

Untersuchungen zur Rolle genetischer Veränderungen in der chromosomalen Region 11p15 bei der Entstehung des Silver-Russell-Syndroms

Von der Medizinischen Fakultät
der Rheinisch-Westfälischen Technischen Hochschule Aachen
zur Erlangung des akademischen Grades
einer Doktorin der Medizin
genehmigte Dissertation

vorgelegt von

Caitriona Obermann

aus

Craigavon (Irland)

Berichter: Herr Privatdozent
Dr.rer.nat. Thomas Eggermann

Herr Universitätsprofessor
Dr.med. Joseph Neulen

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Oktober 2006

Diese Dissertaion ist auf den Internetseiten der Hochschulbibliothek online verfügbar

1	Einleitung	1
2	Allgemeine Grundlagen	3
2.1	Klinik des Silver-Russell-Syndroms	3
2.1.1	Intrauterine Wachstumsretardierung	4
2.1.2	Postnatale Wachstumsretardierung	5
2.2	Genetik des Silver-Russell-Syndroms	5
2.2.1	Uniparentale Disomie (UPD)	6
2.2.1.1	Definition und Entstehung der uniparentalen Disomie	6
2.2.1.2	Klinische Konsequenzen einer uniparentalen Disomie	9
2.2.1.3	Uniparentale Disomie und Wachstumsretardierung	9
2.2.1.4	Uniparentale Disomie und Großwuchs	10
2.2.2	Duplikationen und Silver-Russell-Syndrom	11
2.2.2.1	Duplikationen des Bereichs 11p15	12
2.2.3	Geprägte Gene und Silver-Russell-Syndrom	12
2.2.3.1	Genomic Imprinting	13
2.2.3.2	Kandidatengene für das Silver-Russell-Syndrom auf Chromosom 11	13
2.3	Zielsetzung	15
3	Material und Methoden	17
3.1	Material	17
3.1.1	Geräte und Zubehör	17
3.1.2	Chemikalien	18
3.1.3	Oligonukleotide	18
3.1.4	Feinchemikalien und Enzyme	19
3.1.5	Übersicht der verwendeten Klone	20
3.2	Probandenkollektive	20
3.3	Statistische Analyse der Polymorphismen	21
3.4	Methoden	21
3.4.1	Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction)	21
3.4.2	Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte auf Agarosegelen	24
3.4.3	Mikrosatellitenanalyse	26
3.4.4	Fragmentanalyse mit denaturierenden Polyacrylamidgelen (PAA-Gele)	26
3.4.4.1	Detektion der Fragmente mittels Silberfärbung	28
3.4.4.2	Detektion der Fragmente mittels automatischen Sequenzierers	29
3.4.5	Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse (SSCP, Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analysis)	32
3.4.5.1	Silberfärbung von SSCP-Gelen	34
3.4.6	Sequenzierung nach Sanger	34
3.4.7	Restriktionsverdau	37
3.4.7.1	Restriktionsverdau zur Detektion von Varianten	37
3.4.7.2	Restriktionsverdau zur Untersuchung des Methylierungsstatus (Algar et al. 2000)	38
3.4.8	Bestätigung der Duplikation des Bereichs 11p15.5 mittels FISH (Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung)	41
3.4.8.1	Sondenherstellung aus BAC-Klonen (bacterial artificial chromosomes)	42
3.4.8.2	FISH	45

4	Ergebnisse	49
4.1	UPD 11	49
4.2	Duplikationen der Region 11p15	50
4.2.1	Mikrosatellitenanalyse	50
4.2.2	FISH	53
4.3	Detektion von Varianten im IGF2-Gen mittels SSCP	54
4.3.1	g.6814_6819 delAGGGC, 5'UTR (Lucassen et al. 1993)	55
4.3.2	g.1156 T>C, Intron 2 (Gaunt et al. 2001)	57
4.3.3	g.1252 T>C, Exon 3 (Lucassen et al. 1993)	58
4.3.4	g.4225 A>G, Exon 6	60
4.3.5	g.1926 C>G, 3'UTR (Gaunt et al. 2001)	61
4.4	Untersuchung des Methylierungsstatus des IGF2-Gens (Algar et al. 2000)	63
4.5	Detektion von Varianten im CDKN1C-Gen mittels Sequenzierung	65
4.5.1	Varianten im Bereich des Primerpaars A (Exon 1)	67
4.5.1.1	g. 963 G>A, 5'UTR	67
4.5.1.2	g.1144 G>A, Exon 1 (Lam et al. 1999)	68
4.5.2	Varianten im Bereich des Primerpaars C (Exon 2)	70
4.5.2.1	12 bp Deletion im PAPA-Bereich, Exon 2 (Matsuoka et al. 1996)	70
4.5.3	Varianten im Bereich des Primerpaars H (Exon 3, Intron 3, Exon 4)	72
4.5.3.1	g.2681 C>T, Exon 3	72
4.5.3.2	g.2773_2774 insG (Intron 3)	73
5	Diskussion	77
5.1	Validität der angewandten Methoden	77
5.1.1	PCR	77
5.1.2	Fragmentanalyse	77
5.1.3	SSCP	78
5.1.4	Sequenzierung	79
5.1.5	Restriktionsverdau	79
5.1.5.1	Restriktionsverdau zur Detektion von Varianten	79
5.1.5.2	Restriktionsverdau zur Untersuchung des Methylierungsstatus (nach Algar et al. 2000)	80
5.2	Maternale uniparentale Disomie des Chromosom 11	81
5.2.1	Maternale Duplikation des Bereichs 11p15	81
5.3	IGF2-Gen	83
5.4	CDKN1C-Gen	85
5.5	Ausblick	86
6	Zusammenfassung	87
7	Anhang	91
7.1	Verwendete Primer	91
7.2	PCR-Bedingungen	94
7.3	Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse	97
7.4	Genotypen der Patienten und Kontrollen	103
7.4.1	IGF2-Gen	103
7.4.2	CDKN1C-Gen	108

8	Literaturliste	111
8.1	Zitierte Publikationen	111
8.2	Eigene Publikationen	117
9	Abkürzungsverzeichnis	119
10	Danksagung	121
11	Erklärung	123
12	Lebenslauf	127

1 Einleitung

Das Silver-Russell-Syndrom (SRS) ist ein klinisch heterogenes Syndrom, welches mit prä- und postnatalem Kleinwuchs, Gesichtsdysmorphien, Klinodaktylie des fünften Fingers, skelettaler Asymmetrie und relativer Makrozephalie einhergeht. Das Syndrom tritt in den meisten Fällen sporadisch auf, in einigen Fällen ist auch eine familiäre Häufung beobachtet worden. Daher wird diskutiert, ob eine genetische Komponente an der Entstehung des SRS beteiligt ist.

Bei 10% der SRS-Patienten wird eine maternale uniparentale Disomie (UPD) des Chromosoms 7 beobachtet. Deshalb wurden bisher verschiedene Kandidatengene auf Chromosom 7, die während des prä- und postnatalen Wachstums eine Rolle spielen, auf Mutationen untersucht. Bisher konnte allerdings noch kein für das SRS verantwortliches Gen entdeckt werden. Kosaki et al. (2000) und Fisher et al. (2002) berichten von vier kleinwüchsigen Patienten, darunter auch Patienten mit SRS-Merkmalen, bei denen eine Duplikation des maternalen Bereichs 11p15.5 beobachtet wurde. Interessanterweise führt eine paternale Duplikation dieses Bereichs zum Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS), ein Syndrom, welches mit Großwuchs assoziiert ist. Daher ist es vorstellbar, dass eine Duplikation des Bereichs 11p15.5 über vermehrte oder verminderte Expression von geprägten wachstumsregulierenden Genen zu Kleinwuchs bzw. Großwuchs führt. Weiterhin wurden bei einigen Patienten mit BWS eine paternale UPD11 (pUPD11) sowie Prägungsstörungen und Mutationen der Gene IGF2 und CDKN1C, welche im Bereich 11p15.5 liegen, beobachtet. Aufgrund der Beobachtungen von Kosaki et al. (2000) und Fisher et al. (2002) sowie den Befunden beim BWS ist denkbar, dass sowohl maternale Duplikationen und UPD11 als auch Prägungsstörungen und Mutationen der beiden wachstumsregulierenden Gene IGF2 und CDKN1C an der Entstehung des SRS beteiligt sein könnten.

In der vorliegenden Arbeit wurden daher 46 Patienten mit SRS und ihre Familien auf eine maternale UPD11 (mUPD11) und eine Duplikation des maternalen 11p15.5-Bereichs mittels Mikrosatellitenanalyse untersucht. Weiterhin wurde bei 40 Patienten in den geprägten wachstumsregulierenden Genen IGF2 und CDKN1C nach Mutationen gesucht. Zusätzlich wurden in der vorliegenden Arbeit die Häufigkeiten bestimmter Varianten des IGF2-Gens, für die ein Zusammenhang mit dem Body-Maß-Index (BMI) beschrieben worden ist (Gaunt et al. 2001), im SRS-Kollektiv mit den Häufigkeiten in Kontrollkollektiven verglichen.

Weiterhin sind im Zusammenhang mit dem BWS Prägungsstörungen des IGF2-Gens beschrieben worden (Algar et al. 2002), so dass in der vorliegenden Arbeit zusätzlich das IGF2-Gen auf Veränderung des Methylierungsstatus untersucht werden sollte.

2 Allgemeine Grundlagen

2.1 Klinik des Silver-Russell-Syndroms

Silver et al. berichteten 1953 über zwei Patienten mit kongenitaler Hemihypertrophie, Kleinwuchs und erhöhten Gonadotropinwerten. Ein Jahr später beschrieben Russell et al. (1954) fünf Patienten, die unter kraniofazialen Veränderungen und schwergradigen intrauterinen Wachstumsretardierungen litten. Obwohl beide Forscher verschiedene Symptome beschrieben, liegt in den berichteten Fällen das gleiche Syndrom vor, welches später nach seinen beiden Entdeckern benannt wurde.

Das Silver-Russell-Syndrom (SRS) ist ein heterogenes Syndrom, welches durch prä- und postnatalen Kleinwuchs und kraniofaziale Dysmorphien mit relativer Makrozephalie gekennzeichnet ist (Tab.2.1). Zu den kraniofazialen Dysmorphien zählen typischer Weise eine dreieckige Gesichtsform, eine prominente Stirn sowie herabgezogene Mundwinkel und Ohranomalien. Andere Merkmale, die nur bei einigen Patienten beobachtet werden können, sind u.a. Klinodaktylie des fünften Fingers, Skelettasymmetrien und Café-au-lait-Flecken (Wollmann et al. 1995). Aufgrund der klinischen Heterogenität ist das SRS schwierig zu diagnostizieren. Zusätzlich wird das Erkennen des Syndroms durch eine Abschwächung der charakteristischen Merkmale mit zunehmendem Alter der Patienten erschwert (Escobar et al. 1978). Um die Diagnose des SRS zu erleichtern, werden die Auffälligkeiten in Hauptmerkmale und Nebenmerkmale unterteilt (Price et al. 1999; Tab.2.1). Zu den Hauptmerkmalen gehören ein geringes Geburtsgewicht (<-3 SDS), geringe Körpergröße (<-3 SDS) sowie eine dreieckige Gesichtsform. Als Nebenmerkmale werden Klinodaktylie, relative Makrozephalie, Ohranomalien sowie Skelettasymmetrien und Café-au-lait-Flecken aufgeführt (Tab. 2.1).

Klinik	Häufigkeiten der Merkmale nach Wollmann et al. 1995 (n=143)	Häufigkeiten der Merkmale nach Price et al. 1999 (n=50)
Hauptmerkmale:		
Niedriges Geburtsgewicht (<-3 SDS)	94%	94%
Kleinwuchs (<-3 SDS)	99%	86%
Dreieckige Gesichtsform	79%	>62%
Nebenmerkmale:		
Skelett- und Extremitäten-Veränderungen:		
Klinodaktylie V	68%	46%
Skelettasymmetrie	51%	34%
Brachydaktylie V	48%	-
Vier-Finger-Furche	25%	-
Kamptodaktylie	-	22%
Syndaktylie	19%	-
Kraniofaziale Dismorphien und Schädelveränderungen:		
Relative Makrozephalie	64%	70%
Ohranomalien	53%	-
Herabhängende Mundwinkel	46%	-
Zahnfehlstellungen	28%	-
Genitalien:		
Fehlbildungen	-	36%
Verfrühte Pubertät	13%	-
Haut:		
Café-au-lait-Flecken	19%	4%
Entwicklung:		
Muskuläre Hypotrophie/Hypotonie	45%	-
Motorische/neuropsychologische Verzögerung	37%	-
Piepsige Stimme	22%	-
Ernährungsschwierigkeiten	-	56%
Sprachverzögerung	-	20%

Tab. 2.1: Spektrum und Häufigkeiten der klinischen Symptome des SRS in zwei verschiedenen Studien (nach Hitchins et al. 2001)

2.1.1 Intrauterine Wachstumsretardierung

Eine intrauterine Wachstumsretardierung (IUGR) liegt definitionsgemäß vor, wenn das Gewicht und/oder die Länge des Patienten bei der Geburt unter der dritten Perzentile (Wollmann et Klingebiel, 2002) liegen. Bei den meisten Patienten mit isolierter IUGR findet in der postnatalen Phase ein Aufholwachstum statt, so dass eine durchschnittliche Endkörpergröße erreicht wird (Wollmann et al. 1995).

