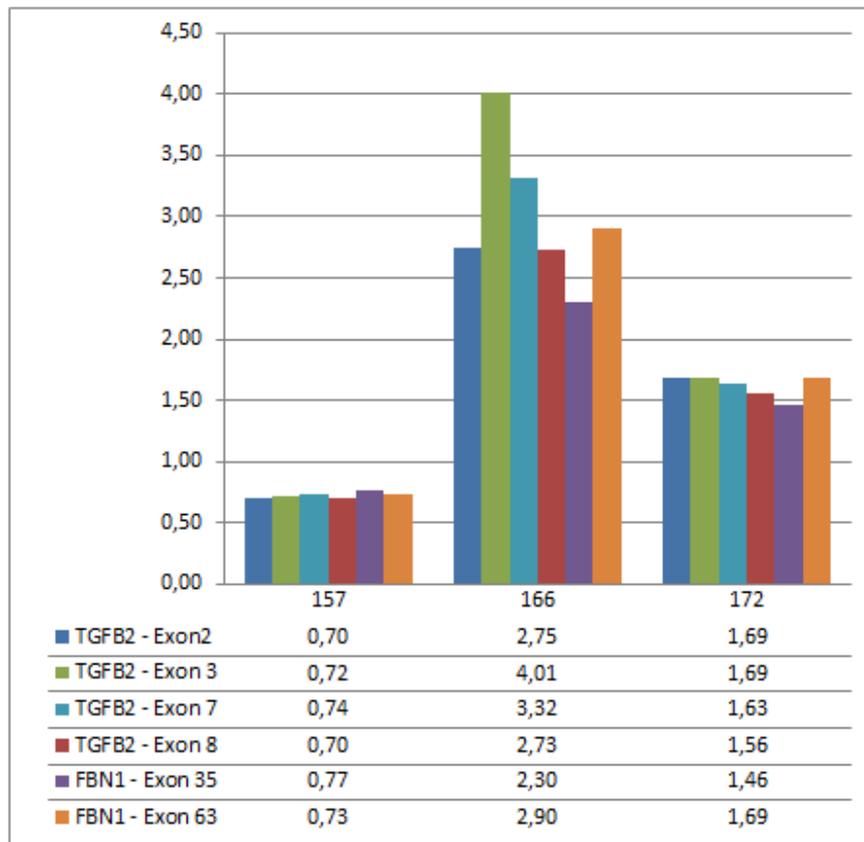


Abbildung 3.16: Kopienzahlanalyse der Exons 2, 3, 7 und 8 des *TGFβ2*-Gens und der Exons 35 und 63 des *FBN1*-Gens bei drei Patienten

Die Grafik zeigt die Ergebnisse der Kopienzahlanalyse aus der quantitativen Real-Time PCR für Exon 2 (blau), 3 (grün), 7 (hellblau) und Exon 8 (rot) des *TGFβ2*-Gens und für Exon 35 (lila) und 63 (orange) des *FBN1*-Gens. Die Ordinate gibt die Werte der quantitativen Analyse an, die Abszisse die jeweilige MARF-Nr. des Patienten. Werte in einem Bereich von ca. 0,8 bis 1,2 bedeuten eine zweifache Kopienanzahl. Werte von unter 0,6 zeigen eine mögliche Deletion und Werte über 1,4 eine mögliche Duplikation des jeweiligen Exons an.

Die Ergebnisse der qPCR ergaben auch für alle anderen Exons des *TGFβ2*-Gens und die Exons des *FBN1*-Gens sehr ähnliche Werte. Daher ist am ehesten davon auszugehen, dass die DNA dieser drei Patienten nicht korrekt gemessen und verdünnt wurde oder DNA-Verunreinigungen zu diesen übereinstimmend aberranten Werten geführt haben.

4 Diskussion

4.1 Keine eindeutig pathogene Mutation in *CATSPER3* und *SALL3* als Nachweis für mit Intelligenzminderung assoziierte Krankheitsgene

In dieser Arbeit wurden bei 150 Patienten mit Intelligenzminderung die von Frau Dr. med. Bettina Chilian identifizierte Kandidatengene für Intelligenzminderung, *CATSPER3* und *SALL3* (Chilian 2012), mittels Sequenzanalyse auf mögliche Veränderungen in den acht bzw. drei Exons und den Exon/Intron-Übergängen hin untersucht. Insgesamt wurden bei diesen 150 Patienten 15 Sequenzvarianten in *CATSPER3* und 20 Sequenzvarianten in *SALL3* mit unterschiedlicher Häufigkeit identifiziert (siehe Tabellen 3.1 und 3.3).

Für alle Varianten in *CATSPER3* war bereits eine SNP-Referenznummer (rs) vorhanden. Diese Varianten waren damit bereits bei gesunden Personen beschrieben. Lediglich die bei Patient 176 heterozygot gefundene Missense-Variante c.581T>G (p.L194W) war mit einer so niedrigen Allelhäufigkeit von 3/17553 (< 0,01%) in *Ensembl* gelistet, dass sie zu näheren Analysen herangezogen wurde. Der ursprüngliche Translokationspatient 1, bei dem dieses Kandidatengen identifiziert worden war, hatte die Chromosomenaberration von seiner gesunden Mutter geerbt, sodass auch bei diesen drei gesunden Kontrollpersonen eine unvollständige Penetranz vermutet werden könnte. Informationen über die Eltern des Patienten 176 liegen nicht vor. Die Variante c.581T>G (p.L194W) wurde daher hinsichtlich der Konservierung der Aminosäure Leucin an Position 194 untersucht. Es zeigte sich, dass Leucin an der entsprechenden Position auch bei sechs anderen Spezies (*M. musculus*, *R. norvegicus*, *M. mulatta*, *P. troglodytes*, *C. lupus*, *B. taurus*) vorkommt und in einer der Transmembrandomänen (nach Loble et al. 2003) des Calciumkanalproteins liegt (siehe Abbildung 4.1).

Dies könnte ein Hinweis auf die funktionelle Relevanz der Aminosäure Leucin an dieser Position sein. Die mögliche Pathogenität der Variante c.581T>G (p.L194W) wurde mittels der Programme MutationTaster, PolyPhen-2, Panther, SIFT und SNAP analysiert. Auch hier zeigten sich sehr hohe Wahrscheinlichkeiten für eine pathogene Mutation (siehe Tabelle 3.2).

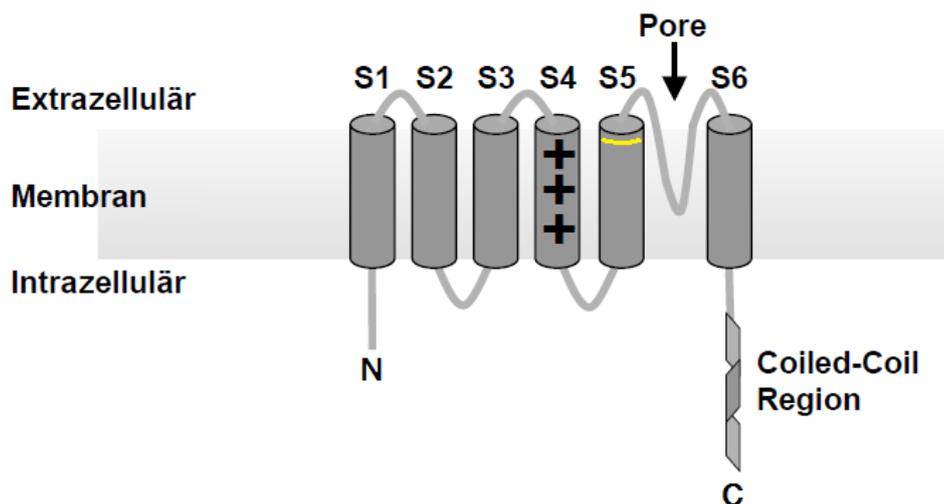


Abbildung 4.1: Topologie von CATSPER3

Die Abbildung zeigt den Aufbau von CATSPER3. Die Transmembrandomänen (S1 - S6) sowie die Porenregion des Proteins sind jeweils entsprechend beschriftet. Das N und das C markieren den entsprechenden Terminus. Die spannungssensitive Region des Proteins ist durch +++ in der Transmembrandomäne S4 markiert. Die *Coiled-Coil* Region könnte zur Interaktion mit weiteren CATSPER-Proteinen der Familie dienen (Lobley et al. 2003). Die Aminosäure Leucin an Position 194 (gelb eingezeichnet) liegt beim Menschen innerhalb der Transmembrandomäne S5 (nach Lobley et al. 2003) und somit direkt neben der porenformenden Region des Proteins (Abbildung modifiziert nach Lobley et al. 2003).

In mehreren Genen (u. a. *CACNA1C*, *CACNA1G* und *CACNA1I*), die für die α_1 -Untereinheit spannungsgesteuerter Calciumkanäle kodieren, sind mehrere, ebenfalls als SNP gelistete Varianten bekannt, die mit dem Krankheitsphänotyp des Timothy-Syndroms bzw. Autismusspektrum-Erkrankung und/oder Intelligenzminderung assoziiert sind (Lu et al. 2012, Schmunk u. Gargus 2013). Das Timothy-Syndrom wird autosomal-dominant vererbt und ist durch ein Long-QT-Syndrom und Syndaktylien in Verbindung mit Epilepsien und/oder Autismus oder Intelligenzminderung gekennzeichnet (Splawski et al. 2004). Die α_1 -Untereinheit dieser Kanäle formt dabei sowohl die spannungssensitive Region, als auch die Pore selbst (Lu et al. 2012). Auch in weiteren Genen dieser α_1 -Untereinheiten-Familie sind Allele bekannt, die mit Autismus assoziiert sind (Schmunk u. Gargus 2013). Somit scheint die Poren-Region in Calciumkanälen ein anfälliger Bereich für mit Autismusspektrum-Erkrankungen und/oder Intelligenzminderung assoziierten Mutationen zu sein. Ein Mechanismus, der auch auf die Variante c.581T>G (p.L194W) in *CATSPER3* zutreffen könnte.