Bei 40% der Patienten sind umweltbedingte Faktoren, wie Erkrankungen, Unterernährung sowie Alkohol- oder Drogenabusus der Mutter (Wollmann et al. 1998; Cowell 1995), aber auch Chromosomenaberrationen sowie uniparentale Disomien im Zusammenhang mit IUGR beobachtet worden. (Lin et al. 1998). In 60% der Fälle bleiben die Gründe für eine IUGR aber ungeklärt (Lin et al. 1998).

Bei SRS-Patienten liegen das Geburtsgewicht und die -größe unterhalb der dritten Perzentile. Der Kopfumfang der Kinder liegt im unteren Normbereich (Wollmann et al. 1995). In einer Studie von Wollmann et al. (1995) wurden 386 SRS-Patienten untersucht. Jungen mit SRS hatten nach der Studie eine durchschnittliche Geburtsgröße von 43,2 cm (-4,3 SDS) und ein Geburtsgewicht von 1940 g (-3,8 SDS). Bei Mädchen lag das Geburtsgewicht bei 1897 g (-3,6 SDS) und die Größe bei 43,0 cm (-3,9 SDS).

2.1.2 Postnatale Wachstumsretardierung

Im Gegensatz zu Kindern mit isolierter IUGR zeigen SRS-Patienten in den ersten drei Lebensjahren kein Aufholwachstum. Ihre Größenentwicklung verläuft langsamer als die von normalwüchsigen Kindern, so dass das vorhandene Wachstumsdefizit weiter ausgebaut wird (Wollmann et al. 1995). Ab dem dritten Lebensjahr verläuft die Größenentwicklung parallel zu Kindern mit Normperzentilen. Der pubertäre Wachstumsschub ist im Vergleich zu normalwüchsigen Kindern verringert, so dass eine durchschnittliche Endgröße von 151,2 cm (-4,4 SDS) bei Männern und 139,7 cm (-4,8 SDS) bei Frauen erreicht wird (Wollmann et al. 1995).

2.2 Genetik des Silver-Russell-Syndroms

Das SRS ist ein genetisch heterogenes Syndrom, welches in den meisten Fällen sporadisch auftritt (Escobar et al. 1978). Duncan et al. (1990) konnten allerdings bei 19% der untersuchten Patienten eine familiäre Häufung beobachten, so dass von einer genetischen Beteiligung an der Ätiologie des SRS ausgegangen werden kann. Es wurden sowohl Fälle mit autosomal-rezessivem Erbgang (Teebi 1992), als auch mit autosomal-dominantem Erbgang beobachtet (Duncan et al. 1990). Da noch keine Vererbung des Syndroms von einem betroffenen Vater auf sein Kind beobachtet werden konnte, kommt auch eine X-chromosomale Vererbung in Frage (Duncan et al. 1990).

Vereinzelt wurden verschiedene Chromosomenaberrationen wie Trisomie 18-Mosaik (Chauvel et al. 1975), Ringbildung des Chromosom 15 (Wilson et al. 1985; Tamura et al. 1993) und

Translokationen unter Beteiligung des distalen Abschnittes des kurzen Arms von Chromosom 17 beobachtet (Ramirez-Duenas et al. 1992; Midro et al. 1993).

Diese verschiedenen Befunde sprechen für die genetische Heterogenität der Erkrankung und machen das Zusammenspiel mehrerer Gene wahrscheinlich.

In unabhängigen Studien wurde bei 7-10% der SRS-Patienten eine mUPD des Chromosoms 7 festgestellt (Kotzot et al. 1995; Eggermann et al. 1997; Preece et al. 1999).

2.2.1 Uniparentale Disomie (UPD)

2.2.1.1 Definition und Entstehung der uniparentalen Disomie

Engel entwarf 1980 aufgrund von Beobachtungen an Spontanaborten (50% zeigen chromosomale Aberrationen) die Theorie der uniparentalen Disomie. Die UPD ist durch das Vorhandensein der beiden Homologen eines Chromosomenpaares von nur einem Elternteil definiert. Dabei können entweder nur ein Chromosom eines Elternteils (Isodisomie) in doppelter Ausführung oder zwei verschiedene Chromosomen von einem Elternteil (Heterodisomie) vorliegen.

Eine UPD entsteht entweder durch Komplementbildung aneuploider Gameten, mitotischen Verlust eines überzähligen Chromosoms, mitotische Duplikation oder mitotische Teilungsstörungen nach der Verschmelzung der Gameten (Spence et al. 1988). Komplementbildung, Verlust und Duplikation entstehen durch eine Verschmelzung von ein oder zwei aneuploiden Gameten (Abb. 2.2). Aneuploide Gameten wiederum resultieren aus einer Störung der Meiose.

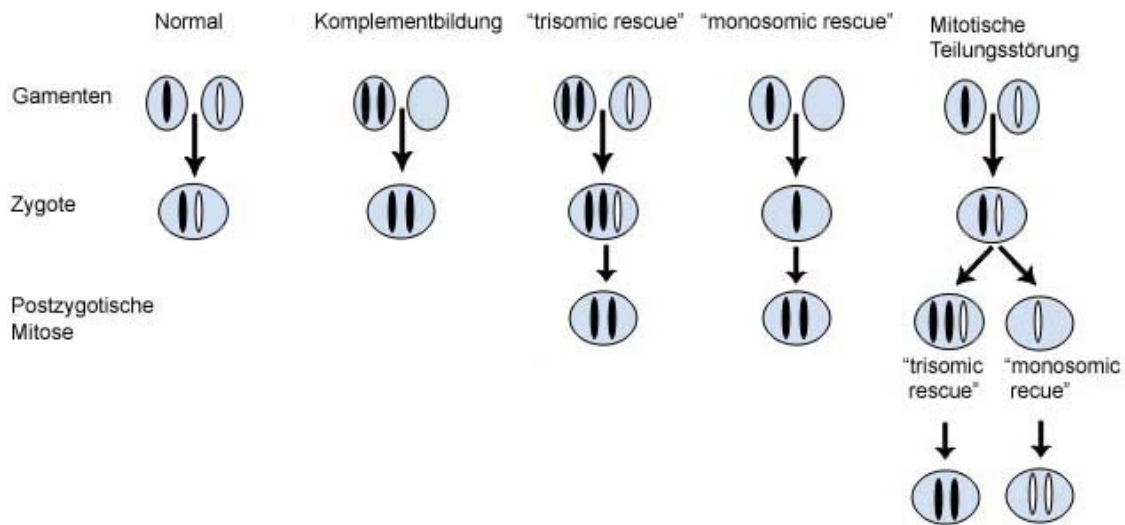


Abb. 2.2: Mögliche Entstehungsmechanismen einer UPD (angelehnt an Eggermann et al. 2002)

Bei der Komplementbildung kommt es zur Verschmelzung von nullisomen Gameten mit disomen Gameten (Spence et al. 1988). Es resultiert eine disome Zygote mit zwei Chromosomen eines Elternteils (Abb. 2.2).

Verschmilzt eine monosome Keimzelle mit einer disomen Keimzelle, so entsteht eine Trisomie (Abb. 2.2). Durch Verlust eines überzähligen Chromosoms („trisomic rescue“) entsteht eine diploide Zelle. In zwei Dritteln der Fälle entsteht eine Zelle, die ein Chromosom von beiden Elternteilen besitzt. In einem Drittel der Fälle führt „trisomic rescue“ zu einer Zelle, die über beide Chromosomen eines Elternteils verfügt (Spence et al. 1988). Die Komplementbildung und das „trisomic rescue“ können also entweder zu einer Heterodisomie oder einer Isodisomie führen.

Bei der mitotischen Duplikation dagegen können nur isodisome UPDs entstehen. Es kommt zu einer Vereinigung einer monosomen mit einer nullisomen Keimzelle (Abb. 2.2). Die daraus resultierende monosome Zygote wird durch Duplikation des vorhandenen Chromosoms („monosomic rescue“) zu einer disomen Zygote (Spence et al. 1988).

Weiterhin können Störungen der Mitose nach der Fertilisation zu einer UPD führen (Spence et al. 1988). Nondisjunktion der Chromosomen in der Mitose resultiert in einer trisomen und einer monosomen Zelle (Abb. 2.2). Durch „trisomic“ und „monosomic rescue“ entstehen zwei verschiedene Zelllinien. Die Zelllinie der monosomen Zelle weist obligat eine Isodisomie auf. Aus der trisomen Zelle entsteht entweder eine isodisome Zelllinie oder eine disome Zelllinie

mit einem Chromosom von jedem Elternteil. Wenn beide Zelllinien überleben, resultiert daraus ein Mosaik, überlebt nur eine Zelllinie, kann sowohl eine UPD als auch ein normaler Organismus entstehen.

Eine UPD kann sowohl das ganze Chromosom, als auch ein Segment betreffen (Spence et al. 1988). Eine segmentale UPD kann durch zwei verschiedene Mechanismen entstehen (Kotzot 2001):

- durch eine somatische Rekombination zweier nichthomologer Chromatiden in der Mitose (Abb. 2.3 a)
- durch eine Rekombination zweier nichthomologer Chromatiden in der Meiose mit anschließendem „crossing-over“ der nichtuniparentalen Chromatiden in der Mitose und „trisomic rescue“ der überschüssigen Chromatide (Abb. 2.3 b).

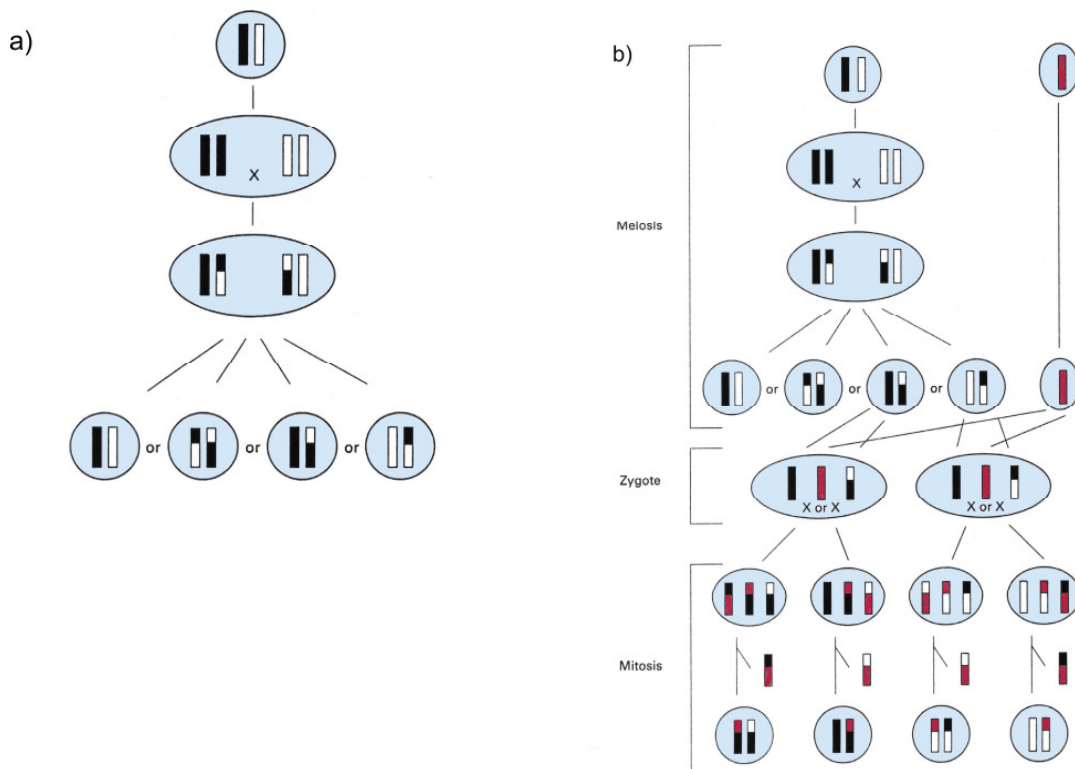


Abb. 2.3: Darstellung der Entstehung einer segmentalen UPD a) durch somatische Rekombination in der Mitose; b) durch Rekombination in der Meiose (nach Kotzot 2001)

Beim Beckwith-Wiedemann-Syndrom (BWS) (s. Kap. 2.2.1.4) scheint der erste Mechanismus für die Entstehung der partiellen UPD verantwortlich zu sein (Kotzot 2001). Bei diesem Mechanismus entsteht eine Zelllinie mit einer paternalen segmentalen UPD (pUPD) und eine Zelllinie mit einer mUPD. Kotzot (2001) postuliert, dass die Zelllinie mit der maternalen Iso-disomie abstirbt, so dass nur eine pUPD beim BWS beobachtet wird.

1-2% der menschlichen Spermien und 20% der Oozyten weisen eine Aneuploidie auf (Hassold und Hunt, 2001). Es ist daher verständlich, dass eine mUPD häufiger zu beobachten ist als eine paternale (Kotzot 1999). Die Häufigkeit einer UPD wird von Shaffer et al. (1998) mit 1,65 auf 1000 Konzeptionen angegeben und steigt mit zunehmendem Alter der Mutter. Für fast alle Chromosomen sind UPDs bekannt.

2.2.1.2 Klinische Konsequenzen einer uniparentalen Disomie

Engel ging 1980 davon aus, dass eine UPD keine phänotypischen Konsequenzen nach sich zieht, da der entstehende Organismus diploid ist.