Neueste Untersuchungen auf dem Gebiet der Intelligenzminderung gehen davon aus, dass bei vielen genetischen Formen der Intelligenzminderung oder Autismusspektrum-Erkrankungen mehr als ein verändertes Gen involviert ist und eine oligogene Vererbung in vielen Fällen zugrunde liegt (Ellison et al. 2013, Vorstman u. Ophoff 2013). So zeigten Girirajan et al. (2010) für die 16p12.1-Mikrodeletion, dass der klinische Phänotyp bzw.

die Intelligenzminderung stark davon beeinflusst wird, ob noch weitere CNVs bei den Betroffenen vorhanden sind. Patienten mit weiteren CNVs im Genom zeigten somit meist einen schwereren Phänotyp als Patienten mit nur der 16p12.1-Mikrodeletion als alleiniger Veränderung (Girirajan et al. 2010). Schaaf et al. (2011) konnten diese Hypothese mit Analysen zu mehreren Genen für Autismusspektrum-Erkrankungen (u. a. auch *CACNA1C*) unterstützen; auch hier zeigte sich in der gesunden Kontrollgruppe ein signifikant niedrigeres Vorkommen von heterozygoten Varianten in den mit Autismus assoziierten Genen als bei den betroffenen Personen (Schaaf et al. 2011). Dieser Mechanismus wäre somit auch für *CATSPER3* als Krankheitsgen denkbar und könnte sowohl die unvollständige Penetranz bei der Mutter des Translokationspatienten 1 als auch das Vorkommen der Variante c.581T>G (p.L194W) bei einigen wenigen gesunden Personen erklären.

Eine weitere Möglichkeit wäre, dass es durch die Mutation c.581T>G in *CATSPER3* zu einer Spleißstellenveränderung kommt. Es könnte neben dem Überspringen eines einzelnen oder mehrerer Exons auch zur Aktivierung einer kryptischen Spleißstelle oder zur fehlerhaften Entfernung eines Introns kommen. Dies könnte zu aberranten Transkripten führen und nachfolgend auch die Proteinstruktur tiefgreifend verändern und so u. U. gravierende Folgen für die Funktionsfähigkeit des Proteins haben (Baralle D. u. Baralle M. 2005). Aus diesem Grund wurde diese Variante mit Hilfe der drei Programme BDGP, NetGene 2.0 und HSF 2.4.1 analysiert. Eine mögliche Spleißstellenveränderung ergab sich allerdings nicht.

Um abschließend untermauern zu können, dass die Mutation c.581T>G (p.L194W) für den Krankheitsphänotyp des Patienten 176 ursächlich ist, sind weitere genetische und funktionelle Analysen notwendig. So ist auf Grund nicht vorhandener DNA der Eltern des Patienten bisher unklar, ob die Mutation vererbt wurde.

In *SALL3* sind drei der 20 gefundenen Varianten bisher nicht in *Ensembl*, 1000 *Genomes* oder EVS verzeichnet. Die Missense-Variante c.883C>T (p.P295S) wurde bei sieben Patienten heterozygot im Exon 2 identifiziert. Ebenso die einmalig gefundene Variante c.2888G>A (p.S963N). Die stille Mutation c.3507C>T in Exon 3 wurde bei einem Patienten entdeckt und ist bisher noch nicht in den o. g. Datenbanken gelistet. Zusätzlich waren die beiden bereits bekannten stillen Mutationen c.1507C>T und c.2499G>A mit einer Allelfrequenz von weit <1% angegeben, sodass auch sie für weitere Untersuchungen herangezogen wurden.

SALL3 zeigte sich als ein vielversprechendes Kandidatengen, da es höchstwahrscheinlich eine entscheidende Rolle bei der Entwicklung des Nervensystems spielt (Sweetman u. Münsterberg 2006). *Sall3* wird im Tiermodell besonders stark im zentralen Nervensystem exprimiert, u.a. in primären Motorneuronen, im Telencephalon, Diencephalon,

Rhombencephalon und entlang des gesamten, sich entwickelnden Rückenmarks und der Hinterhörner (Camp et al. 2003). Es wird angenommen, dass SALL3 mit Hilfe seiner vier Zinkfinger-Domänen als Transkriptionsfaktor wirkt und somit wahrscheinlich an der Regulation des Zellzyklus bzw. der Zelladhäsion beteiligt ist (Parrish et al. 2004).

Eine Analyse hinsichtlich der Konservierung der beiden Missense-Varianten p.P295S und p.S963N ergab für Prolin 295 weder eine hohe evolutionäre Konservierung noch ein Vorkommen in einer der wichtigen Zinkfinger-Domänen von SALL3. Serin 963 zeigte dagegen eine hohe Konservierung, allerdings ebenfalls kein Vorkommen in einer der Zinkfinger-Domänen (siehe Abbildung 4.2).



Abbildung 4.2: Topologie von SALL3

Die Abbildung zeigt die Domänenstruktur von SALL3. Die Zinkfinger-Domänen (ZF 1-9, NT N-terminal) sind dunkelrot markiert, die weißen Zahlen geben den entsprechenden Aminosäuren-Bereich an. Der hellblaue Bereich zeigt die gesamte Aminosäuresequenz, in gelb sind die beiden Aminosäureaustausche p.P295S und p.S963N markiert. Das N und das C markieren den entsprechenden Terminus. (Abbildung nach Sweetman und Münsterberg 2006).

In silico-Vorhersagen zur Pathogenität dieser beiden Varianten ergaben für p.P295S sehr unterschiedliche Vorhersagen von *benign* (PolyPhen-2) bis *disease causing* (MutationTaster) bzw. *probably damaging* (Panther), *affects protein function* (SIFT) und *non-neutral* (SNAP). Für die Variante p.S963N trafen die Programme bis auf den MutationTaster mit *disease causing* durchweg benigne Vorhersagen (PolyPhen-2, SIFT und SNAP). Panther konnte diese Variante nicht analysieren (siehe Tabelle 3.4).

Hinsichtlich einer Spleißstellenanalyse ergab sich nur für die Variante c.883C>T mittels des Programmes HSF 2.4.1 eine mögliche neue Donor-Spleißstelle (siehe Abbildung 3.11). Alle anderen Programme erkannten diese Spleißstelle allerdings nicht. Für die anderen vier Varianten c.2888G>A (p.S963N), c.3507C>T [p.(=)], c.1507C>T [p.(=)] und c.2499G>A [p.(=)] ließ sich keine neue Spleißstelle feststellen.

Zusammenfassend ergaben sich somit für die Variante c.883C>T (p.P295S) sehr widersprüchliche Angaben. Einerseits zeigte sich weder eine hohe Konservierung der Aminosäure Prolin 295, noch ein Vorkommen innerhalb einer der Zinkfinger-Domänen, was eine funktionelle Relevanz der Aminosäure an dieser Position eher unwahrscheinlich macht. Andererseits gaben die Vorhersage-Programme hinsichtlich der Pathogenität doch sehr unterschiedliche Hinweise und zumindest eines der Spleißstellen-Programme eine mög-

liche neue Donor-Spleißstelle an. Dem steht gegenüber, dass diese Variante bei sieben Patienten identifiziert wurde, was die Wahrscheinlichkeit der Pathogenität dieser Variante weiter reduziert. Somit lässt sich eine mögliche Pathogenität der Variante c.883C>T (p.P295S) nicht komplett ausschließen, erscheint aber eher unwahrscheinlich. Helfen würde ein eventueller *de novo*-Nachweis mit Hilfe der DNA der Eltern, die zum Zeitpunkt der Untersuchung nicht vorlag. Ebenfalls möglich wären Transkript-Untersuchungen. Diese könnten Rückschlüsse darauf erlauben, ob eine neue Spleißstelle an dieser Position genutzt wird.

Für die Variante c.2888G>A (p.S963N) zeigte sich zwar eine hohe Konservierung der Aminosäure Serin an Position 963, allerdings kein Vorkommen in einer der Zinkfinger-Domänen des SALL3-Proteins. Zusätzlich gaben hier alle Vorhersage-Programme bis auf der MutationTaster eine sehr niedrige Wahrscheinlichkeit für eine Pathogenität der Variante an. Die Möglichkeit einer neuen Spleißstelle zeigte sich hier ebenfalls nicht. Insgesamt gesehen besteht auch hier nur eine sehr geringe Wahrscheinlichkeit für eine Pathogenität der Variante. Eine Untersuchung der elterlichen DNA könnte sinnvoll sein.

Letztendlich kann auch eine oligogene Vererbung angenommen werden. Weitere Untersuchungen hinsichtlich zusätzlich vorhandener genetischer Veränderung wären allerdings nötig, um diese These weiter zu unterstützen.

Denkbar wäre aber auch, dass die Unterbrechung vor bzw. in *SALL3* für einen anderen Teil des Phänotyps des Translokationspatienten 2 ursächlich ist. So zeigte der Translokationspatient 2, bei dem der Bruchpunkt in oder vor dem *SALL3*-Gen identifiziert worden war, neben der Entwicklungsverzögerung einen Kleinwuchs. Aufgrund dessen wurde in Zusammenarbeit mit Herrn PD Dr. Christian Thiel (Humangenetisches Institut Universitätsklinikum Erlangen) das *SALL3*-Gen in einer Kohorte von 189 Patienten mit idiopathischem Kleinwuchs sequenziert. Es konnte keine krankheitsrelevante Variante identifiziert werden (unveröffentlichte Daten).