Spence et al. beschrieben 1988 eine Patientin, die an Cystischer Fibrose (CF) litt. Eine heterozygot vorliegende Mutation auf Chromosom 7 konnte nur bei der Mutter gefunden werden. Da die CF autosomal-rezessiv vererbt wird, ließ sich die CF der Patientin auf eine mUPD7 zurückführen. Eine UPD kann somit zu einer rezessiv vererbten Erkrankung führen.

Weiterhin kann durch eine UPD das Gleichgewicht geprägter Gene verändert werden. Die Gruppe der geprägten Gene beinhaltet auch wachstumsregulierende Gene. Daher ist es nicht überraschend, dass eine UPD oft mit Wachstumsstörungen einhergeht (Kotzot 1999).

Zwei bekannte Erkrankungen, die durch eine UPD entstehen, sind das Prader-Willi- und das Angelman-Syndrom. Das Prader-Willi-Syndrom (PWS) ist durch geistige Retardierung, verringerten Muskeltonus, Kleinwuchs, emotionale Labilität und unstillbaren Appetit verbunden mit Adipositas charakterisiert (Cassidy 1997). Beim PWS liegt in 70% der Fälle eine Deletion des paternalen Bereichs 15q11-q13 vor, eine mUPD15 tritt bei 25% der Patienten auf (Nicholls et al. 1998). Das Angelman-Syndrom (AS) dagegen ist in 70% der Fälle durch eine Deletion des maternalen Bereichs 15q11-q13 verursacht, bei 2% der Patienten kann eine pUPD15 beobachtet werden (Nicholls et al. 1998). Das AS ist durch starke motorische und mentale Retardierung, unangebrachtes Lachen, fehlende Sprachentwicklung und Epilepsie gekennzeichnet.

2.2.1.3 Uniparentale Disomie und Wachstumsretardierung

Bei der 1988 von Spence et al. beschriebene Patientin mit CF wurde zusätzlich eine intrauterine und postnatale Wachstumsretardierung beobachtet, die nicht durch die CF erklärt werden konnte. Eggerding et al. beschrieben 1994 einen Patienten mit postnataler Wachstumsretardierung, der bei Geburt allerdings eine normale Körpergröße aufwies. Bei dem Patienten lag eine mUPD des kurzen 7q-Arms und eine pUPD des langen 7p-Arms vor. Da wahrscheinlich pa-

ternal exprimierte Gene für das Größenwachstum verantwortlich sind, schlossen die Autoren, dass Gene, die das intrauterine Wachstum beeinflussen, auf 7p liegen. Das postnatale Wachstum scheint dagegen durch paternal exprimierte Gene im Bereich 7q reguliert zu werden. Fehlen wie bei einer maternalen UPD die paternalen Gene, kommt es zu einer Wachstumsretardierung.

Diese Beobachtung zusammen mit dem Bericht von Spence et al. (1988) führte zu mehreren Studien, in denen SRS- und IUGR-Patienten auf eine mUPD7 untersucht wurden. In mehreren unabhängigen Studien wurde bei 7-10% der SRS-Patienten eine mUPD7 nachgewiesen (zur Übersicht Hitchins et al. 2001).

Die Hypothese, dass geprägte Gene für das SRS verantwortlich sind und nicht rezessiv vererbte Mutationen, wurde durch Preece et al. (1999) bestätigt. Die Autoren untersuchten die DNA von fünf SRS-Patienten mit Hilfe von Mikrosatellitenmarkern auf eine gemeinsame isodisome Region des Chromosoms 7. Bei den fünf untersuchten Patienten konnte keine gemeinsame Region gefunden werden, so dass eine Beteiligung rezessiver Gene an der Ätiologie der Erkrankung unwahrscheinlich ist.

Aufgrund dieser Befunde spielen geprägte Gene auf Chromosom 7 bei der Entstehung des SRS wahrscheinlich eine Rolle. Bisher konnte allerdings kein verantwortliches Gen auf Chromosom 7 gefunden werden (zur Übersicht Hitchins et al. 2001).

2.2.1.4 Uniparentale Disomie und Großwuchs

Ein anderes Syndrom, welches mit einer Wachstumsstörung einhergeht, ist das BWS. Die Patienten leiden unter prä- und postnatalem Großwuchs, Makroglossie, umbelikalischen Hernien, vergrößerten Nieren, Hemihypertrophie und einem erhöhten Tumorrisiko (Elliott und Maher, 1994).

15% der BWS-Fälle treten familiär auf, in 2% der Fälle werden zytogenetische Anomalien der 11p15.5-Region gefunden. In der Mehrzahl der Fälle tritt das Syndrom jedoch sporadisch auf (Reik et Maher, 1997; Maher et Reik, 2000). Bei den sporadisch auftretenden Fällen sind 20% mit einer segmentalen pUPD11p15.5 assoziiert (Henry et al. 1993; Slatter et al. 1994).

In der Region 11p15.5 liegt ein Cluster geprägter Gene (Abb. 2.4), darunter das IGF2- und das CDKN1C-Gen. Mutationen des CDKN1C-Gens werden bei über 40% der familiären BWS Patienten gefunden (Maher et Reik 2000), dabei ist v.a. das maternal vererbte CDKN1C-Gen betroffen (Algar et al. 2000). Bei sporadisch auftretenden Fällen wird v.a. ein Verlust der maternalen Prägung des IGF2-Gens beobachtet (Algar et al. 2000). Ebenso ist bei

sporadisch auftretenden Fällen eine fehlende genomischen Prägung eines „imprinting control elements“ beobachtet worden, welches zu einem Prägungsverlust des IGF2-Gens und einem „silencing“ von H19 führt (Reik et al. 1995, Engel et al. 2000). Ein weiterer Teil der sporadisch auftretenden BWS-Patienten besitzt eine veränderte Prägung der „differently methylated region“ (KvDMR) innerhalb des KCNQ1-Gens (Smilnich et al. 1999).

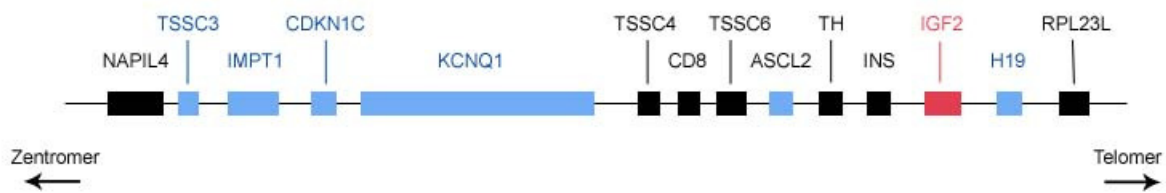


Abb. 2.4: Geprägtes Cluster im Bereich 11p15.5. Nichtgeprägte Gene sind schwarz, paternal geprägte Gene sind blau und maternal geprägte Gene sind rot dargestellt.

2.2.2 Duplikationen und Silver-Russell-Syndrom

Duplikationen eines Chromosomenabschnittes entstehen durch falsches „crossing-over“ homologer Chromosomen in der Prophase der Meiose. Dabei entstehen ein Gamet mit einer Duplikation eines chromosomalen Bereichs und ein Gamet mit einer Deletion des Bereichs. Kommt es zu einer Verschmelzung eines normalen Gameten mit einem Gameten mit dupliziertem Bereich, so entsteht ein Organismus mit einer partiellen Trisomie.

Die Charcot-Marie-Tooth Erkrankung Typ 1A ist ein bekanntes Krankheitsbild, das auf eine partielle Trisomie oder Mutationen des PMP22-Gens im Bereich 17p11.2 zurückzuführen ist. Die Erkrankung ist durch eine langsame progressive Degeneration der Muskeln v.a. der unteren Extremität gekennzeichnet.

Betrifft die Duplikation einen Bereich, der geprägte Gene enthält, so kann dies zu einer verstärkten oder abgeschwächten Expression dieser Gene führen. Bei geprägten Genen wird entweder das mütterlich vererbte oder das väterlich vererbte Allel exprimiert (s. Kap2.2.3.1). Liegt eine Duplikation des nichtgeprägten Allels vor, so führt dies zu einer verstärkten Bildung des Genprodukts. Umgekehrt führt eine Duplikation eines geprägten Gens zu dessen verminderten Expression.

Im Zusammenhang mit dem SRS sind Duplikationen chromosomaler Bereiche des Chromosoms 7 beschrieben worden (Monk et al. 2000; Joyce et al. 1999). Die untersuchten geprägten

Gene im duplizierten Bereich scheinen aber nicht für die Ätiologie des SRS-Syndroms verantwortlich zu sein (zur Übersicht Hitchins et al. 2001).

2.2.2.1 Duplikationen des Bereichs 11p15

Duplikationen des paternalen Chromosoms im Bereich 11p15.5 sind beim BWS beobachtet worden (Weksberg et al. 1990; Brown et al. 1992; Slavotinek et al. 1997). Li et al. (1998) stellten die Hypothese auf, dass geprägte Gene, die wachstumsfördernd sind, in dieser Region paternal exprimiert werden. Gene, die das Wachstum hemmen, werden dagegen maternal exprimiert. Eine Duplikation des paternalen Bereichs 11p15.5 führt demnach zu einer vermehrten Bildung wachstumsfördernder Proteine.

Kosaki et al. (2000) berichteten zum ersten Mal von einem SRS-Patienten mit einer maternalen Duplikation des Bereichs 11p15. Weiterhin publizierten Fisher et al. (2002) drei Patienten mit einer maternalen Duplikation des Bereichs 11p15. Bei diesen Patienten fiel v.a. eine Wachstumsretardierung auf. Die Duplikation des maternalen 11p15-Bereichs könnte zu einer vermehrten Bildung des Wachstuminhibitors CDKN1C (s. Kap. 2.2.3.2.2) oder zu einer verringerten Expression des wachstumsfördernden Faktors IGF2 (s. Kap. 2.2.3.2.1) führen (Fisher et al. 2002).

Das SRS könnte also das Gegensyndrom zum BWS darstellen, welches u.a. durch eine pUPD des Bereichs 11p15.5 mit vermehrter IGF2- und verringerter CDKN1C-Ausschüttung entsteht.

2.2.3 Geprägte Gene und Silver-Russell-Syndrom

Analog zu anderen durch UPD bedingten Krankheitsbildern wird eine Beteiligung geprägter Gene an der Ätiologie des SRS vermutet. Hierbei kommen zum einen Mutationen in geprägten Genen, zum anderen Veränderungen des Imprintingmusters in Frage. Von besonderem Interesse sind solche Gene, deren Genprodukte in der Wachstumsentwicklung eine Rolle spielen. In der vorliegenden Arbeit waren geprägte Gene auf Chromosom 11 von Interesse, da von einer Duplikation des Bereichs 11p15 bei IUGR und SRS berichtet worden ist (Kosaki et al. 2000; Fisher et al. 2002). Weiterhin sind im Zusammenhang mit dem BWS in geprägten Genen dieser Region Mutationen und veränderte Methylierungsmuster beobachtet worden (s. Kap. 2.2.1.4).

2.2.3.1 Genomic Imprinting

Geprägte Gene werden anders als biparental exprimierte Gene abhängig von ihrer elterlichen Herkunft exprimiert (Bartolomei et Tilghman, 1997). Das geprägte Allel ist normalerweise inaktiviert, so dass nur das nichtgeprägte Allel exprimiert werden kann. Im menschlichen Genom sind etwa 150 geprägte Gene bekannt.

Geprägte Gene werden aufgrund von gemeinsamen Regulationsmechanismen in Clustern vorgefunden (Bartolomei et Tilghman, 1997). Solche Cluster sind häufig mehrere Megabasen groß und beinhalten paternal-, maternal- und nichtgeprägte Gene (Maher et Reik 2000). Ein bekanntes Cluster geprägter Gene stellt das BWS Cluster auf Chromosom 11p15.5 dar (Abb. 2.4, S.14).

Die Mechanismen der Entstehung und der Aufrechterhaltung der Prägung sind noch nicht vollends verstanden. Die Prägung der Gene entsteht durch Methylierung der DNA während der Oogenese und Spermatogenese. Die Methylierung bleibt nach der Befruchtung in adulten somatischen Zellen erhalten, wird aber während der Gametogenese entfernt und abhängig von der elterlichen Herkunft neu gesetzt (Barlow et al. 1997).

Eine Prägung findet u.a. durch DNA-Methylierung von Cytosinresten in Promotor und CpG-Insel-Bereichen statt. CpG-Inselbereiche sind DNA-Regionen mit über 50% Cytosin- und Guanin-Gehalt. Die Methylierung solcher Inselbereiche unterdrückt die Genexpression. Tate und Bird (1993) postulierten, dass die Methylierung eine Bindung von Transkriptionsfaktoren verhindert. Boyes und Bird (1992) schlagen vor, dass entweder Methyl-CpG Bindungsproteine mit Transkriptionsfaktoren um Bindungsstellen an der methylierten DNA konkurrieren oder dass diese Bindungsproteine eine dichte Chromatinstruktur verursachen, die eine Transkription unmöglich macht.

Störungen des Imprintings führen zu abnormen Wachstum, Dysmorphien und Carcinogenese (Falls et al. 1999). Bekannte Imprintingstörungen liegen beim BWS vor (s. Kap. 2.2.1.4).

2.2.3.2 Kandidatengene für das Silver-Russell-Syndrom auf Chromosom 11

Auf Chromosom 11 sind im Bereich 11p15.5 mehrere geprägte Gene lokalisiert (Abb. 2.4, S.14). V.a. die beiden Gene IGF2 und CDKN1C sind interessant, da es sich um Gene handelt, die beim pränatalen Wachstum und bei der Entwicklung eine bedeutende Rolle spielen.

2.2.3.2.1 Insulin like growth factor 2 (IGF2)

Das IGF2-Gen liegt auf Chromosom 11 im geprägten Gen-Cluster im Bereich 11p15.5. Es wird paternal exprimiert (DeChiara et al. 1991, Giannoukakis et al. 1993) und kodiert für einen Wachstumsfaktor, der im embryonalen Wachstum eine wichtige Rolle spielt. IGF2 gehört einer Gruppe von Genen an, zu der man IGF 1 und 2, 6 verschiedenen IGF-binding-proteins (IGFBP) und IGFBP-Proteasen zählt. IGFs werden ubiquitär exprimiert und sind wichtige Mitogene, die Zellwachstum und Metabolismus beeinflussen (Hwa et al. 1999). Zusätzlich zu den endokrinen Effekten, die durch zirkulierende IGFs hervorgerufen werden, verursachen lokal produzierte IGFs parakrine und autokrine zellproliferierende Effekte (Hwa et al. 1999). IGFs sind im Serum an IGFBPs gebunden. Sie interagieren zum einen mit spezifischen Oberflächenrezeptoren der Zellen (Typ1- und Typ2-Rezeptoren), zum anderen mit dem Insulinrezeptor. Der mitotische Effekt wird hauptsächlich durch Interaktion der IGFs mit dem Typ1-Rezeptor hervorgerufen. Dieser ist wie der Insulin-Rezeptor eine Thyrosinkinase. Der Typ2-IGF Rezeptor bindet v.a. IGF2 und Liganden mit Mannose-6-phosphat (Nissley et Lopaczynski 1991). Das Protein wird internalisiert, was zu einem lysosomalen Abbau führt. Es wird daher vermutet, dass der Typ2-Rezeptor für die Elimination des IGF2 aus dem Kreislauf zuständig ist (Kornfeld 1992).

Das IGF2-Gen gehört zu den geprägten Genen. Bei Mäusen, die ein null-Igf2 Allel vom Vater geerbt haben, wird eine starke Wachstumsretardierung beobachtet (DeChiara et al. 1991). Mäuse, die embryonal vermehrt Igf2 exprimieren, sind dagegen größer als ihre Geschwister. Beim Menschen deuten immer mehr Befunde darauf hin, dass eine vermehrte IGF2-Ausschüttung in der fetalen Entwicklung bei der Pathogenese des BWS eine Rolle spielt (Grandjean et al. 2000). Ein Imprintingverlust des IGF2-Gens, welches zu einer biallelischen Expression des IGF2 führt (Joyce et al. 1997), wird bei einigen Patienten mit BWS beobachtet.

Inwieweit das IGF2-Gen Grundlage anderer Krankheitsbilder und Merkmale ist, muss abgewartet werden. Gaunt et al. (2001) berichten aber über eine positive Assoziation zwischen Polymorphismen des IGF2-Gens und dem BMI erwachsener kaukasischer Männer.

2.2.3.2.2 Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (CDKN1C)

Das CDKN1C-Gen ist ein weiteres geprägtes Gen im Bereich 11p15.5, welches aber maternal exprimiert wird (Matsuoka et al. 1995). Die Prägung ist allerdings beim Menschen inkomplett, so dass eine geringe Menge an paternal gebildetem CDKN1C nachweisbar ist (Matsuoka et al. 1996).

Das gebildete Protein ist ein Inhibitor mehrerer G1-Cyclin/Cdk Komplexe und fungiert als negativer Regulator der Zellproliferation (Lee et al. 1995). Die N-terminale inhibitorische Domäne des Proteins weist eine deutliche Ähnlichkeit mit p21(Cip1) auf, welches ein Inhibitor des Zellzyklus ist (Matsuoka et al. 1995). Eine Überexpression von CDKN1C kann dazu führen, dass Zellen im G1-Stadium verharren (Maher et Reik, 2000).

In einem Mausmodell haben Zhang et al. (1997) defekte Genkopien des *Cdkn1c*-Gens in Mäuse eingebracht. Sie beobachteten eine veränderte Zellproliferation und –Differenzierung, welches zu Symptomen ähnlich dem BWS führte.

Verschiedene Arbeitsgruppen untersuchten das CDKN1C-Gen bei BWS-Patienten (Hatada et al. 1996; O’Keefe et al. 1997). Bei 5-10% der sporadisch auftretenden BWS-Fälle konnten Mutationen im maternalen Allel gefunden werden. Bei familiär auftretendem BWS wurde eine maternale Mutation in 30-50% der Fälle gefunden (Lam et al. 1999).

2.3 Zielsetzung

Fisher et al. (2002) und Kosaki et al. (2000) beschrieben unabhängig voneinander vier kleinwüchsige Patienten, darunter auch Patienten mit SRS, die eine maternale Duplikation des Bereichs 11p15 aufwiesen. Interessanterweise ist eine paternale Duplikation dieses Bereichs verantwortlich für die Entstehung des BWS, welches zu Großwuchs führt. Eine Duplikation des Bereichs 11p15.5 führt also möglicherweise über vermehrte oder verminderte Expression von geprägten wachstumsregulierenden Genen zu Kleinwuchs bzw. Großwuchs.

Beim BWS sind sowohl Duplikationen des paternalen 11p15.5 Bereichs als auch pUPD11 beobachtet worden. Weiterhin sind ein Verlust der genomischen Prägung des IGF2-Gens und Mutationen im CDKN1C-Gen häufige Verursacher des Syndroms (s. Kap. 2.2.1.4). Es ist denkbar, dass Mutationen und veränderte Prägungsmuster dieser Gene auch an der Ätiologie des beteiligt sind.

Daher wurden in der vorliegenden Arbeit SRS-Patienten zum einen auf maternale Duplikationen des Bereichs 11p15.5, zum anderen auf mUPD11 untersucht.

Anschließend wurde nach Mutationen in den IGF2- und CDKN1C-Genen sowie nach Veränderungen des Methylierungsmusters des IGF2-Gens gesucht.

Gaunt et al. (2001) beobachteten zusätzlich eine Korrelation von verschiedenen Polymorphismen des IGF2-Gens mit dem BMI kaukasischer Männer. Aufgrund dieser Beobach-

tung wurden die Häufigkeiten bestimmter Polymorphismen des IGF2-Gens im SRS-Kollektiv mit den Häufigkeiten in Kontrollkollektiven verglichen.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Geräte und Zubehör

Elektrophoresegeräte	Life Technologies Model SA, Gibco BRL, Groningen, NL Multigel-Long-Gelkammer, Biometra, Göttingen, D Pharmacia Gel Elektrophoresis Apparatus GNA-200, Freiburg
Elektrophoresezubehör	Gelträger 20x20 cm & 22-Zahn-Kamme, Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg, D
Fragmentanalysezubehör	Glasplatten; Spacer 0,5 mm; Klammern
Geldokumentation	Imaging-System Gel Doc 2000, Bio-Rad, Hercules, USA
Geltrockner	Model 583, Gel-Dryer, Bio-Rad, Hercules, USA
Heizblock	Unitek™ HBS-130/E, peqlab, Erlangen, D Dri-Block® DB3D, Techne, Wertheim, D
Magnetrührer	Ikamag RCT basic, IKA Labortechnik, Staufen, D
Mikrowelle	Bosch
Photometer	Bio Photometer, Eppendorf, Köln, D
Pipetten	Pipetman P10, P20, P100, P1000, Gilson, Villiers-le-Bel,F
Schüttelapparat	GFL 3015, Burgwedel, D
Sequenzierer	ABI Prism® 377, Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Sequenzierzubehör	Glasplatten; Spacer 0,5 mm Klammern
Spannungsgeräte	Elektrophoresis Power Supply PS304 & PS3002, Gibco BRL, Groningen, NL PS304, Whatman, Biometra, Göttingen, D
SSCP-Zubehör	Glasplatten mit fixierten 1,0 mm Spacern; Glasplatten ausgeschnitten mit geradem Schriff;

	Kämme 24-zahlig 1,0 mm; Silikonabdichtung 1,0 mm & Klammern, Biometra, Göttingen, D
Thermocycler	Biometra Personal Cyclers, Göttingen, D
Waagen	BP 2011 & BP 615, Sartorius AG, Göttingen, D
Wasserbad	Lauda E200 ecoline R206, Lauda-Königshofen, D GFL 1086, Burgwedel, D
Whatmanpapier	Whatman GB002, Schleicher und Schüll, Dassel, D
Vakuumpumpe	Membran-Vakuumpumpe, Vacuubrand, Wertheim, D
Zentrifugen	Centrifuge 5415D, Eppendorf, Hamburg, D Biofuge fresco, Kendro, Osterode, D

3.1.2 Chemikalien

Alle verwendeten Chemikalien trugen die Qualitätsbezeichnung p.a. und wurden von folgenden Firmen bezogen:

- Bio-Rad Laboratories, Hercules, Ca, USA
- Invitrogen, Karlsruhe, D
- Merck, Darmstadt, D
- Riedel-de Haen, Seelze, D
- Serva, Heidelberg, D
- Sigma-Aldrich, Deisenhofen, D

3.1.3 Oligonukleotide

Sämtliche verwendeten Primer wurden von der Firma MWG-Biotech AG Ebersberg synthetisiert. Bezeichnung und Sequenzen der einzelnen Primerpaare zur Untersuchung des Patientenkollektives auf UPD11 und auf Duplikation des Bereichs 11p15 sind im Anhang in Tab. 7.1 und 7.2 wiedergegeben.

Im Anhang sind in Tab. 7.4 auch die Sequenzen und Bezeichnungen der Primerpaare zur Untersuchung des IGF2-Gens aufgeführt. Die Mehrzahl der Primerpaarsequenzen wurden von Gaunt et al. (2001) übernommen. Einige der Primersequenzen mussten allerdings wegen unspezifischer PCR-Produkte verändert werden.

Ebenso sind im Anhang die Sequenzen der Primerpaare dargestellt, mit deren Hilfe der Methylierungsstatus des IGF2-Gens untersucht werden sollte (Tab. 7.4)

Die zur Untersuchung des CDKN1C-Gens benötigten Primerpaare sind im Anhang in der Tab. 7.5 aufgelistet. Die Sequenzen dieser Primerpaare wurden von Lam et al. (1999) übernommen. In Exon 3 und Intron 3 wurden in dem Patientenkollektiv mittels Sequenzierung zwei Varianten entdeckt, die in dem Kontrollkollektiv mit Hilfe der SSCP untersucht wurden. Da das PCR-Produkt des Primerpaars H F/R 473 bp lang ist, ist das PCR-Produkt dieses Primerpaars für die Analyse mittels SSCP ungeeignet. Deshalb wurden weitere Primerpaar H2 F/R und H3 F/R eingeführt, welche die zu untersuchenden Varianten umschließen (s. Abb. 4.32, S. 77).

3.1.4 Feinchemikalien und Enzyme

BAC-Reinigungskit	Large-Construct Kit (10), QIAGEN, Hildesheim, D
COT DNA	COT human DNA, Roche Diagnostics, Mannheim, D
Längenstandard	100 bp-Leiter und 50 bp-Leiter, 1 µg/µl, Invitrogen, Karlsruhe, D
Nick Translation	BioNick™ Labeling System, Invitrogen, Karlsruhe, D
Nukleotide	(dATP, dGTP, dCTP, dTTP), je 100mM, Invitrogen, Karlsruhe, D
PCR-Reinigungskit	QIAquick® PCR Purification Kit (250), QIAGEN, Hilden, D
Restriktionsendonukleasen	Fermentas, St. Leon-Rot, D New England Biolabs, Frankfurt/Main, D
Sequenzierkit	ABI Prism® Big Dye™ Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Tamra™ Size Standard	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Taq-Polymerase	Taq-PCR _x DNA Polymerase, recombinant, 5 U/µl, Invitrogen, Karlsruhe, D Taq-DNA-Polymerase, recombinant, 5U/µl, QIAGEN, Hilden, D AccuPrime Taq-DNA-Polymerase, 5U/µl, Invitrogen, Karlsruhe, D

3.1.5 Übersicht der verwendeten Klone

Um die entdeckten Varianten beschreiben zu können, wurden verschiedene Klone der NCBI-Datenbank benutzt (Tab. 3.1 und Tab. 3.2)

Exon/Intron IGF2-Gen	GenBank accession number
5'UTR	L15440
Exon 1	L15440
Exon 2	L15440
Exon 3	Y13633
Exon 4	GI 33051
Exon 5	X03562
Exon 6	X03562
Exon 7	X03562
Exon 8	X03562
Exon 9	X03562
3'UTR	X07868

Tab. 3.1: Übersicht über die verwendeten Klone bei der Bestimmung von Varianten im IGF2-Gen

CDKN1C-Gen	GenBank accession number
Exon 1 – Exon 4	D64137

Tab. 3.2: Übersicht verwendeter Klon bei der Bestimmung von Varianten im CDKN1C-Gen

3.2 Probandenkollektive

Das in der vorliegenden Arbeit analysierte Kollektiv bestand aus DNA-Proben von SRS-Patienten, die dem Institut für Humangenetik Aachen von Herrn PD Dr. H. Wollmann, Universitätskinderklinik Tübingen, zur Verfügung gestellt wurden. Alle Patienten wurden in der endokrinologischen Sprechstunde der Kinderklinik Tübingen vorstellig. Ihre Daten wurden von Herrn PD Dr. H. Wollmann erfasst. 46 Patienten wurden auf eine mUPD und eine Duplikation des Bereichs 11p15, 40 bzw. 39 Patienten wurden auf Veränderung des IGF2- bzw. CDKN1C-Gens untersucht.