Analysen bei mehreren Patienten mit dem 18q-Deletionssyndrom beschreiben die Region um *SALL3* neben Intelligenzminderung aber u. a. als kritische Region für Hypotonie und Epilepsie (Strathdee et al. 1995), klinische Merkmale, die auch bei dem Translokationspatienten 2 vorlagen. Auch dies ließe sich mit der Funktion von SALL3 als Transkriptionsfaktor (Parrish et al. 2004) bzw. der Vermutung, dass dieser bei der Entwicklung des Nervensystems eine entscheidende Rolle spielt (Sweetman u. Münsterberg 2006), gut vereinbaren.

Abschließend ist noch zu sagen, dass mit der hier durchgeführten Sequenzanalyse bei *CATSPER3* und *SALL3* lediglich die kodierenden Exons und die Exon/Intron-Übergänge untersucht wurden. Es ist allerdings nicht auszuschließen, dass in seltenen Fällen in den großen intronischen Bereichen, der Promotorregion oder den 5'- und 3'-untranslatierten

Bereichen der Gene pathogene Mutationen vorliegen. Zudem könnten submikroskopische Deletionen oder Duplikationen, die das *SALL3*-Gen umfassen, vorliegen, welche mit Hilfe der Sequenzanalyse nicht erfasst werden.

4.2 Eine neue Mutation in *TGFB2* bei einem Patienten mit Aortenaneurysma und arterieller Tortuosität

4.2.1 Die Mutation c.1165dupA (p.S389Kfs*8) ist höchstwahrscheinlich für den Phänotyp des Patienten MARF# 218 ursächlich

In der durchgeführten Sequenzanalyse von *TGFB2* bei 88 Patienten mit Bindegewebserkrankungen aus dem Marfan-Formenkreis wurde bei drei Patienten eine Abweichung der Sequenz vom Wildtyp gefunden. Zwei Patienten waren heterozygote Träger der Variante c.*39G>A. Der Austausch der Base Guanin gegen Adenin liegt hier 39 Nukleotide nach dem Stoppcodon, also in der 3'-untranslatierten Region des Gens in Exon 8. Diese Variante ist bei *Ensembl* unter der Referenznummer *rs11466412* mit einer durchschnittlichen Allelhäufigkeit von 2% als SNP gelistet. Somit scheint diese Variante ein Polymorphismus ohne Krankheitsrelevanz zu sein.

Die Variante c.1165dupA (p.S389Kfs*8) wurde dagegen nur bei dem Patienten MARF# 218 gefunden und ist bei *Ensembl*, *1000 Genomes* und *EVS* nicht als SNP gelistet. Durch die Duplikation der Base Adenin an Position 1165 der Kodierregion in Exon 7 kommt es zu einem Frameshift des Leserasters, was zu einem Stoppcodon nur acht Codons später in Exon 8 führt. Dies stellt eine neue, bisher nicht bekannte Frameshift-Mutation in *TGFB2* dar. So sind in *TGFB2* bereits eine Frameshift-Duplikation (c.873_888dup führt zu p.Asn297*) und zwei Frameshift-Deletionen [c.1021_1025delTACAA (p.Tyr341Cysfs*25) und c.1106_1110delACAAT (p.Tyr369Cysfs*26)] bekannt, die einen zum Marfan- und Loeys-Dietz-Syndrom ähnlichen Phänotyp hervorrufen (Boileau et al. 2012, Lindsay et al. 2012).

Da in der Literatur bereits zwei Patienten mit größeren, *TGFB2* umfassenden Deletionen bekannt sind (Lindsay et al. 2012), wurde eine Analyse hinsichtlich größerer Deletionen oder Duplikationen durchgeführt. Hierfür wurden die DNA-Proben der verbliebenen 87 Patienten mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR untersucht. Ausgesucht wurden im ersten Schritt die Exons 2 und 8. Deletionen oder Duplikationen, die das gesamte Gen oder eines dieser Exons beinhalten, sollten hiermit aufgedeckt werden.

Auffällig waren hierbei die DNAs der Patienten MARF# 157, 166 und 172; daher wurden bei diesen drei Patienten zusätzlich die Exons 3 und 7 von *TGFB2* sowie zwei Exons (35 und 63) des *FBN1*-Gens untersucht. Es zeigten sich hier ähnliche reproduzierbare

niedrige bzw. hohe Werte für alle untersuchten Exons - sowohl von *TGFB2* als auch von *FBN1* (siehe Abschnitt 3.3.3). Die gemessenen Werte lassen sich somit am ehesten auf einen Messfehler in der Konzentration der DNA oder eine Verunreinigung der DNA zurückführen. Somit ließ sich mit Hilfe der quantitativen Real-Time PCR kein Hinweis auf eine größere Deletion oder Duplikation im *TGFB2*-Gen bei einem der untersuchten 87 Patienten finden.

Anzumerken ist auch hier, dass mit der durchgeführten Sequenzanalyse lediglich die kodierende Region und die Exon/Intron-Übergänge, nicht aber die großen intronischen Regionen sowie die Promotorregion oder die 5'- und 3'-untranslatierten Bereiche untersucht wurden. In der quantitativen Analyse mittels qPCR wurden ebenfalls nicht alle Exons des *TGFB2*-Gens systematisch untersucht. Dies erfolgte, da bisher in der Literatur nur größere, mehrere Mb umfassende Deletionen, aber keine kleineren, nur einzelne Exons umfassenden Deletionen oder Duplikationen beschrieben sind (Lindsay et al. 2012). Eine Deletion oder Duplikation einzelner Exons wäre aber dennoch möglich.

Die heterozygote 1 bp-Duplikation c.1165dupA (p.Ser389Lysfs*8) in *TGFB2* ist mit großer Wahrscheinlichkeit krankheitsverursachend. So ließ sich diese Mutation auch bei dem betroffenen Bruder und Neffen des Indexpatienten nachweisen (siehe Abschnitt 3.3.2). Bei dem bereits verstorbenen Vater des Indexpatienten und einem ebenfalls betroffenen weiteren Bruder, der eine Untersuchung ablehnte, konnte kein Mutationsnachweis erbracht werden. Die gesunde Tochter und ein weiterer gesunder Bruder des Patienten wiesen diese Mutation nicht auf. Die Segregation der Mutation mit dem Phänotyp ist ein weiteres starkes Indiz für die Pathogenität der Variante c.1165dupA (p.S389Kfs*8).

Das mutante Protein enthält nicht nur sieben proteinfremde Aminosäuren, sondern weist auch einen um 47 Aminosäuren verkürzten COOH-Terminus auf. Da das neue Stoppcodon innerhalb des achten und damit letzten Exons zu liegen kommt, ist *nonsense mediated mRNA decay* nicht zu erwarten (Silva u. Romão 2009). Von Frau Dr. Vanessa van Rahden (Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Hamburg-Eppendorf) durchgeführte RNA-Analysen bestätigten diese Vermutung und wiesen die veränderte *TGFB2*-mRNA im Blut des betroffenen Patienten nach (Leutermann et al. 2014). Damit ist anzunehmen, dass das entstehende Protein auf Grund der starken Verkürzung nicht funktionsfähig ist und es sich um eine Funktionsverlustmutation handelt. Dieses Ergebnis ist gut mit den Ergebnissen von Boileau et al. (2012) vereinbar, die bereits Haploinsuffizienz als möglichen Krankheitsmechanismus postulierten. Eine weitere Frameshift-Mutation, c.1021_1025delTACAA, war ebenfalls in der *TGFB2*-mRNA des entsprechenden Patienten nachweisbar. Allerdings war nur eine verminderte Menge an Proprotein in glatten Muskelzellen und Fibroblasten detektierbar (Boileau et al. 2012).

Gewebeproben aus den Aortenwänden von *TGFB2*-mutationspositiven Patienten zeigten eine Fragmentierung der elastischen Fasern und höhere Kollagen- und Proteoglykanablagerungen (Lindsay et al. 2012). Weitere immunhistochemische Analysen zeigten in den Proben eine starke Aktivierung der TGF- β -Signalwege inkl. einer Erhöhung von phosphoryliertem SMAD2 und SMAD3 (siehe Abbildung 1.5) sowie der TGF- β -abhängigen Genprodukte (Lindsay et al. 2012). Im Mausmodell bestätigten sich diese Ergebnisse (Lindsay et al. 2012). Eine kompensatorische Hochregulierung von TGF- β 1 wird daher am ehesten als Pathomechanismus dieses eigentlichen Paradoxons von Haploinsuffizienz und erhöhter Aktivierung des Signalweges angenommen (Lindsay et al. 2012). TGF- β 1 selbst stimuliert u. a. den fibrotischen und narbigen Umbau von Muskelgewebe (Burks u. Cohn 2011)

4.2.2 Mit *TGFB2*-Mutationen assoziiertes phänotypisches Spektrum

Bisher wurden 13 verschiedene Mutationen in *TGFB2* bei 37 Patienten beschrieben (Boileau et al. 2012, Lindsay et al. 2012 und Leutermann et al. 2014). In der klinischen Untersuchung zeigten sich sowohl bei unserem Indexpatienten MARF# 218 als auch bei seinem Bruder II-4 (siehe Abbildung 3.14) im Alter von 51 bzw. 47 Jahren ein bereits operiertes Aortenaneurysma von 51 mm bzw. 58 mm Größe. Der Vater der beiden Patienten war im Alter von 52 Jahren an einem Aortenaneurysma verstorben. Ein weiterer dritter Bruder lehnte zwar eine molekulargenetische Untersuchung ab, war aber ebenfalls an einem Aortenaneurysma operiert worden.