Bei allen Patienten wurde sowohl eine intrauterine als auch ein postnatale Wachstumsretardierung beobachtet. Die Patienten zeigten weiterhin für das SRS charakteristische Fehlbildungen

wie Gesichtsdysmorphien und Klinodaktylie. Bei allen Patienten wurden in Voruntersuchungen eine UPD 2, 7, 9, 14, 16 und 20 sowie endokrinologische Störungen ausgeschlossen.

Die genomische DNA wurde aus Lymphozyten des peripheren Blutes mittels Aussalzverfahren nach Miller (1988) gewonnen. Alle eingegangenen Proben wurden anonymisiert sowie laborintern mit fortlaufenden „SRS“-Nummern versehen.

Als Kontrollkollektiv wurde zum einen ein Kollektiv benutzt, das sich aus DNA normalwüchsiger deutschstämmiger Probanden zusammensetzte („T-Kollektiv“), zum anderen wurde ein Kollektiv verwendet, welches aus Blutspendern unbekannter Herkunft und Körpergröße bestand („B-Kollektiv“). Bei beiden Kollektiven wurde die DNA mittels des oben genannten Aussalzverfahrens isoliert und anschließend anonymisiert.

3.3 Statistische Analyse der Polymorphismen

Die Statistischen Analysen zu den identifizierten Polymorphismen der IGF2- und CDKN1C-Gene wurden von Herrn Prof. Dr. J. Tomiuk, Institut für Anthropologie und Humangenetik Tübingen, durchgeführt.

Die genotypischen Daten (Allelfrequenzen) wurden mittels des Computer-Programms GENPOPOP (Raymond et Rousset, 1995) analysiert. Dieses Programm liefert auch bei kleinen Datensätzen exakte Ergebnisse.

Die Homogenität der genetischen Strukturen in der Patientengruppe gegenüber der Kontrollgruppe wurde mit der Programmoption „*exact tests of population differentiation*“ getestet.

Die Programmoption „*Hardy-Weinberg exact test*“ wurde verwendet, um statistische Abweichungen der beobachteten Genotypenfrequenzen von den entsprechenden Hardy-Weinberg Proportionen zu untersuchen.

3.4 Methoden

3.4.1 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR, Polymerase Chain Reaction)

Die PCR ist eine Methode, mit der eine gewünschte DNA-Sequenz vervielfältigt werden kann. Hierzu werden zum DNA-Strang komplementäre Startermoleküle (Primer), Nukleotide, sowie eine Polymerase und die Ausgangs-DNA benötigt. Als erstes findet eine Denaturierung der DNA statt, so dass die Primer an die komplementäre Sequenz der Einzelstränge binden können (Annealing). Mit Hilfe der Polymerase wird ein komplementärer Strang synthetisiert (Elongation). Dieser Vorgang (Denaturierung, Annealing und Elongation) entspricht einem

Zyklus der PCR. Um ausreichend Produkt zu erhalten, muss solch ein Zyklus mehrmals stattfinden. Zur Denaturierung der DNA muss das Reaktionsgemisch auf 94°C erhitzt werden. Dabei lösen sich die Wasserstoffbrücken der komplementären Basen, so dass die DNA in Einzelsträngen vorliegt. Dies ermöglicht den Primern, sich an die Einzelstränge anzulagern. Die hierfür benötigte Temperatur (Annealingtemperatur) lässt sich aus der folgenden Formel errechnen:

$$T_A = \text{Anzahl (A+T)} \times 2^\circ\text{C} + \text{Anzahl (G+C)} \times 4^\circ\text{C}$$

Als Primer werden vorzugsweise Moleküle gewählt, die etwa 20-25 Nukleotide lang sind und etwa gleich viele Pyridine wie Purine besitzen. Nachdem die Primer sich an die Einzelstränge angelagert haben, folgt die Synthese eines komplementären Stranges durch eine Polymerase. Diese heftet dabei an das 3`Ende des Primers Nukleotide an. Im Allgemeinen wird hierfür ein hitzestabiles Enzym verwendet, welches seine Aktivität während der Denaturierungsschritte nicht verliert. Hierzu eignet sich besonders die *Taq*-Polymerase, welche aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* gewonnen wird. Der Elongationsschritt findet dem Temperaturoptimum der *Taq*-Polymerase entsprechend bei 72°C statt. Es kann nachfolgend erneut eine Denaturierung stattfinden, welche zum Ablösen des synthetisierten Produktes vom Einzelstrang führt. Produkt und Einzelstrang können dann wieder als Matrize dienen. Pro Zyklus wird also die Anzahl der Kopien verdoppelt, so dass sich folgende Formel ergibt:

$$\text{Anzahl der Kopien} = \text{Anzahl der Anfangskopien} \times 2^{\text{Anzahl der Zyklen}}$$

Da die Polymerase ihre enzymatische Aktivität nach mehreren Zyklen verliert und die durch die Polymerase eingebauten Fehler akkumulieren, ist die Anzahl der Zyklen auf 30-40 begrenzt.

Anschließend wird ein zehnminütiger Elongationsschritt angehängt, der es der *Taq*-Polymerase ermöglicht, alle synthetisierten DNA-Stränge zu vervollständigen.

ReagenzienStandard PCR-Ansatz (25 oder 50 µl Ansatz)

Tris-HCL (pH 8,4)	(200 mM)	20 mM
KCl	(500 mM)	50 mM
MgCl ₂	(50 mM)	1,5 mM
Desoxynukleotide (dNTPs)	(100mM dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	jeweils 200 µM
Primer (F/R)	(10 pM)	0,4 pM
<i>Taq</i> -Polymerase	(5 U/µl)	1U
DNA	(20 ng/µl)	80 ng
Aqua dest.		Restvolumen

In der vorliegenden Studie musste der Reaktionsansatz der PCR in einigen Fällen modifiziert werden.

Einige Mikrosatellitenmarker sowie Fragmente des IGF2 Gens konnten nur unter Verwendung der Q-solution der Firma Qiagen etabliert werden (s Tab. 7.6, 7.7 und 7.8 im Anhang).

Für diese Primerpaare sah das PCR-Protokoll wie folgt aus:

PCR-Ansatz mit Q-Solution (25µl Ansatz)

Puffer mit 15 mM MgCl ₂	10x	1x
Q-Solution		20 Vol%
dNTPs	(100 mM dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	jeweils 200 µM
Primer (F/R)	10 mM	0,4 mM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	1 U
DNA	20ng/µl	80 ng
Aqua dest.		Restvolumen

Da das CDKN1C-Gen einen hohen GC-Anteil aufweist, musste teilweise zur Etablierung der einzelnen Fragmente sowohl die MgCl₂-Konzentration variiert werden als auch Dimethylsulfoxid (DMSO) hinzugefügt werden (s. Tab. 7.9 im Anhang).

Durchführung:Standard-PCR-Programm

5 min	94°C	Initiale Denaturierung	
0,5 min	94°C	Denaturierung	} 35-40x
0,5 min	T _A	Primerannealing	
1,5 min	72°C	Elongation	
10 min	72°C	Finale Elongation	

Bei den fluoreszenzmarkierten Primern wurde zusätzlich ein halbstündiger Schritt mit 60°C an die PCR angehängt.

Die PCR-Bedingungen der Mikrosatellitenmarker sowie der IGF2- und CDKN1C-Gene sind im Anhang in den Tab. 7.6, 7.7, 7.8 und 7.9 dargestellt.

3.4.2 Elektrophoretische Auftrennung der PCR-Produkte auf Agarosegelelen

Die Gelelektrophorese ist eine Methode, mit der man Moleküle ihrer Größe nach auftrennen kann. Wichtig ist dabei, dass die DNA in ihrer Gesamtheit negativ geladen ist, so dass die einzelnen Moleküle zur Anode wandern. Dabei ist die Geschwindigkeit, mit der das Molekül wandert, proportional zur angelegten Feldstärke sowie zur Ladung des Moleküls und umgekehrt proportional zur Molekülgröße sowie zur Gelviskosität.

Der Vorteil der Agarose-Gelelektrophorese besteht in der leichten Handhabung sowie in der Möglichkeit Produkte aus dem Gel zu isolieren. Allerdings sind die Empfindlichkeit und das Auflösungsvermögen im Vergleich zu Polyacrylamidgelen gering. In der vorliegenden Arbeit wurde zur Auftrennung von PCR-Produkten ein 1%iges Agarosegel verwendet.

Der Elektrophoresepuffer hat etwa die gleiche Dichte wie die aufzutragenden Proben. Um das Auftragen auf dem Gel zu vereinfachen, werden die Proben deshalb vorher mit einem Puffer versetzt, der ihre Dichte erhöht. Durch Zugabe eines Farbstoffes (z.B. Bromphenolblau) zu dem Probenpuffer wird die Probe zusätzlich sichtbar gemacht.

Der Nachweis der DNA-Fragmente erfolgte mittels Ethidiumbromidfärbung. Dabei interkaliert das Ethidiumbromid aufgrund seiner positiven Ladung in doppelsträngige Moleküle und führt unter UV-Licht zu einer Emission von Fluoreszenz. Diese Fluoreszenz kann mit UV-Licht nachgewiesen werden.

ReagenzienZusammensetzung eines 1%igen Agarose-Gels

Agarose			1%
Tris-HCl (pH 8,4)	(1,0 M)	} 10x TBE	100 mM
Borsäure	(0,9 M)		90 mM
EDTA	(0,01M)		1 mM
Ethidiumbromid	10 mg/ml		1 µg/ml
Aqua dest.			Restvolumen

Agarose-Blaupuffer (100ml)

Tris-HCl (pH 8,4)	(1,0 M)	} 10x TBE	100 mM
Borsäure	(0,9 M)		90 mM
EDTA	(0,01 M)		1 mM
Ficoll 400	(20%)		8%
Bromphenolblau	(0,1%)		0,01%
Aqua dest.			Restvolumen

Elektrophoresepuffer

Tris-HCl (pH 8,4)	(1,0 M)	} 10x TBE	100 mM
Borsäure	(0,9 M)		90 mM
EDTA	(0,01M)		1 mM

Durchführung:

Zur Herstellung von 1%igen Agarosegelen wurden die Reagenzien in einem 500 ml Kolben in der Mikrowelle aufgeköcht. Anschließend wurde Ethidiumbromid zur aufgeköchten Agarose hinzugegeben. Nach dem Abkühlen der Agarose auf einem Schüttler auf etwa 60°C (~35 min) wurde sie in einen abgeklebten Gelträger mit Kämmen gegossen. Nach weiteren 35 min konnte das auspolymerisierte Gel in eine Gelkammer mit 1x TBE-Puffer gegeben werden und mit den Proben beladen werden. Dabei musste der Elektrophoresepuffer das Gel vollständig bedecken. Jeweils 5 µl der Proben wurden vor dem Auftragen mit jeweils 5 µl Blaupuffer versehen. Zusätzlich zu den Proben wurde als Größenstandard ein 100 bp-Leiter aufgetragen.

Die Elektrophorese wurde bei 120V für ca. 40 min durchgeführt und anschließend mittels UV-Licht auf einem Imager-Gerät sichtbar gemacht.

3.4.3 Mikrosatellitenanalyse

Mikrosatelliten oder "short tandem repeats" (STRs) sind DNA-Sequenzen von tandemartig wiederholten einfachen Basenmotiven mit einer Länge von meist weniger als 60 Basenpaaren (Weber & Wong, 1993). Die Sequenzmotive sind meist 2-4 bp groß, also Di-, Tri- und Tetranucleotide und von variabler Basenzusammensetzung. Häufig sind es alternierende Purin-/Pyrimidinbasen wie z.B. (GC)_n, (AT)_n oder (CA)_n.

Diese Längenpolymorphismen werden nach den Mendelschen Regeln vererbt. Sie sind daher als genetische Marker geeignet, stehen aber nicht mit Krankheitsbildern im Zusammenhang. Je höher die Zahl der Repeateinheiten, umso höher wird der Informationsgehalt der Marker (Weber, 1990). Die Markerallele unterscheiden sich in der Regel um eine Repeateinheit, d.h. um 2 bp bei einem Dinucleotidrepeat und um 4 bp bei einem Tetranucleotidrepeat.

Die Anzahl der Tandemrepeats eines Mikrosatelliten lässt sich mittels PCR auf einem Polyacrylamidgel und nachfolgender Detektion mittels Silberfärbung oder Fluoreszenzmarkierung.