Der Patient MARF# 218 und sein klinisch untersuchter Bruder sind mit einer Körperhöhe von 191 cm bzw. 186 cm eher groß und zeigten jeweils ein positives Verhältnis von Armlänge zu Körpergröße. Eine starke Tortuosität der kranialen als auch der cervikalen Arterien kam ebenfalls bei beiden Patienten vor. Der Indexpatient hatte zusätzlich eine geringgradige Skoliose und Pes planus. Faziale Auffälligkeiten wie eine milde malare Hypoplasie und Retrognathie, ein langes Gesicht und eine prominente Uvula wurden beschrieben. Eine Hodentorsions- und Leistenhernien-Operation sowie eine Appendektomie und Sigmaresektion nach akuter Divertikulitis finden sich ebenfalls in der Vorgeschichte. Sein 47-jähriger Bruder hatte eine milde Skoliose, überstreckbare Gelenke, einen hohen gotischen Gaumen und eine Retrognathie. Auch er wurde in der Vergangenheit bereits einer Leistenhernien-OP unterzogen. Der 13-jährige Neffe (und Sohn des Bruders II-4, siehe Abbildung 3.14) wies milde klinische Auffälligkeiten wie eine Skoliose, Brustkorbdeformitäten, überstreckbare Gelenke und Klumpfüße auf.

Somit reihen sich diese klinischen Merkmale gut in die bisher beschriebenen Auffälligkeiten bei Patienten mit einer *TGFB2*-Mutation ein (siehe Tabelle 4.1).

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der klinischen Auffälligkeiten von Patienten mit *TGFB2*-Mutation

klinisches Merkmal	Index-patient	Bruder	Neffe	Boileau et al. ^a	Lindsay et al. ^a	Gesamt ^a
Aortenaneurysma	+	+	na	14/19	1/4 (11)	17/25 (12) 68.0%
Aortendisektion	-	-	-	2/19	1/15	3/37 8.1%
Operation an der Aorta	+	+	-	4/19	3/15	9/37 24.3%
Tortuosität der Arterien	+	+	na	3/5 (14)	1/4 (11)	6/11 (26) 54.5%
Mitralklappenveränderungen	-	-	na	3/19	7/10 (5)	10/31 (6) 32.3%
Skoliose	+	+	+	4/15 (4)	5/15	12/33 (4) 36.4%
Brustwanddeformitäten	-	-	+	7/16 (3)	9/15	17/34 (3) 50.0%
Überbewegliche Gelenke	-	+	+	10/15 (4)	7/15	19/33 (4) 57.6%
Arachnodaktylie	-	-	na	8/13 (6)	8/15	16/30 (7) 53.3%
Fußdeformitäten	+	na	+	11/15 (4)	8/15	21/32 (5) 65.6%
Retrognathie	+	+	na	2/13 (6)	11/15	15/30 (7) 50.0%
Hoher gotischer Gaumen	-	+	na	9/15 (4)	10/15	20/32 (5) 62.5%
Gespaltene/breite Uvula	-	-	na	0/13 (6)	3/15	3/30 (7) 10.0%
nach lateral absteigende Lidachsen	na	na	na	0/13 (6)	10/15	10/28 (9) 35.7%
Linsenluxation	-	-	na	1/13 (6)	0/15	1/30 (7) 3.3%

Tabelle 4.1: Zusammenfassung der klinischen Auffälligkeiten von Patienten mit *TGFB2*-Mutation – Fortsetzung

klinisches Merkmal	Index-patient	Bruder	Neffe	Boileau et al. ^a	Lindsay et al. ^a	Gesamt ^a
Striae atrophicae	–	–	na	8/15 (4)	3/15	11/32 (5) 34.4%
Hernien	+	+	na	6/17 (2)	10/15	18/34 (3) 52.9%
Leichte Verletzbarkeit der Haut	–	–	na	(19)	5/11 (4)	5/13 (24) 38.5%
Duraektasie	–	–	na	3/5 (14)	1/6 (9)	4/13 (24) 30.8%

Die Tabelle fasst die wichtigsten klinischen Merkmale der bisher beschriebenen Patienten mit *TGFB2*-Mutation zusammen.

^a, Merkmal vorhanden/Anzahl klinisch beurteilter Patienten (Anzahl der Patienten ohne Daten);

+, Merkmal vorhanden; –, Merkmal nicht vorhanden; na, nicht analysiert.

Die beiden häufigsten klinischen Merkmale, Aortenaneurysmen und arterielle Tortuosität, kamen sowohl bei dem Indexpatienten als auch bei seinem klinisch untersuchten Bruder vor. Der Neffe war zum Untersuchungszeitpunkt noch sehr jung, sodass ein mögliches Aortenaneurysma noch nicht vorhanden war. Weitere Symptome wie Fußdeformitäten, Skoliose, Retrognathie und Hernien kamen ebenfalls sowohl bei den in dieser Arbeit untersuchten Patienten als auch bei den in der Literatur beschriebenen Patienten häufig vor. Eine Arachnodaktylie wurde ebenfalls häufig beschrieben, kam allerdings bei keinem der hier untersuchten Patienten vor. Weitere Auffälligkeiten wie Brustwanddeformitäten, überbewegliche Gelenke und ein hoher gotischer Gaumen kamen bei einzelnen der hier untersuchten Patienten vor, allerdings nicht bei allen. Eine Linsluxation zeigte sich weder bei den hier untersuchten Patienten noch in der Literatur. Insgesamt gesehen zeigen die hier untersuchten Patienten somit ein klinisches Bild, das sehr ähnlich zu dem der bereits in der Literatur beschriebenen Patienten ist (Boileau et al. 2012, Lindsay et al. 2012).

Der Phänotyp, der mit *TGFB2*-Mutationen einhergeht, lässt sich somit zwischen dem des Marfan- und des Loeys-Dietz-Syndroms einordnen, zeigt jedoch insgesamt gesehen mehr Überschneidungen mit dem Loeys-Dietz-Syndrom (siehe Tabelle 4.2).

Tabelle 4.2: Vergleich der klinischen Auffälligkeiten bei Patienten mit Marfan-Syndrom (*FBN1*-Mutation), Loeys-Dietz-Syndrom (*TGFBR1/TGFBR2*-Mutation) oder *TGFB2*-Mutation

klinisches Merkmal	Marfan-Syndrom	Loeys-Dietz Syndrom	<i>TGFB2</i> -Mutation
Linsluxation	+++	–	–
Gespaltene Uvula	–	++	+
Hypertelorismus	–	++	+
Hochwuchs	+++	+	++
Arachnodaktylie	+++	+	++
Überbewegliche Gelenke	+++	+	++
Brustwanddeformitäten	++	++	++
Klumpfüße	–	++	++
Aortenwurzelaneurysmen	++	++	++
frühe Aortendissektionen	+	+++	+
andere Aneurysmen	+	++	+
Arterielle Tortuosität	–	++	++
Bikuspide Aortenklappe	–	++	+
Striae atrophicae	++	+	+
Hernien	+	+	++
Duraektasie	+	+	+

–, nicht vorhanden; +, gelegentlich; ++, häufig; +++, sehr häufig (Tabelle modifiziert nach Lindsay et al. 2012)

Insbesondere die Tortuosität der Arterien und das Fehlen einer Linsluxation (Boileau et al. (2012); beschrieben bei nur einem Patienten mit einer Art *minor ectopia lentis*, welche in den USA allerdings nicht als Linsluxation anerkannt wäre) verdeutlichen die Gemeinsamkeiten. Hernien scheinen insgesamt gesehen bei Patienten mit einer *TGFB2*-Mutation häufiger vorzukommen als bei Patienten mit einer Mutation in *FBN1* oder *TGFBR1/TGFBR2*.

In dieser Arbeit wurde bei einem von 88 Betroffenen mit Bindegewebserkrankungen aus dem Formenkreis des Marfan-Syndroms eine Mutation in *TGFB2* entdeckt. Dies entspricht einer Häufigkeit von 1,1%. Boileau et al. (2012) beschrieben in ihrer Veröffentlichung eine ähnliche Häufigkeit von 1% (4 von 409 untersuchten Patienten). Lindsay et al. (2012) fanden dagegen eine deutlich höhere Frequenz von Mutationen in *TGFB2* von 7% (6 von 86 untersuchten Patienten). Dies mag daran liegen, dass Lindsay et al. (2012) eine phänotypisch weiter auf der Loeys-Dietz-Syndrom eingegrenzte Gruppe von Patienten

untersucht hatten – auch dies ist ein weiterer Hinweis auf die klinischen Gemeinsamkeiten der *TGFB2*-Mutationsträger mit dem Loeys-Dietz-Syndrom.

Insgesamt gesehen ist *TGFB2* im Vergleich zu *FBN1*, *TGFBR1* und *TGFBR2* eher selten mutiert. Komplette Deletionen oder Duplikationen dieses Gens erscheinen zum jetzigen Zeitpunkt noch seltener. So sind bisher nur zwei Patienten mit einer Deletion des gesamten Gens und gleichzeitig vorliegender milder Entwicklungsverzögerung beschrieben (Lindsay et al. 2012). Weitere Kopienzahlanalysen könnten in Zukunft allerdings weitere Fälle aufdecken und das Spektrum somit erweitern. Eine spezifische Analyse des *TGFB2*-Gens erscheint insbesondere dann sinnvoll, wenn eine arterielle Tortuosität in Verbindung mit einem Aortenaneurysma und früheren Hernien-Operationen oder anderen, für das Loeys-Dietz-Syndrom nicht ganz so typischen Auffälligkeiten wie Hochwuchs, Arachnodaktylie oder überbeweglichen Gelenken, vorkommt.

Unklar verbleibt die genetische Ursache vieler Patienten mit klinischem Verdacht auf das Marfan- oder Loeys-Dietz-Syndrom auch weiterhin. Von den in dieser Arbeit untersuchten 88 Patienten konnte nur bei einem Patienten eine Mutation in *TGFB2* festgestellt werden. Dies hinterlässt 87 Patienten, bei denen auch bereits *FBN1*, *TGFBR1* und *TGFBR2* als Krankheitsgen ausgeschlossen wurde. Die Existenz weiterer Krankheitsgene, die ursächlich für einen Phänotyp des Marfan- oder Loeys-Dietz-Spektrums sein könnten, erscheint daher wahrscheinlich.