Um in der Fragmentanalyse aussagekräftige Ergebnisse zu erhalten, sollten die untersuchten Personen heterozygot für den untersuchten Marker sein. Der Informationsgehalt eines Markers und damit seine Qualität hängen von der Zahl der Allele und deren Frequenzen in der Bevölkerung ab. Je zahlreicher die Allele und je gleichmäßiger deren Verteilung, umso höher ist die Wahrscheinlichkeit, dass ein Individuum heterozygot ist. Ein Maß für den Informationsgehalt ist die Heterozygotenfrequenz ("heterozygosity"):

$$H = 1 - \sum p_i^2$$

Darin bedeutet p die Populationsfrequenz des i -ten Allels eines Markers und H gibt die Wahrscheinlichkeit an, dass ein Individuum heterozygot für diesen Marker ist.

In der vorliegenden Studie wurden Marker verwendet, die eine möglichst hohe Heterozygotenfrequenz aufwiesen ($P > 0,75$).

3.4.4 Fragmentanalyse mit denaturierenden Polyacrylamidgelen (PAA-Gele)

Polyacrylamidgele bestehen zum einen aus Acrylamidmonomeren und N,N'-Methylenbisacrylamid sowie aus Tetramethyldiamin (TEMED) und Ammoniumperoxodisulfat. Gelöstes Ammoniumperoxodisulfat bildet freie Radikale ($\text{SO}_4^{\cdot-}$). Diese freien Radikale in Kom-

bination mit Acrylamidmonomeren und N,N'-Methylen-bisacrylamid führen zur Bildung von Acrylamidketten und deren Vernetzung. TEMED wird zusätzlich als Katalysator hinzugefügt. Polyacrylamidgele haben gegenüber Agarosegelen den Vorteil, dass sie PCR-Produkte, deren Längen sich um eine Base unterscheiden, auftrennen können. Bei der Untersuchung von Längenpolymorphismen werden die Proben vorher denaturiert, so dass beide DNA-Stränge getrennt vorliegen. Durch Hinzufügen von Formamid im Blaupuffer sowie Harnsäure im Gel, wird eine Renaturierung mit Ausbildung von Sekundärstrukturen verhindert. Dadurch ist das Migrationsverhalten der Moleküle von der Länge des Moleküls abhängig und nicht von seiner Konformation. Die unterschiedlich langen DNA-Fragmente laufen daher auf dem PAA-Gel unterschiedlich weit. Nachdem sie entweder mit Silber gefärbt oder mit Hilfe eines automatischen Sequenzierers detektiert werden, können sie ausgewertet werden. Damit sind PAA-Gele zur Auftrennung von bis zu einem Basenpaar unterschiedlich langen PCR-Fragmenten wie den Mikrosatelliten besonders geeignet.

Reagenzien

Zusammensetzung eines 8%igen Acrylamidgels (40ml)

Acrylamid	}	SequaGel-8 von Natural Diagnostics	32 ml
N,N'-Methylen-bisacrylamid			
Harnstoff			
SequaGel complete buffer reagent			8 ml
APS			500µl

UPD-Blaupuffer (10ml)

Bromphenolblau		10 mg
Xylanacyanol FF		10 mg
Formamid deionisiert		10 ml
EDTA pH7	(0,5 M)	200 µl
Aqua dest.		ad 10 ml

Elektrophoresepuffer

Tris-HCl (pH 8,4)	(1,0 M)	} 10x TBE	100mM
Borsäure	(0,9 M)		90 mM
EDTA	(0,01M)		1 mM

Durchführung:

Bevor die Reagenzien zur Herstellung eines Acrylamidgels gemischt wurden, wurde die Gelapparatur zusammengebaut. Als erstes wurden die beiden Glasplatten mit Alkohol gesäubert. Anschließend wurde eine Platte mit Blueslick (Firma Serva) beschichtet, damit sich das Gel beim Abbauen besser von der Glasplatte löst. Die Apparatur bestand aus den Glasplatten, zwei Abstandshaltern (1mm dick), sowie Klebeband. Die Gellösung wurde nun aus den oben genannten Reagenzien hergestellt und randständig in die Apparatur gegossen. Die gerade Seite eines Kammes wurde zur Bildung eines Taschenbodens in die Gelapparatur eingesetzt und mit Klammern fixiert. Nach etwa einer Stunde war das Gel auspolymerisiert und konnte nach Entfernen der Klammern in die Gelkammer eingesetzt werden. Untere und obere Pufferkammer wurden dann mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Durch Umdrehen des Kammes wurden anschließend Taschen erzeugt, in die die Proben eingefüllt werden konnten. Vor dem Auftragen der Proben auf das PAA-Gel mussten jeweils 4 μ l der PCR-Proben mit 4 μ l UPD-Blaupuffer verdünnt und anschließend für 5 min bei 94°C denaturiert werden. Je 7 μ l des PCR-Blaupuffergemisches wurden in die Taschen des Gels eingefüllt. Die Elektrophorese wurde bei 1200V für ca. 3 Stunden bei Raumtemperatur durchgeführt. Die Banden auf dem Gel wurden dann mittels der Silberfärbung sichtbar gemacht (s. Kap. 3.3.4.1).

3.4.4.1 Detektion der Fragmente mittels Silberfärbung

Nukleinsäurebanden in einem Gel können durch verschiedene Methoden sichtbar gemacht werden. Sie können wie bei Agarosegelen mit Ethidiumbromid gefärbt werden. Außerdem können sie über Fluoreszenz sowie Radioaktivmarkierung detektiert werden. In dieser Arbeit wurden die DNA-Banden mit Silber gefärbt. Diese Methode hat gegenüber Ethidiumbromid den Vorteil, dass sie zum einen sensitiver ist, zum anderen zur dauerhaften Dokumentation geeignet ist. Gegenüber den Radioaktiv- und Fluoreszenzmarkierungen hat sie den Vorteil, dass sie kostengünstiger ist.

Bei dieser Methode komplexieren Silberionen mit der DNA. Die Ionen werden anschließend mit Formaldehyd reduziert und fallen dabei aus, so dass die DNA-Banden auf dem Gel braunschwarz erscheinen.

Reagenzien

Silberfärbung

Ethanol	10%
Salpetersäure	1%
Silbernitrat	0,2%
Natriumcarbonat	3%
Formaldehyd	0,05% in Natriumcarbonat
Essigsäure	10%
Aqua dest.	

Durchführung:

Das PAA-Gel wurde zunächst in einer Färbewanne für 5 min mit 10% Ethanol behandelt. Dieser Schritt führt zu einer Fixierung der DNA im Gel. Danach wurde das Ethanol entfernt und 1%ige Salpetersäure hinzugegeben. Nach 5 min wurde das Gel für eine Viertelstunde mit Silbernitrat inkubiert, anschließend kurz in Wasser gewaschen und dann mit Natriumcarbonat und Formamid gefärbt. Nachdem die Banden sichtbar waren, wurde die Reaktion mit 10%iger Essigsäure gestoppt. Nach weiteren 5 min wurde das Gel nochmals in Wasser geschwenkt und dann auf ein Whatmanpapier gezogen. Zum Trocknen wurde es für zwei Stunden auf einen Vakuumtrockner bei 80°C gelegt.

3.4.4.2 Detektion der Fragmente mittels automatischen Sequenzierers

Eine weitere Methode zur Untersuchung von Mikrosatelliten besteht im Einsatz von fluoreszenzmarkierten Primern und Analyse durch einen automatischen Sequenzierer.

Bei dieser Methode wird eine PCR mit Primerpaaren etabliert, von denen der Vorwärtsprimer fluoreszenzmarkiert ist. Das PCR-Produkt wird nach einem Denaturierungsschritt auf ein PAA-Gel aufgetragen und die Elektrophorese in einem automatischen Sequenzierer durchgeführt. Aufgrund der unterschiedlichen Länge der Produkte benötigen diese unterschiedlich

lange, um das Gel zu durchwandern. Am unteren Rand der Gelapparatur befindet sich ein Laser, der die eingebauten fluoreszenzmarkierten Primer der PCR-Produkte zur Fluoreszenz anregt. Die resultierenden Signale werden mit Hilfe einer CCD-Kamera registriert. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe einer entsprechenden Software.

Reagenzien

Zusammensetzung eines 8% Fragmentgels

Harnstoff		6 M	18 g
Acrylamidlösung (30%)		4,5 Vol%	7,5 ml
Tris-HCl (pH 8,4) (1,0 M)	} 10x TBE	120 mM	} 6 ml
Borsäure (0,9 M)		108 mM	
EDTA (0,01 M)		1,2 mM	
HPLC-Wasser			23 ml
TEMED		0,04 Vol%	20 µl
APS		0,7 Vol%	350 µl

Formamidblaupuffer

Formamid (100%)	90 µl
Ladepuffer aus TAMRA-Kit	10 µl

Fragmentansatz

PCR-Produkt (5 ng/µl)	1 µl
TAMRA	0,5 µl
Formamidblaupuffer	2 µl

Elektrophoresepuffer

Tris-HCl (pH 8,4) (1,0 M)	} 10x TBE	100 mM
Borsäure (0,9 M)		90 mM
EDTA (0,01 M)		1 mM

Durchführung:PCR-Programm

5 min	94°C	} 35-40 Zyklen
30 sec	94°C	
1 min	T _A	
1,5 min	72°C	
10 min	72°C	
30 min	60°C	

Die genauen PCR-Bedingungen der einzelnen Fragmente sind im Anhang in Tab. 7.6 angegeben.

Nach der Amplifizierung des Fragmentes mittels PCR wurden die Proben auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und die DNA-Konzentration der einzelnen Proben abgeschätzt. Anhand der Abschätzung wurden die Proben auf etwa 5 ng/µl verdünnt. 1 µl dieser Verdünnung wurde dann mit 2 µl Formamidblaupuffer sowie 0,5 µl TAMRA als Standard versetzt. Vor dem Auftragen auf das PAA-Gel wurden die Proben bei 94°C für 5 min denaturiert und sofort auf Eis gestellt, um eine Renaturierung der DNA-Einzelstränge zu verhindern.

Zur Herstellung des PAA-Gels wurde zunächst 18 mg Harnstoff in 7,5 ml Acrylamid sowie 6 ml 10xTBE und 23 ml HPLC-Wasser bei 50°C auf einem Magnetrührer gelöst. Die Gelapparatur, bestehend aus 2 Glasplatten, Abstandshaltern (0,2mm Dicke) und Klammern, wurde zusammengebaut. Die Glasplatten wurden vorher mit Aqua dest. gereinigt, um später Hintergrundfluoreszenzen zu vermeiden.

Die PAA-Lösung wurde über eine Vakuumpumpe und einen 0,2 µm Porenfilter entgast und gereinigt und anschließend mit 20 µl TEMED und 350 µl APS versetzt. Die Lösung wurde in die Gelapparatur gegossen, der Kamm mit der flachen Seite zuerst eingeführt und mit Klammern fixiert. Nach etwa einer Stunde war das PAA-Gel auspolymerisiert. Die Glasplatten wurden im Laserbereich nochmals mit Aqua dest. gesäubert, die Klammern wurden entfernt und das Gel in einen Rahmen eingespannt. Dann wurde der Kamm mit den Zacken zuerst in das Gel eingeführt und bildete Kammern, in die die Proben eingebracht werden konnten. Die untere Pufferkammer des automatischen Sequenzierers wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt und das Gel eingespannt. Nachdem mittels der Option „Platecheck“ eine Verunreinigung der Platten ausgeschlossen wurde, wurden die Heizplatte sowie die obere Pufferkammer an-

gebracht. Die obere Pufferkammer wurde mit Elektrophoresepuffer gefüllt. Nach einem 30minütigem Vorlauf des PAA-Gels war die Geltemperatur von 52 °C erreicht. Diese Temperatur verhindert eine Ausbildung von Wasserstoffbrücken und damit eine Renaturierung. 1 µl jeder Probe konnte nun auf das Gel aufgetragen werden. Die Elektrophorese wurde anschließend bei 2700V für drei Stunden durchgeführt.

Die Auswertung der Fragmentanalyse erfolgte EDV-gestützt mit Hilfe der ABI Prism™ Collection Software, der Genescan Software und der Genotyper Software (ABI).

3.4.5 Einzelstrang-Konformationspolymorphismus-Analyse (SSCP, Single-Strand-Conformation-Polymorphism-Analysis)

Die Einzelstrang-Konformations-Polymorphismus-Analyse (Single Strand Conformation Polymorphism Analysis, SSCP) dient der Detektion von DNA-Veränderungen (Orita et al. 1989). In dem ersten Schritt wird ein maximal 300 bp langes DNA-Fragment mittels PCR amplifiziert. Die Fragmente werden anschließend denaturiert und auf einem hochauflösenden Poylacrylamidgel unter nicht-denaturierenden Bedingungen aufgetrennt. Das Laufverhalten des Fragmentes resultiert aus der Konformation des DNA-Stranges. Die einzelnen DNA-Stränge paaren sich mit sich selbst, da der Paarungspartner fehlt, so dass es zur Bildung von Sekundärstrukturen kommt. Ist nun eine Base im DNA-Einzelstrang verändert, kommt es bei der Paarung mit sich selbst zur Ausbildung einer anderen Sekundärstruktur. Dies wiederum hat zur Folge, dass das Molekül in dem PAA-Gel ein anderes Laufverhalten aufweist und damit anhand eines unterschiedlichen Bandenmusters detektiert werden kann. Da das Bandenmuster nichts über den Ort und die Art der Variante aussagt, müssen die unterschiedlichen Muster sequenziert werden. Die Ausbildung der Sekundärstruktur kann von der Temperatur sowie dem Glycerolgehalt des Gels abhängen. Deshalb werden die Proben bei unterschiedlichen Bedingungen getestet. Da keine Vorhersage getroffen werden kann, welche Veränderungen bei welcher Bedingung auffällig werden, müssen immer verschiedene Bedingungen getestet werden.

Die SSCP ist eine geeignete Methode, um ein großes Patientenkollektiv schnell und kostengünstig zu untersuchen. Der Nachteil der Methode besteht jedoch in der geringen Sensitivität. Bei einer Fragmentgröße von bis zu 300 bp beträgt sie unter optimalen Bedingungen 90% (Sheffield et al. 1993).

ReagenzienZusammensetzung des 10%igen PAA-Gels

Acrylamid	(40%)			4,9 ml
Bisacrylamid	(2%)			2 ml
Tris-HCL	(1,0 M)	} 10xTBE	50 mM	} Ad 20 ml
Borsäure	(0,9 M)		45 mM	
EDTA	(0,01 M)		0,5 mM	
TEMED			(0,05 Vol%)	0,02 ml
APS				0,25 ml
Glycerol			(5 Vol%)	1 ml

Zusammensetzung des SSCP-Probenpuffers (1 ml)

Blaupuffer für SSCP	5%	50 µl
Deionisiertes Formamid	95%	950 µl

Blaupuffer für SSCP (100ml)

Tris-HCL	(1,0 M)	} 10xTBE	100 mM	} 10 ml
Borsäure	(0,9 M)		90 mM	
EDTA	(0,01 M)		1 mM	
Ficoll 400	(20%)		8%	40 ml
Bromphenolblau	(0,1%)		0,02%	20 ml
Aqua dest.				Ad 100 ml

Durchführung:

Da durch eine veränderte DNA-Sequenz entstehende Konformationsänderung bedingungsabhängig auftreten kann, wurde jede Probe bei vier verschiedenen Bedingungen getestet: Raumtemperatur, Kühlschrank (4 °C), sowie Raumtemperatur bzw. Kühlschrank mit Zusatz von Glycerol (5%). Die PAA-Gel Lösung wurde mit den oben aufgelisteten Reagenzien hergestellt und gründlich durchmischt. Zwei Glasplatten mit fixiertem Abstandhalter (1 mm Dicke) wurden mit 70%igem Ethanol gesäubert. Die Gelapparatur wurde aus den Glasplatten, Dichtungsgummis, sowie Klammern zusammengebaut. Die Gellösungen wurden in die einzelnen Apparaturen gegossen und anschließend wurde der Kamm eingelegt. Nach etwa einer

Stunde waren die Gele auspolymerisiert. Die Dichtungsgummis und der Kamm wurden entfernt und die Gele in die Elektrophoresekammern eingespannt. Als Elektrophoresepuffer wurde 0,5xTBE verwendet. Vor dem Auftragen der Proben auf die Gele wurden diese zunächst mit SSCP-Probenpuffer versetzt. Der Probenpuffer enthielt deionisiertes Formamid, welches eine Renaturierung der DNA-Stränge verhindert. Dabei wurde 35 µl Probenpuffer zu einem PCR-Ansatz mit einem Volumen von 25 µl hinzugegeben. Nachdem die Proben bei 94°C für 5 min denaturiert und sofort auf Eis gestellt worden waren, wurden jeweils 8 µl jeder Probe auf die vier verschiedenen Gele aufgetragen. Zusätzlich wurde zur späteren Wiedererkennung der Bedingungen eine 100 bp-Leiter auf jedes Gel in anderer Position aufgetragen. Die Elektrophorese lief dann bei 180 V Raumtemperatur, bzw. 200 V 4°C für 3 Stunden.

Die DNA-Banden wurden mit Hilfe der Silberfärbung sichtbar gemacht.

3.4.5.1 Silberfärbung von SSCP-Gelen

Die Silberfärbung von SSCP-Gelen gleicht der Silberfärbung von 8%igen PAA-Gelen zur Mikrosatelliten-Diagnostik (s Kapitel 3.3.4.1). Da die Gele aber 1 mm dick sind, müssen die Färbezeiten verlängert werden.

Nachdem die Gele für 10 min in 10%igem Ethanol eingelegt wurden, wurden sie für weitere 10 min mit 1%iger Salpetersäure behandelt. Anschließend wurden sie mit Silbernitrat 30 min inkubiert, danach kurz mit Aqua dest. gespült und mit Natriumcarbonat und Formamid gefärbt. Die Reaktion wurde 5 Minuten lang mit 10%iger Essigsäure gestoppt. Nachdem die Gele kurz mit Aqua dest. gespült worden waren, wurden sie auf Whatman-Papier gezogen und auf einem Vakuumtrockner für drei Stunden bei 80°C getrocknet.

3.4.6 Sequenzierung nach Sanger

Die Sequenzierung erfolgte nach dem Prinzip des Kettenabbruchverfahrens (Sanger et al., 1977). Diese Methode basiert auf die Ermittlung von DNA-Sequenzen durch kontrollierten Abbruch der DNA-Synthese. Nach einem Denaturierungsschritt der doppelsträngigen DNA schließt sich die Anlagerung eines sequenzspezifischen Primers an. Dann folgt eine Elongation des Einzelstranges über eine DNA-Polymerase. Das Hinzufügen von ddNTPs (2',3'-Didesoxynukleotiden) zum Reaktionsgemisch führt nach dem Einbau eines solchen zu einem Kettenabbruch, da die fehlende 3'-OH-Gruppe für die Phosphodiester-Bindung zwischen den Nukleotiden essentiell ist. Eine Limitierung der ddNTPs hat statistisch verteilte, basenspezifische Kettenabbrüche zur Folge. Es entsteht also ein Satz an Fragmenten, die sich

hinsichtlich ihrer Länge um jeweils ein Basenpaar voneinander unterscheiden. Diese Fragmente lassen sich dann elektrophoretisch ihrer Länge nach auftrennen. Der Nachweis der Banden kann radioaktiv oder auch mittels fluoreszenzmarkierten ddNTPs nachgewiesen werden. Bei der nicht-radioaktiven Sequenzierung sind die ddNTPs mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Somit ist jede Kette, die während der Reaktion entsteht, mit genau einem Farbstoff markiert. Während der gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA-Fragmente in einem denaturierenden Polyacrylamidgel erfolgt die Anregung der vier Fluoreszenzfarbstoffe über Laserabtastung. Die emittierten Farbsignale werden mittels einer CCD-Kamera registriert und anschließend computergestützt mit entsprechender Software in die entsprechende Nukleotidsequenz übersetzt.

Reagenzien

Sequenzierreaktion

DNA	40 ng
Primer F oder R (10 mM)	0,5 mM
Terminator Ready Reaktion Mix (ABI)	4 µl
HPLC-Wasser	Ad 20 µl

Ethanol-fällung

Sequenzier PCR-Produkt	20 µl
3M Natriumacetat ($\text{Na}^+\text{CH}_3\text{COO}^-$) (pH 4,8)	10 µl
100% Ethanol	250 µl
70% Ethanol	250 µl
HPLC-Wasser	80 µl

Sequenzierpuffer

Formamid deionisiert (100%)	900 µl
EDTA 25 mM	100 µl
Dextranblau/ml EDTA	20 mg

Zusammensetzung des 10%igen Sequenziergels

Harnstoff (CO(NH ₂) ₂)	(7 M)			21 g
Acrylamidlösung	(30%)		(5%)	
Tris-HCL (pH 8,4)	(1,0 M)	} 10xTBE	120 mM	} 6 ml
Borsäure	(0,9 M)		108 mM	
EDTA	(0,01 M)		1,2 mM	
HPLC-Wasser				20 ml
TEMED			(0,04%)	0,02 ml
APS			(0,7%)	0,35 ml

Elektrophoresepuffer

Tris-HCl (pH 8,4)	(1,0 M)	} 10x TBE	100 mM
Borsäure	(0,9 M)		90 mM
EDTA	(0,01 M)		1 mM

Durchführung:

Zuerst wurde zur Gewinnung von ausreichend PCR-Produkt von dem zu untersuchenden Fragment ein PCR-Ansatz mit einem Volumen von 100 µl bei vorher etablierten Bedingungen durchgeführt. Um Primer und andere niedermolekulare Substanzen aus dem Gemisch zu entfernen, wurde das Produkt mit dem QIAquick[®] PCR-Purification Kit aufgereinigt. Die DNA wurde mit 50 µl HPLC-Wasser eluiert. Wenn die Ausbeute an PCR-Produkt sehr gering war, wie z.B. bei Fragment F des CDKN1C-Gens, wurde die DNA mit nur 30 µl HPLC-Wasser eluiert. Um die Konzentration der DNA zu ermitteln, wurde die aufgereinigte Probe auf einem 1%igen Agarosegel aufgetragen und deren Konzentration anschließend anhand der Bandenstärke abgeschätzt. 40 ng des Produktes wurden dann mit 1 µl des jeweiligen Vorwärts- bzw. Rückwärtsprimers, sowie 4 µl des ABI Prism[®] BigDye Terminator Cycle Sequencing Reaction Kit[™] versetzt. Das Kit enthält die für die Reaktion benötigten Reagenzien wie dNTPS, fluoreszenzmarkierte ddNTPs sowie DNA-Polymerase.

PCR-Programm für CYCLE-Sequencing

2 min.	94 °C	}	27x
10 sec.	94°C		
5 sec.	50° C		
4 min.	60°C		

Um nicht eingebaute Nukleotide, die zu einer starken Hintergrundfluoreszenz führen, zu entfernen, wurde das Gemisch anschließend mittels der Ethanolfällung erneut aufgereinigt. Dazu wurde das Produkt mit 80 µl HPLC-Wasser, 10 µl 3M Natriumacetat sowie 250 µl 100% Ethanol versetzt und bei 4°C und 13000 rpm für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das an der Wand des Reaktionsgefäßes haftende Pellet mit 250 µl 70% Ethanols resuspendiert. Das Gemisch wurde erneut bei 4°C und 13000 rpm für 10 min zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und das Pellet etwa eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Schließlich wurde das Pellet in 4µl Sequenzierpuffer gelöst.

Zur Auftrennung des Produktes wurde ein 10%iges denaturierendes Polyacrylamidgel verwendet. Dazu wurde 21 g Harnstoff in 8,4 ml Acrylamidlösung, 6 ml 10xTBE sowie 20 ml HPLC-Wasser gelöst, anschließend durch einen Vakuumfilter filtriert und mit TEMED sowie APS versetzt. Die Apparatur wurde, wie im Abschnitt 3.3.4.2 beschrieben, aufgebaut, das Gel gegossen und nach etwa einer Stunde eingespannt. Die Sequenzierproben wurden bei 94°C für 5 min denaturiert und jeweils 1 µl auf das PAA-Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde anschließend bei 55°C für 7-10 Stunden bei 2500 V durchgeführt und mit der ABI PrismTM Collection Software und dem Sequencing Analysis-Programm analysiert.

3.4.7 Restriktionsverdau

3.4.7.1 Restriktionsverdau zur Detektion von Varianten

Wird eine Variante mittels einer Sequenzierreaktion festgestellt, so kann man diese oft mit Hilfe eines Restriktionsverdaues bei weiteren Patienten und Kontrollen nachweisen.

Zur Identifizierung werden TypII Restriktionsenzyme eingesetzt. Dies sind Enzyme, die eine Sequenz von 4-8 Basen erkennen, welche meist palindromisch angeordnet ist. Die Enzyme schneiden oft innerhalb ihrer Erkennungssequenz. Bildet oder zerstört nun eine genetische Veränderung eine solche Erkennungssequenz eines Restriktionsenzym, so entstehen beim Verdauen dieser DNA im Vergleich zu der verdauten Wildtyp-DNA unterschiedlich große

Fragmente. Diese Fragmente können gelelektrophoretisch aufgetrennt und anhand der Fragmentgrößen ausgewertet werden.

Diese Methode ist verglichen mit der Sequenzierung kostensparend und schnell, im Vergleich zur SSCP sensitiver. Der Nachteil der Methode besteht in der eingeschränkten Einsatzmöglichkeit, da die Variante vorher bekannt sein muss und eine meist palindromische Erkennungssequenz an der zu untersuchenden Stelle vorhanden sein muss.

Reagenzien

Ansatz für Restriktionsverdau

PCR-Produkt	100 ng
Restriktionsenzym	10 U
10x Enzypuffer	1,5 µl (1x)
Aqua dest.	Ad 15 µl

Durchführung:

100 ng des zu untersuchenden PCR-Fragmentes wurden mit 10 U Enzym, 1,5 µl Puffer sowie Aqua dest. versetzt. Anschließend wurde das Gemisch bei der für das Enzym optimalen Temperatur für drei Stunden inkubiert. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte auf einem 10%igem PAA-Gel mit 5% Glycerol. Das Gel wurde wie ein SSCP Gel (s Kap 3.3.5) hergestellt. Jeweils 5 µl Produkt wurden mit 5 µl Agaroseblaupuffer versetzt und auf das Gel aufgetragen. Zur Größenidentifizierung wurde zusätzlich ein 50 bp-Leiter sowie ein unverdautes Produkt aufgetragen. Die Elektrophorese wurde bei 250 V und Raumtemperatur für eine Stunde durchgeführt. Anschließend wurden die Banden mittels Silberfärbung (s. Kap. 3.3.5.1) sichtbar gemacht.