Mutationen in Genen des TGF- β -Signalweges wären daher denkbar. So wurden Mutationen in *SMAD3* bereits als ursächlich für das Aneurysmen-Osteoarthritis-Syndrom beschrieben (van de Laar et al. 2011). Dies geht neben frühen Aortendissektionen mit einer starken Gewundenheit der Arterien und früh auftretender Osteoarthritis einher (van de Laar et al. 2011). Ursächliche Mutationen in *SMAD2* oder *MADHIP* (kodiert für SARA [*SMAD anchor for receptor activation*]) sind bisher nicht bekannt. So wird *SMAD2* zwar derzeit mit kolorektalen Karzinomen als mögliches Tumor-Suppressor-Gen assoziiert, ein konkreter Beweis konnte aber nicht erbracht werden (Takagi et al. 1998). SNPs in *SMAD7*, dessen Genprodukt einen hemmenden Einfluss auf die Phosphorylierung von *SMAD2* und *SMAD3* hat, werden derzeit ebenfalls mit kolorektalen Karzinomen assoziiert (Broderick et al. 2007). Mutationen in *SMAD4* sind dagegen für das Myhre-Syndrom (Kleinwuchs in Verbindung mit Brachydaktylie, dicker Haut, Muskelhypertrophie, Taubheit und Intelligenzminderung) ursächlich (Le Goff et al. 2011).

Auch Mutationen in den Genen für das *latent TGF- β binding protein* (*LTBP*), *LTBP1-4*, wären als mögliche Ursache denkbar. So wurde eine Mutation in *LTBP2* als ursächlich für isolierte Mikrophakie mit Linsenluxation beschrieben, ein Symptom, das auch beim Marfan-Syndrom vorkommen kann (Kumar et al. 2010). Neun Mutationen wurden in *LTBP4* beschrieben, welche mit einer Erkrankung aus dem Cutis-Laxa-Formenkreis mit

Mikrophakie und Lungenemphysem, aber ohne arterielle Tortuosität oder Aortenaneurysma assoziiert sind (Callewaert et al. 2013). Krankheitsverursachende *LTBP1*-Mutationen sind derzeit noch nicht bekannt, *LTBP3* wurde mit Oligodontie und Kleinwuchs in Verbindung gebracht (Noor et al. 2009).

Mutationen in *TGFBI* dagegen sind mit dem Camurati-Engelmann-Syndrom (autosomal-dominante progressive Osteosklerose und generalisierte Knochenhypertrophie) assoziiert (Kinoshita et al. 2000). Allerdings sind bisher nur Mutationen in der LAP (*latency associated protein*)-Domäne des Proteins, nicht im reifen TGF- β 1-Protein, beschrieben (Kinoshita et al. 2004). Dies wäre eine weitere Möglichkeit für pathogene Mutationen in Verbindung mit dem Marfan- oder Loeys-Dietz-Syndrom. Insbesondere daher, da auch Veränderungen im TGF- β 1-Spiegel bei Mutationen in *TGFBI* angenommen werden (Lindsay et al. 2013). 2013 berichteten Rienhoff et al. über eine Mutation [c.1226G>A (p.Cys409Tyr)] in *TGFBI* bei einem 9-jährigen Mädchen mit Kontrakturen der Finger- und Zehengelenke, muskulärer Hypotonie, gespaltener Uvula, Plattfüßen, Trichterbrust und leichter Retrognathie, aber ohne vaskuläre Beteiligung (Rienhoff et al. 2013). Transfizierte HeLa-Zellen zeigten dort ebenfalls einen nicht aktivierten TGF- β -Signalweg (Rienhoff et al. 2013). Auch hier zeigten sich teilweise Überschneidungen mit dem Marfan- und Loeys-Dietz-Syndrom. Eine erst im Erwachsenenalter manifeste Beteiligung der Arterien konnte zu dem Untersuchungszeitpunkt nicht ausgeschlossen werden.

Somit sind noch einige Kandidatengene des TGF- β -Signalweges vorhanden, in denen möglicherweise pathogene Mutationen bei den bisher mutationsnegativen Patienten gefunden werden könnten. Die neuen Hochdurchsatz-Sequenzieretechnologien werden zukünftig helfen, Sequenzveränderungen in sehr selten mutierten Genen bei den Patienten aufzudecken (Coonrod et al. 2013).

5 Zusammenfassung

Die Aufdeckung neuer monogener Krankheitsgene spielt in der Humangenetik schon seit Jahren eine bedeutende Rolle. Darüber hinaus ist auch die Charakterisierung des mit einem Krankheitsgen assoziierten phänotypischen Spektrums von großer Bedeutung, um die Betroffenen klinisch und auch humangenetisch optimal zu betreuen und zu versorgen. Durch die Bruchpunktkartierung bei zwei Patienten mit balanciert erscheinenden Chromosomentranslokationen wurden im Rahmen von Vorarbeiten die beiden Gene *CATSPER3* und *SALL3* als Kandidatengene für Intelligenzminderung identifiziert. Mittels Mutationsanalyse dieser Gene bei 150 Patienten mit nicht-syndromaler Intelligenzminderung sollten im Rahmen dieser Arbeit Sequenzveränderungen aufgedeckt werden, um eins oder beide Gene als Krankheitsgen zu bestätigen.

CATSPER3 kodiert für einen spannungsgesteuerten Calciumkanal, der besonders stark im Cortex, Hippocampus, Hypothalamus und Cerebellum exprimiert ist. Durch die DNA-Sequenzanalyse des *CATSPER3*-Gens bei 150 Patienten mit Intelligenzminderung wurden 15 verschiedene Sequenzvarianten, die alle bereits bei gesunden Personen gefunden worden waren und damit als *single nucleotide polymorphisms* (SNPs) in den Datenbanken gelistet sind, aufgedeckt. Interessant war, dass die Variante c.581T>G (p.L194W) in der Datenbank *Ensembl* mit einer Allelfrequenz von nur 3/17553 (0,017%) gelistet ist. Weitere Analysen dieser Variante mittels *in silico* Vorhersage-Programmen ergaben eine hohe Wahrscheinlichkeit für eine krankheitsverursachende Mutation. Auch die Tatsache, dass die betroffene Aminosäure Leucin 194 evolutionär hoch konserviert und in der porenformenden Membrandomäne von *CATSPER3* lokalisiert ist, deuten auf eine Krankheitsursächlichkeit der Missense-Variante c.581T>G (p.L194W) hin. Die Befunde, dass der damals untersuchte Translokationspatient die Chromosomenveränderung von seiner Mutter geerbt hat und es auch gesunde Träger der *CATSPER3*-Variante c.581T>G (p.L194W) gibt, könnte auf eine unvollständige Penetranz in Zusammenhang mit einer oligogenen Vererbung hinweisen. So sind mit Autismus assoziierte Mutationen in anderen Genen, die ebenfalls für Calciumkanalproteine kodieren, bereits bekannt.

Das zweite Kandidatengen, *SALL3*, kodiert für ein Zinkfingerprotein, welches als Transkriptionsfaktor wirkt und somit wahrscheinlich an der Regulation des Zellzyklus bzw. der Zelladhäsion beteiligt ist. Durch *SALL3*-Sequenzanalyse bei 150 Patienten mit Intelligenzminderung fanden sich 20 Sequenzvarianten, von denen drei bisher nicht in den gängigen Datenbanken bekannt sind. Die Missense-Variante c.883C>T (p.P295S) wurde bei sieben und die Missense-Variante c.2888G>A (p.S963N) bei einem Patienten in heterozygotem Zustand identifiziert. *In silico*-Analysen ergaben allerdings keinen konkreten Hinweis auf eine Pathogenität der beiden Aminosäureaustausche. Diese beiden Varianten

und drei weitere stille Mutationen, die bisher nicht beschriebene Variante c.3507C>T sowie die zwei Varianten c.1507C>T und c.2499G>A mit einer sehr niedrigen Allelfrequenz von weit <1%, wurden einer *in silico* Spleißstellen-Analyse unterzogen. Diese erbrachte keinen Hinweis auf eine Änderung der Wildtyp-Spleißstellen oder das Auftreten neuer Spleißstellen. Damit ließ sich *SALL3* bisher nicht als Krankheitsgen für Intelligenzminde- rung bestätigen.

Im zweiten Teil der Arbeit wurde *TGFB2*, welches kürzlich als Krankheitsgen für eine zum Marfan- bzw. Loeys-Dietz-Syndrom ähnliche Bindegewebserkrankung entdeckt wurde, in einer Patientenkohorte mit einer Krankheit aus diesem phänotypischen Spektrum untersucht. Das Marfan- und Loeys-Dietz-Syndrom gehen mit einer allgemeinen Bindegewebsschwäche und frühen Aortenaneurysmen und/oder -dissektionen einher. Zusätzlich zeigen sich skelettale Auffälligkeiten wie Hochwuchs und Brustwanddeformitäten sowie faziale Dysmorphien. Durch die Sequenzanalyse des *TGFB2*-Gens und die Kopienzahl- analyse von zwei ausgewählten *TGFB2*-Exons durch quantitative Real-Time PCR bei 88 Patienten fand sich bei einem Betroffenen die bisher unbekannte heterozygote 1 bp- Duplikation c.1165dupA. Es handelt sich hierbei um eine Frameshift-Mutation, die zum Auftreten eines vorzeitigen Stopp-Codons führt (p.S389Kfs*8) und damit höchstwahrscheinlich krankheitsverursachend ist. Diese Mutation konnte ebenfalls bei dem erkrankten Bruder und dem betroffenen Neffen des Indexpatienten nachgewiesen werden. Sowohl der Bruder als auch der Indexpatient waren bereits an einem Aortenaneurysma operiert worden und zeigten im MRT eine starke Tortuosität der cervikalen und kranialen Arterien. Weitere klinische Auffälligkeiten wie Hochwuchs, ein positives Verhältnis von Armlänge zu Körpergröße und Leistenhernien reihen sich gut in das bisher beschriebene Krankheits- bild, das mit *TGFB2*-Mutationen einhergeht, ein. Insgesamt gesehen ähnelt der Phänotyp eher dem Loeys-Dietz-Syndrom als dem Marfan-Syndrom, zeigt aber Überschneidungen mit beiden Krankheitsbildern. Eine Analyse des *TGFB2*-Gens erscheint daher v. a. bei arterieller Tortuosität in Verbindung mit einem Aortenaneurysma, früheren Hernien und skelettalen Auffälligkeiten sinnvoll.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
Array-CGH	<i>Array-comparative genomic hybridization</i>
bp	Basenpaare (<i>base pair(s)</i>)
C	Cytosin
c.	Nukleotidposition in der Kodierregion eines Gens (<i>coding sequence</i>)
CTGF	<i>connective tissue growth factor</i>
CNV	Veränderungen der Kopienzahl (<i>copy number variation</i>)
Ct	<i>cycle threshold</i>
ddNTPs	Didesoxyribonukleosidtriphosphate
dNTPs	Desoxyribonukleosidtriphosphate
dup	Duplikation
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure (<i>ethylenediaminetetraacetic acid</i>)
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
fwd	forwärts (<i>forward</i>)
G	Guanin
HCNE	hochkonservierte nicht-kodierende Elemente (<i>highly conserved non-coding elements</i>)
HPLC	Hochleistungsflüssigkeitschromatographie (<i>high performance liquid chromatography</i>)
LAP	<i>latency associated protein</i>
LTBP	<i>latent TGF-β binding protein</i>
OD	Optische Dichte
p.	Aminosäureposition im Protein
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i>)
qPCR	quantitative Real-Time PCR
rev	rückwärts (<i>reverse</i>)
SD	Standardabweichung (<i>standard deviation</i>)
SARA	<i>Smad anchor for receptor activation</i>
T	Thymin
TAAD	thorakales Aortenaneurysma oder -dissektion
TBE	Tris-Borat-EDTA
TD	<i>touch down</i>
TE	Tris-EDTA
TGF- β	<i>transforming growth factor-beta</i>

Literaturverzeichnis

Baralle D, Baralle M (2005) Splicing in action: assessing disease causing sequence changes. *J Med Genet.* 42(10):737-48.

Beridze N, Frishman WH (2012) Vascular Ehlers-Danlos syndrome: pathophysiology, diagnosis, and prevention and treatment of its complications. *Cardiol Rev.* 2012 Jan-Feb;20(1):4-7.

Boileau C, Guo DC, Hanna N, Regalado ES, Detaint D, Gong L, Varret M, Prakash SK, Li AH, d'Indy H, Braverman AC, Grandchamp B, Kwartler CS, Gouya L, Santos-Cortez RL, Abifadel M, Leal SM, Muti C, Shendure J, Gross MS, Rieder MJ, Vahanian A, Nickerson DA, Michel JB, National Heart, Lung, and Blood Institute (NHLBI) Go Exome Sequencing Project, Jondeau G, Milewicz DM (2012) TGFB2 mutations cause familial thoracic aortic aneurysms and dissections associated with mild systemic features of Marfan syndrome. *Nat Genet.* 44(8):916-21.

Booms P, Tiecke F, Rosenberg T, Hagemeyer C, Robinson PN (2000) Differential effect of FBN1 mutations on in vitro proteolysis of recombinant fibrillin-1 fragments. *Hum Genet.* 107(3):216-24.

Broderick P, Carvajal-Carmona L, Pittman AM, Webb E, Howarth K, Rowan A, Lubbe S, Spain S, Sullivan K, Fielding S, Jaeger E, Vijayakrishnan J, Kemp Z, Gorman M, Chandler I, Papaemmanuil E, Penegar S, Wood W, Sellick G, Qureshi M, Teixeira A, Domingo E, Barclay E, Martin L, Sieber O; CORGI Consortium, Kerr D, Gray R, Peto J, Cazier JB, Tomlinson I, Houlston RS (2007) A genome-wide association study shows that common alleles of SMAD7 influence colorectal cancer risk. *Nat Genet.* 39(11):1315-7.

Burks TN, Cohn RD (2011) Role of TGF- β signaling in inherited and acquired myopathies. *Skelet Muscle.* 1(1):19.

Callewaert B, Su CT, Van Damme T, Vlummens P, Malfait F, Vanakker O, Schulz B, Mac Neal M, Davis EC, Lee JG, Salhi A, Unger S, Heimdal K, De Almeida S, Kornak U, Gaspar H, Bresson JL, Prescott K, Gosendi ME, Mansour S, Piérard GE, Madan-Khetarpal S, Sciurba FC, Symoens S, Coucke PJ, Van Maldergem L, Urban Z, De Paepe A (2013) Comprehensive clinical and molecular analysis of 12 families with type 1 recessive cutis laxa. *Hum Mutat.* 34(1):111-21.

Camp E, Hope R, Kortschak RD, Cox TC, Lardelli M (2003) Expression of three spalt (sal) gene homologues in zebrafish embryos. *Dev Genes Evol.* 213(1):35-43.

Chelly J, Khelifaoui M, Francis F, Cherif B, Bienvenu T (2006) Genetics and pathophysiology of mental retardation. *Eur J Hum Genet* 14(6): 701-713.

Chilian B (2012) Molekularzytogenetische Eingrenzung der Bruchpunkte von sieben krankheitsassoziierten chromosomalen Rearrangements. Med. Dissertation. Universität Hamburg.

- Coonrod EM, Durtschi JD, Margraf RL, Voelkerding KV** (2013) Developing genome and exome sequencing for candidate gene identification in inherited disorders: an integrated technical and bioinformatics approach. *Arch Pathol Lab Med.* 137(3):415-33.
- Dean JC** (2007) Marfan syndrome: clinical diagnosis and management. *Eur J Hum Genet.* 15(7):724-33
- Delange F** (2000) The role of iodine in brain development. *Proc Nutr Soc.* 59(1):75-9.
- De Paepe A, Devereux RB, Dietz HC, Hennekam RC, Pyeritz RE** (1996) Revised diagnostic criteria for the Marfan syndrome. *Am J Med Genet.* 24;62(4):417-26.
- Desmet FO, Hamroun D, Lalande M, Collod-Bérout G, Claustres M, Bérout C** (2009) Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. *Nucleic Acids Res.* 37(9):e67.
- Dieckmann C, Von Kodolitsch Y, Rybczynski M, Adam G** (2003) Marfan syndrome: pathogenesis, phenotypes and diagnostic value, of various imaging techniques. *Rofo.* 175(11):1482-9.
- Dietz HC, Cutting GR, Pyeritz RE, Maslen CL, Sakai LY, Corson GM, Puffenberger EG, Hamosh A, Nanthakumar EJ, Curristin SM, et al** (1991) Marfan syndrome caused by a recurrent de novo missense mutation in the fibrillin gene. *Nature.* 352(6333):337-9.
- Dietz HC** (2011) Marfan Syndrome. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., (Hrsg.) *GeneReviews™*[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1335/> [Stand: 14.10.2014, 17:19]
- Dilling H, World Health Organization.** (2011) Internationale Klassifikation psychischer Störungen : ICD-10 Kapitel V (F); klinisch-diagnostische Leitlinien. Huber, Bern.
- Ellison JW, Rosenfeld JA, Shaffer LG** (2013) Genetic basis of intellectual disability. *Annu Rev Med.* 64:441-50.
- Endele S, Rosenberger G, Geider K, Popp B, Tamer C, Stefanova I, Milh M, Kortüm F, Fritsch A, Pientka FK, Hellenbroich Y, Kalscheuer VM, Kohlhasse J, Moog U, Rappold G, Rauch A, Ropers HH, von Spiczak S, Tönnies H, Villeneuve N, Villard L, Zabel B, Zenker M, Laube B, Reis A, Wieczorek D, Van Maldergem L, Kutsche K** (2010) Mutations in GRIN2A and GRIN2B encoding regulatory subunits of NMDA receptors cause variable neurodevelopmental phenotypes. *Nat Genet.* 42(11):1021-6.
- Erkula G, Sponseller PD, Paulsen LC, Oswald GL, Loeys BL, Dietz HC** (2010) Musculoskeletal findings of Loeys-Dietz syndrome. *J Bone Joint Surg Am.* 92(9):1876-83.
- Faivre L, Masurel-Paulet A, Collod-Bérout G, Callewaert BL, Child AH, Stheuner C, Binquet C, Gautier E, Chevallier B, Huet F, Loeys BL, Arbustini E, Mayer K, Arslan-Kirchner M, Kiotsekoglou A, Comeglio P, Grasso M, Halliday DJ, Bérout C, Bonithon-Kopp C, Claustres M, Robinson PN, Adès L, De Backer J, Coucke P, Francke U, De Paepe A, Boileau C, Jondeau G** (2009) Clinical and molecular study of 320 children with Marfan syndrome and related type I fibrillinopathies in a series of 1009 probands with pathogenic FBN1 mutations. *Pediatrics.* 123(1):391-8.