3.4.7.2 Restriktionsverdau zur Untersuchung des Methylierungsstatus (Algar et al. 2000)

Unter den bekannten Restriktionsenzymen existieren einige Enzyme, die die DNA nur dann schneiden können, wenn diese an der Erkennungssequenz des Enzyms nicht methyliert ist. Mit Hilfe dieser Enzyme kann man den Methylierungsstatus des IGF2-Gens untersuchen.

Das IGF2 Gen besitzt im Exon 9 eine Variante, bei dem an der Nukleotidposition g.8767 ein Austausch von Guanin gegen Adenin vorliegt (Algar et al. 2000). In der Wildtypsequenz existiert im Bereich der Variante eine Schnittstelle für das Enzym *ApaI*. Dieses erkennt die Sequenz GGCC. Liegt bei einer Person eine heterozygote Variante des Polymorphismus vor, so besitzt die Person zum einen die Schnittstelle GGCC, aber auch die veränderte Sequenz GACC. Das Enzym *ApaI* verdaut in diesem Fall nur die Wildtyp-Sequenz, die veränderte Sequenz bleibt unverdaut. Mit dem Primerpaar P2 und P3 entstehen also im heterozygoten Fall Fragmente mit den Längen 292 bp, 228 bp sowie 64 bp. Liegt der Wildtyp vor, so entstehen Fragmente mit den Längen 228 bp und 64 bp. Besitzt die zu untersuchende Person die Veränderung auf beiden Allelen, so wird das PCR-Produkt nicht verdaut und das Fragment bleibt 292 bp lang.

Das methylierungssensitive Enzym *HpaII* mit der Erkennungssequenz CCGG schneidet im Bereich des Primerpaars P3 und P4 die DNA an zwei Stellen (g.8052 und g.8208). Mit diesem Enzym verdaut man genomische DNA von Personen, die einen heterozygoten *ApaI*-Genotypen besitzen. Das Enzym *HpaII* schneidet die unmethylierten Erkennungssequenzen. Besitzt die zu untersuchende Person einen methylierten und einen unmethylierten DNA-Strang, wird in der nachfolgenden PCR mit dem Primerpaar P3/P4 nur der methylierte Strang repliziert. Der nichtmethylierte Strang wird nicht repliziert, da das Enzym *HpaII* zwischen den beiden Primern zwei Schnittstellen besitzt und damit das Fragment vor der PCR zerstört worden ist. Verdaut man das 1199 bp große PCR-Produkt mit *ApaI*, entsteht entweder ein unverdautes Produkt (das veränderte Allel ist methyliert und wurde in der PCR repliziert) oder zwei Fragmente mit der Länge 971 bp und 128 bp (das WT-Allel ist methyliert).

Wenn beide DNA-Stränge nicht methyliert sind, verdaut das Enzym *HpaII* beide Stränge. In der nachfolgenden PCR entsteht kein Produkt, da das Enzym beide Stränge zwischen den Primern P3 und P4 geschnitten hat und eine Replikation damit verhindert.

Sind beide DNA-Stränge methyliert, kann das Enzym *HpaII* diese nicht verdauen. Beide Stränge werden in der nachfolgenden PCR repliziert. Es entstehen PCR-Produkte mit und ohne *ApaI* Schnittstelle. Verdaut man das PCR-Produkt mit dem Enzym *ApaI*, entstehen drei unterschiedliche Fragmente mit den Längen 1199 bp, 971 bp und 128 bp.

ReagenzienAnsatz für *ApaI* Verdau (1)

PCR-Produkt (P2/P3)	5 µl
Restriktionsenzym	10 U
10x Enzypuffer	1,5 µl (1x)
Aqua dest.	Ad 15 µl

Ansatz für *HpaII*-Verdau

Genomische DNA	500 ng
Restriktionsenzym	20 U
10x Enzypuffer	3 µl (1x)
Aqua dest.	Ad 30 µl

PCR-Ansatz (25 µl) mit Primerpaar P3/P4 und AccuPrime *Taq*

Puffer mit 15 mM MgCl ₂	10x	1x
dNTPs	(100 mM dATP,dCTP,dGTP,dTTP)	jeweils 200 µM
Primer (F/R)	10 mM	0,4 mM
<i>Taq</i> -Polymerase	5 U/µl	1 U
Produkt <i>HpaII</i> -Verdau		4 µl
Aqua dest.		Restvolumen

Ansatz für *ApaI* Verdau (2)

PCR-Produkt (P3/P4)	6 µl
Restriktionsenzym	10 U
10x Enzypuffer	1,5 µl (1x)
Aqua dest.	Ad 15 µl

Durchführung:

Für 40 SRS-Patienten und 45 Kontrollen wurde eine PCR mit dem Primerpaar P2/P3 etabliert. Das PCR-Produkt wurde mit *ApaI* bei 37°C über Nacht verdaut. 4 µl der Probe wurden mit Blaupuffer versehen und auf einem 10%igen PAA-Gel mit 5% Glycerol aufgetragen. Das Gel

wurde wie ein SSCP Gel (s Kap 3.3.5) hergestellt und gefärbt. Die Elektrophorese wurde für eine Stunde bei 250 V durchgeführt.

500 ng der genomischen DNA der heterozygoten Personen wurde mit dem Enzym *HpaII* bei 37°C über Nacht verdaut. Um niedermolekulare Substanzen aus der verdauten DNA zu entfernen, wurde die Probe mit dem QIAquick® PCR-Purification Kit aufgereinigt und mit 30 µl HPLC-Wasser eluiert. Anschließend wurde eine PCR mit dem Primerpaar P3/P4 und dem Expand High Fidelity System der Firma Boehringer-Mannheim Biochemicals durchgeführt. Als Template wurden 4 µl des *HpaII*-Verdaus eingesetzt. 6 µl des PCR-Produktes wurden mit dem Enzym *ApaI* bei 37°C über Nacht verdaut. 10 µl der verdauten Probe wurden mit 10 µl Blaupuffer versetzt und auf ein 2%iges Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde 45 Minuten lang bei 80 V durchgeführt und die Fragmente anschließend mit UV-Licht ausgewertet.

3.4.8 Bestätigung der Duplikation des Bereichs 11p15.5 mittels FISH (Fluoreszenz-in-situ-hybridisierung)

Mittels Fragmentanalyse wurde bei zwei der 46 untersuchten SRS-Familien eine Duplikation des maternalen Bereichs 11p15 vermutet (SRS 46 und SRS 90). Zur Bestätigung dieses Ergebnisses wurde in der vorliegenden Studie zusätzlich eine FISH durchgeführt. Zur Verfügung standen Chromosomenpräparate des Patienten SRS 46 und SRS 90.

Die FISH ist eine Methode, mit der ausgesuchte chromosomale Bereiche fluoreszenzmarkiert werden. Sie besitzt im Vergleich zur konventionellen G-Bänderung der Cytogenetik ein besseres Auflösungsvermögen, so dass sie zum Nachweis kleiner duplizierter Bereiche besser geeignet ist. Bei dieser Technik wird eine Sonden-DNA, die homolog zu dem zu untersuchenden Abschnitt ist, mit bestimmten Markermolekülen (z.B. Biotin oder Digoxigenin) markiert. Anschließend können diese durch den Einsatz von spezifischen Antikörpern (Anti-Biotin oder Anti-Digoxigenin), die mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt sind (z.B. FITC), unter einem Fluoreszenzmikroskop detektiert werden.

Da die Sonden an beide homologen Chromosomen binden, sind unter dem Fluoreszenzmikroskop zwei Signale zu erkennen. Im Falle einer Duplikation eines chromosomalen Abschnitts dagegen sollten drei Signale darstellbar sein. Somit kann mit Hilfe einer FISH eine vermutete Duplikation bestätigt werden.

3.4.8.1 Sondenherstellung aus BAC-Klonen (bacterial artificial chromosomes)

3.4.8.1.1 Herstellung des komplementären DNA-Strangs

Um Sonden herzustellen, die zu der Region 11p15 komplementär sind, wurden von der Firma CHORI die BAC-Klone RP11-89P14 und RP11-89F15 bestellt. BACs sind zirkuläre Moleküle, die in *E. coli* kloniert und angereichert werden. Um ausreichend Material (1µg) für die FISH zu erhalten, müssen Bakterienkulturen hochgezogen werden, aus denen die BAC-DNA anschließend isoliert werden kann. Die so gewonnene DNA kann mit Hilfe einer Nick-Translation mit Biotin markiert werden und steht dann für die FISH zur Verfügung.

Reagenzien

LB-Medium (Lennox-Broth)

1% Trypton	10 g
0,5% Yeast Extract	5 g
NaCl	5 g
Chloramphenicol	50 mg
Aqua dest.	Ad 1 l (pH 7,0-7,5)

Durchführung:

Um genügend Sonden-DNA für die FISH zu erhalten, wurden die zugesandten Bakterien-Stocks zunächst über Nacht auf einer LB-Agar-Platte mit Chloramphenicol kultiviert. Anschließend wurde jeweils eine Kolonie gepickt und in 5 ml LB-Medium mit Chloramphenicol gegeben. Die 5 ml Kultur wurde über Nacht bei 37°C in einem Schüttler hochgezogen. Mit dieser Kultur wurden 500 ml LBA Medium angeimpft und erneut über Nacht bei 37°C geschüttelt. Nachdem ausreichend Bakterien vorhanden waren, wurde die BAC-DNA mit Hilfe des Large-Construction Kits der Firma QIAGEN (Bestellnr. 12462) extrahiert.

Um zu überprüfen, ob das extrahierte Produkt tatsächlich die benötigte Nukleotidsequenz enthielt, wurde eine PCR mit Mikrosatelliten durchgeführt, die in dem gesuchten Klon liegen sollten.

3.4.8.1.2 Nick-Translation

Die aufgereinigte DNA-Sequenz muss vor der Hybridisierung markiert werden. Hierzu wurde in der vorliegenden Studie die Nick-Translation verwendet. Die aufgereinigte BAC-DNA wird zunächst mit *DNAse* I angedaut. Das Enzym schneidet nur einen der beiden Doppelstränge, so dass der Doppelstrang in seiner Struktur erhalten bleibt. Im zweiten Schritt bearbeitet man das Template mit DNA-Polymerase I in Gegenwart von Nukleotiden, von denen eines mit Biotin markiert ist (in der vorliegenden Studie das dATP). Die Polymerase erkennt die Schnitte, die die *DNAse* I gesetzt hat und verlängert dort das freie 3'-Ende, während das 5'-Ende abgebaut wird. Somit wird der alte Strang durch einen neuen markierten Strang ersetzt.

Reagenzien

Für die Nick-Translation wurde das BioNick™ Labeling System der Firma Invitrogen, Karlsruhe verwendet.

Produkt aus <i>E. coli</i>		40µl
dNTP-Mix (0,2 mM jeweils dCTP, dGTP, dTTP; 0,1 mM dATP sowie 0,1 mM biotin-14-dATP)	10x	1x
Enzym-Mix mit Polymerase I und Dnase I sowie Puffer	10x	1x

Durchführung:

Die oben genannten Reagenzien wurden auf Eis lichtgeschützt zusammenpipettiert, gemischt und drei Stunden bei 16°C im Dunkeln inkubiert. Nach drei Stunden wurden 5 µl der Probe mit 5 µl Blaupuffer versetzt und auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen. Idealerweise sollten die Fragmente der Nick Translation etwa 600 bp lang sein. Sobald diese Größe erreicht war, wurde die Reaktion durch Zugabe von 5 µl Stopp-Mix beendet. Um überschüssige Reagenzien zu entfernen, wurde die Probe anschließend mit Hilfe des QIAquick® PCR Purification Kit aufgereinigt.

3.4.8.1.3 Entfernung repetitiver Sequenzen

Bei der Nick Translation entstehen durch die *DNAse* Fragmente die etwa 600 bp groß sind. Einige dieser Fragmente beinhalten jedoch repetitive Sequenzen, die unspezifisch mit den

Chromosomen hybridisieren würden. Um solche Kreuzhybridisierungen zu vermeiden ist es notwendig, diese unspezifischen Produkte zu entfernen. Es bleiben folglich nur spezifische Nukleotidsequenzen übrig, die mit der gewünschten chromosomalen Region hybridisieren. Die repetitiven Sequenzen werden zum einen durch COT-DNA, zum anderen durch Lachs-sperma entfernt. Humane COT-DNA besteht aus schnell renaturierenden repetitiven Sequenzen des gesamten menschlichen Genoms. Lachs-Sperma besitzt ähnliche repetitive Sequenzen wie die menschliche DNA. Durch Denaturierung und anschließende Renaturierung hybridisieren die unspezifischen Sequenzen mit der COT-DNA und dem Lachs-Sperma und können somit nicht mehr mit den Chromosomen interagieren.

Reagenzien

Produkt der Nick Translation	40 µl	
COT-DNA (1µg/µl)	5 µl	0,27 µg/µl
Lachs-Sperma (1µg/µl)	15 µl	0,8 µg/µl
3M Natriumacetat ($\text{Na}^+\text{CH}_3\text{COO}^-$) (pH 4,8)	6 µl	0,1 M
100% Ethanol	120 µl	65 Vol%
70% Ethanol	250 µl	
100% Formamid entionisiert	5 µl	

Durchführung:

40 µl des Produkts der Nick Translation wurden mit 5 µl COT-DNA und 15 µl Lachs-Sperma sowie 6 µl 3M