- Finkbohner R, Johnston D, Crawford ES, Coselli J, Milewicz DM** (1995) Marfan syndrome. Long-term survival and complications after aortic aneurysm repair. *Circulation*. 91(3):728-33.
- Garg V, Muth AN, Ransom JF, Schluterman MK, Barnes R, King IN, Grossfeld PD, Srivastava D** (2005) Mutations in NOTCH1 cause aortic valve disease. *Nature*. 437(7056):270-4.
- Girirajan S, Rosenfeld JA, Cooper GM, Antonacci F, Siswara P, Itsara A, Vives L, Walsh T, McCarthy SE, Baker C, Mefford HC, Kidd JM, Browning SR, Browning BL, Dickel DE, Levy DL, Ballif BC, Platky K, Farber DM, Gowans GC, Wetherbee JJ, Asamoah A, Weaver DD, Mark PR, Dickerson J, Garg BP, Ellingwood SA, Smith R, Banks VC, Smith W, McDonald MT, Hoo JJ, French BN, Hudson C, Johnson JP, Ozmore JR, Moeschler JB, Surti U, Escobar LF, El-Khechen D, Gorski JL, Kussmann J, Salbert B, Lacassie Y, Biser A, McDonald-McGinn DM, Zackai EH, Deardorff MA, Shaikh TH, Haan E, Friend KL, Fichera M, Romano C, Géczi J, DeLisi LE, Sebat J, King MC, Shaffer LG, Eichler EE** (2010) A recurrent 16p12.1 microdeletion supports a two-hit model for severe developmental delay. *Nat Genet*. 42(3):203-9.
- Gott VL** (1998) Antoine Marfan and his syndrome: one hundred years later. *Md Med J*. 47(5):247-52.
- Gray JR, Bridges AB, West RR, McLeish L, Stuart AG, Dean JC, Porteous ME, Boxer M, Davies SJ** (1998) Life expectancy in British Marfan syndrome populations. *Clin Genet*. 54(2):124-8.
- Guo DC, Regalado E, Casteel DE, Santos-Cortez RL, Gong L, Kim JJ, Dyack S, Horne SG, Chang G, Jondeau G, Boileau C, Coselli JS, Li Z, Leal SM, Shendure J, Rieder MJ, Bamshad MJ, Nickerson DA; GenTAC Registry Consortium; National Heart, Lung, and Blood Institute Grand Opportunity Exome Sequencing Project, Kim C, Milewicz DM** (2013) Recurrent Gain-of-Function Mutation in PRKG1 Causes Thoracic Aortic Aneurysms and Acute Aortic Dissections. *Am J Hum Genet*. 93(2):398-404.
- Hayashi H, Sakai T** (2012) Biological Significance of Local TGF- β Activation in Liver Diseases. *Front Physiol*. 3:12.
- Jondeau G, Michel JB, Boileau C** (2011) The translational science of Marfan syndrome. *Heart*. 97(15):1206-14.
- Kalra VB, Gilbert JW, Malhotra A** (2011) Loeys-Dietz syndrome: cardiovascular, neuroradiological and musculoskeletal imaging findings. *Pediatr Radiol*. 41(12):1495-504.
- Kim CW, Tak HM, Kim GT, Mun YJ, Jeon BT, Kim HJ, Roh GS, Han J, Kang D** (2010) H₂O₂-induced up-regulation of CatSper3 in mouse brain. *Mol Reprod Dev*. 77(8):650.

Kinoshita A, Saito T, Tomita H, Makita Y, Yoshida K, Ghadami M, Yamada K, Kondo S, Ikegawa S, Nishimura G, Fukushima Y, Nakagomi T, Saito H, Sugimoto T, Kamegaya M, Hisa K, Murray JC, Taniguchi N, Niikawa N, Yoshiura K (2000) Domain-specific mutations in TGFB1 result in Camurati-Engelmann disease. *Nat Genet.* 26(1):19-20.

Kinoshita A, Fukumaki Y, Shirahama S, Miyahara A, Nishimura G, Haga N, Namba A, Ueda H, Hayashi H, Ikegawa S, Seidel J, Niikawa N, Yoshiura K (2004) TGFB1 mutations in four new families with Camurati-Engelmann disease: confirmation of independently arising LAP-domain-specific mutations. *Am J Med Genet A.* 127A(1):104-7.

Kumar A, Duvvari MR, Prabhakaran VC, Shetty JS, Murthy GJ, Blanton SH (2010) A homozygous mutation in LTBP2 causes isolated microspherophakia. *Hum Genet.* 128(4):365-71.

Larizza D, Maraschio P, Maghnie M, Sampaolo P (1993) Hypogonadism in a patient with balanced X/18 translocation and pituitary hormone deficiency. *Eur J Pediatr.* 152(5):424-7.

Le Goff C, Mahaut C, Abhyankar A, Le Goff W, Serre V, Afenjar A, Destrée A, di Rocco M, Héron D, Jacquemont S, Marlin S, Simon M, Tolmie J, Verloes A, Casanova JL, Munnich A, Cormier-Daire V (2011) Mutations at a single codon in Mad homology 2 domain of SMAD4 cause Myhre syndrome. *Nat Genet.* 44(1):85-8.

Leutermann R, Sheikhzadeh S, Brockstädt L, Rybczynski M, van Rahden V, Kutsche K, von Kodolitsch Y, Rosenberger G (2014) A 1-bp duplication in TGFB2 in three family members with a syndromic form of thoracic aortic aneurysm. *Eur J Hum Genet.* 22(7):944-8.

Liehr T (2009) *Fluorescence In Situ Hybridization (FISH) - Application Guide.* Springer Berlin Heidelberg, Berlin.

Lindsay ME, Schepers D, Bolar NA, Doyle JJ, Gallo E, Fert-Bober J, Kempers MJ, Fishman EK, Chen Y, Myers L, Bjeda D, Oswald G, Elias AF, Levy HP, Anderlid BM, Yang MH, Bongers EM, Timmermans J, Braverman AC, Canham N, Mortier GR, Brunner HG, Byers PH, Van Eyk J, Van Laer L, Dietz HC, Loeys BL (2012) Loss-of-function mutations in TGFB2 cause a syndromic presentation of thoracic aortic aneurysm. *Nat Genet.* 44(8):922-7.

Livak KJ, Schmittgen TD (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ Method. *Methods.* 25(4):402-8.

Lobley A, Pierron V, Reynolds L, Allen L, Michalovich D (2003) Identification of human and mouse CatSper3 and CatSper4 genes: characterisation of a common interaction domain and evidence for expression in testis. *Reprod Biol Endocrinol.* 1:53.

Loeys BL, Chen J, Neptune ER, Judge DP, Podowski M, Holm T, Meyers J, Leitch CC, Katsanis N, Sharifi N, Xu FL, Myers LA, Spevak PJ, Cameron DE, De Backer J, Hellemans J, Chen Y, Davis EC, Webb CL, Kress W, Coucke P, Rifkin DB, De Paepe AM, Dietz HC (2005) A syndrome of altered cardiovascular, craniofacial, neurocognitive and skeletal development caused by mutations in TGFBR1 or TGFBR2. *Nat Genet.* 37(3):275-81.

Loeys BL, Schwarze U, Holm T, Callewaert BL, Thomas GH, Pannu H, De Backer JF, Oswald GL, Symoens S, Manouvrier S, Roberts AE, Faravelli F, Greco MA, Pyeritz RE, Milewicz DM, Coucke PJ, Cameron DE, Braverman AC, Byers PH, De Paepe AM, Dietz HC (2006) Aneurysm syndromes caused by mutations in the TGF-beta receptor. *N Engl J Med.* 355(8):788-98.

Lu AT, Dai X, Martinez-Agosto JA, Cantor RM (2012) Support for calcium channel gene defects in autism spectrum disorders. *Mol Autism.* 3(1):18.

Mátyás G, Alonso S, Patrignani A, Marti M, Arnold E, Magyar I, Henggeler C, Carrel T, Steinmann B, Berger W (2007) Large genomic fibrillin-1 (FBN1) gene deletions provide evidence for true haploinsufficiency in Marfan syndrome. *Hum Genet.* 122(1):23-32.

Milewicz DM (1994) Identification of defects in the fibrillin gene and protein in individuals with the Marfan syndrome and related disorders. *Tex Heart Inst J.* 21(1):22-9.

Milewicz DM, Regalado E. (2012) Thoracic Aortic Aneurysms and Aortic Dissections. In: Pagon RA, Adam MP, Bird TD, et al., (Hrsg.) *GeneReviews*TM[Internet]. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1120/> [Stand: 14.10.2014, 17:24]

Mommertz G, Sigala F, Langer S, Koepfel TA, Mess WH, Schurink GW, Jacobs MJ (2008) Thoracoabdominal aortic aneurysm repair in patients with marfan syndrome. *Eur J Vasc Endovasc Surg.* 35(2):181-6.

Nataatmadja M, West J, West M (2006) Overexpression of transforming growth factor-beta is associated with increased hyaluronan content and impairment of repair in Marfan syndrome aortic aneurysm. *Circulation.* 114(1 Suppl):I371-7.

Noor A, Windpassinger C, Vitcu I, Orlic M, Rafiq MA, Khalid M, Malik MN, Ayub M, Alman B, Vincent JB (2009) Oligodontia is caused by mutation in LTBP3, the gene encoding latent TGF-beta binding protein 3. *Am J Hum Genet.* 84(4):519-23.

Okadome T, Yamashita H, Franzén P, Morén A, Heldin CH, Miyazono K (1994) Distinct roles of the intracellular domains of transforming growth factor-beta type I and type II receptors in signal transduction. *J Biol Chem.* 269(49):30753-6.

*Online Mendelian Inheritance in Man, OMIM*TM. McKusick-Nathans Institute of Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD). URL: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/> [Stand: 12.10.2014, 12:41]

Parrish M, Ott T, Lance-Jones C, Schuetz G, Schwaeger-Nickolenko A, Monaghan AP (2004) Loss of the Sall3 gene leads to palate deficiency, abnormalities in cranial nerves, and perinatal lethality. *Mol Cell Biol.* 24(16):7102-12.

- Raymond FL** (2010) Monogenic causes of mental retardation. *Monogr Hum Genet* 18: 89-100.
- Rehder H, Fritz B** (2005) Genetic causes of mental retardation. *Wien Med Wochenschr.* 155(11-12):258-67.
- Rienhoff HY Jr, Yeo CY, Morissette R, Khrebtukova I, Melnick J, Luo S, Leng N, Kim YJ, Schroth G, Westwick J, Vogel H, McDonnell N, Hall JG, Whitman M** (2013) A mutation in *TGFB3* associated with a syndrome of low muscle mass, growth retardation, distal arthrogyrosis and clinical features overlapping with Marfan and Loeys-Dietz syndrome. *Am J Med Genet A.* 161A(8):2040-6.
- Riordan JR, Rommens JM, Kerem B, Alon N, Rozmahel R, Grzelczak Z, Zielenski J, Lok S, Plavsic N, Chou JL, Drumm ML, Iannuzzi MC, Collins FS, Tsui LC** (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science.* 245(4922):1066-73.
- Rizzolio F, Bione S, Sala C, Tribioli C, Ciccone R, Zuffardi O, di Iorgi N, Maghnie M, Toniolo D** (2008) Highly conserved non-coding sequences and the 18q critical region for short stature: a common mechanism of disease? *PLoS One.* 3(1):e1460.
- Robinson PN, Krawitz P, Mundlos S** Strategies for exome and genome sequence data analysis in disease-gene discovery projects. *Clin Genet.* 80(2):127-32.
- Roeleveld N, Zielhuis GA, Gabreëls F** (1997) The prevalence of mental retardation: a critical review of recent literature. *Dev Med Child Neurol.* 39(2):125-32.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR** (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 74(12):5463-7.
- Schaaf CP, Sabo A, Sakai Y, Crosby J, Muzny D, Hawes A, Lewis L, Akbar H, Varghese R, Boerwinkle E, Gibbs RA, Zoghbi HY** Oligogenic heterozygosity in individuals with high-functioning autism spectrum disorders. *Hum Mol Genet.* 20(17):3366-75.
- Schmunk G, Gargus JJ** (2013) Channelopathy pathogenesis in autism spectrum disorders. *Front Genet.* 2013 Nov 5;4:222.
- Sheikhzadeh S, Kusch ML, Rybczynski M, Kade C, Keyser B, Bernhardt AM, Hillebrand M, Mir TS, Fuisting B, Robinson PN, Berger J, Lorenzen V, Schmidtke J, Blankenberg S, von Kodolitsch Y** (2012) A simple clinical model to estimate the probability of Marfan syndrome. *QJM.* 105(6):527-35.
- Silva AL, Romão L** (2009) The mammalian nonsense-mediated mRNA decay pathway: to decay or not to decay! Which players make the decision? *FEBS Lett.* 583(3):499-505
- Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K, Tager-Flusberg H, Priori SG, Sanguinetti MC, Keating MT** (2004) *Ca(V)*1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell.* 119(1):19-31.
- Stein Z, Susser M, Saenger G** (1976) Mental retardation in a national population of young men in the Netherlands. II. Prevalence of mild mental retardation. *Am J Epidemiol.* 104(2):159-69.

- Stheneur C, Collod-Bérout G, Faivre L, Gouya L, Sultan G, Le Parc JM, Moura B, Attias D, Muti C, Sznajder M, Claustres M, Junien C, Baumann C, Cormier-Daire V, Rio M, Lyonnet S, Plauchu H, Lacombe D, Chevallier B, Jondeau G, Boileau C** (2008) Identification of 23 TGFBR2 and 6 TGFBR1 gene mutations and genotype-phenotype investigations in 457 patients with Marfan syndrome type I and II, Loeys-Dietz syndrome and related disorders. *Hum Mutat.* 29(11):E284-95.
- Strachan T, Read AP** (1999) *Human Molecular Genetics*, Second Edition. Garland Science, New York.
- Strathdee G, Zackai EH, Shapiro R, Kamholz J, Overhauser J** (1995) Analysis of clinical variation seen in patients with 18q terminal deletions. *Am J Med Genet.* 59(4):476-83.
- Sweetman D, Münsterberg A** (2006) The vertebrate spalt genes in development and disease. *Dev Biol.* 293(2):285-93.
- Takagi Y, Koumura H, Futamura M, Aoki S, Ymaguchi K, Kida H, Tanemura H, Shimokawa K, Saji S** (1998) Somatic alterations of the SMAD-2 gene in human colorectal cancers. *Br J Cancer.* 78(9):1152-5.
- Tommerup N** (1993) Mendelian cytogenetics. Chromosome rearrangements associated with mendelian disorders. *J Med Genet.* 30(9):713-27.
- Toro R, Konyukh M, Delorme R, Leblond C, Chaste P, Fauchereau F, Coleman M, Leboyer M, Gillberg C, Bourgeron T** (2010) Key role for gene dosage and synaptic homeostasis in autism spectrum disorders. *Trends Genet.* 26(8):363-72.
- van Bokhoven H** (2011) Genetic and epigenetic networks in intellectual disabilities. *Annu Rev Genet.* 45:81-104.
- van de Laar IM, Oldenburg RA, Pals G, Roos-Hesselink JW, de Graaf BM, Verhagen JM, Hoedemaekers YM, Willemsen R, Severijnen LA, Venselaar H, Vriend G, Pattynama PM, Collée M, Majoor-Krakauer D, Poldermans D, Frohn-Mulder IM, Micha D, Timmermans J, Hilhorst-Hofstee Y, Bierma-Zeinstra SM, Willems PJ, Kros JM, Oei EH, Oostra BA, Wessels MW, Bertoli-Avella AM** (2011) Mutations in SMAD3 cause a syndromic form of aortic aneurysms and dissections with early-onset osteoarthritis. *Nat Genet.* 43(2):121-6.
- van Hemelrijk C, Renard M, Loeys B** (2010) The Loeys-Dietz syndrome: an update for the clinician. *Curr Opin Cardiol.* 25(6):546-51.
- Vissers LE, de Ligt J, Gilissen C, Janssen I, Steehouwer M, de Vries P, van Lier B, Arts P, Wieskamp N, del Rosario M, van Bon BW, Hoischen A, de Vries BB, Brunner HG, Veltman JA** (2010) A de novo paradigm for mental retardation. *Nat Genet.* 42(12):1109-12.
- von Kodolitsch Y, Rybczynski M, Bernhardt A, Mir TS, Treede H, Dodge-Khatami A, Robinson PN, Sheikhzadeh S, Reichenspurner H, Meinertz T** (2010) Marfan syndrome and the evolving spectrum of heritable thoracic aortic disease: do we need genetics for clinical decisions? *Vasa.* 39(1):17-32.
- Vorstman JA, Ophoff RA** (2013) Genetic causes of developmental disorders. *Curr Opin Neurol.* 26(2):128-36.

Warburton D (1991) De novo balanced chromosome rearrangements and extra marker chromosomes identified at prenatal diagnosis: clinical significance and distribution of breakpoints. *Am J Hum Genet.* 49(5):995-1013.

Winnepenninckx B, Rooms L, Kooy RF (2003) Mental retardation: A review of the genetic causes. *Brit J Dev Disabil* 49(96):29-44.

World Health Organization, ebrary Inc. (2001) The world health report 2001 - mental health: new understanding, new hope. World Health Organization, Geneva.

Zheng D, Wan P, Liang J, Song T, Liu Y (2012) Comparison of clinical outcomes between iris-fixated anterior chamber intraocular lenses and scleral-fixated posterior chamber intraocular lenses in Marfan syndrome with lens subluxation. *Clin Experiment Ophthalmol.* 40(3):268-74.

Publikationen

Publikationen, die im Rahmen dieser Arbeit entstanden sind.
Wesentliche Teile wurden bereits veröffentlicht:

Leutermann R, Sheikhzadeh S, Brockstädt L, Rybczynski M, van Rahden V, Kutsche K, von Kodolitsch Y, Rosenberger G (2014) A 1-bp duplication in TGFB2 in three family members with a syndromic form of thoracic aortic aneurysm. Eur J Hum Genet. 22(7):944-8.

Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Frau Prof. Dr. Kerstin Kutsche für ihre wirklich umfangreiche und unermüdliche Betreuung sowohl während der experimentellen Arbeit als auch in der Verschriftlichung eben dieser. Vielen Dank für die zahlreichen Anregungen, Verbesserungen und die konstruktive Kritik.

Weiterhin möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. Andreas Gal für die Bereitstellung meines Arbeitsplatzes und die Ermöglichung meiner Promotion am Institut für Humangenetik bedanken.

Mein spezieller Dank gilt den Patienten und ihren Familien, ohne deren Einwilligung und Bereitschaft zur Forschung dieses Projekt nicht möglich gewesen wäre.

Ich danke Inka Jantke für die intensive und engagierte Einarbeitung in die PCR- und Sequenziertechniken. Du hattest für meine Fragen immer ein offenes Ohr. Ebenso danke ich Tatjana Bierhals für die gewissenhafte Einarbeitung in die Techniken der qPCR und die Auswertung der Daten.

Bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppen Kutsche und Rosenberger möchte ich mich für die herzliche und schnelle Aufnahme in das Team sowie die stete Unterstützung in allen Belangen bedanken. Insbesondere danke ich Jelena und Mariana für die umfangreiche Hilfe während meiner Arbeit und Julia für die motivierenden und rettenden Gespräche in den Mittagssonnenstunden.

Des Weiteren danke ich Philipp für die akribische Korrektur meiner Kreativität in der deutschen Rechtschreibung und Grammatik.

Zum Schluss möchte ich meinen Eltern Iris und Norbert danken, die mich bedingungslos in allen Dingen unterstützen und unterstützt haben, die ich je begonnen habe.

Ich danke Johannes für seine stoische Geduld, Ruhe und den liebevollen Rückhalt.

Lebenslauf

Entfällt aus datenschutzrechtlichen Gründen.

Eidesstattliche Versicherung

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

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

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

Unterschrift: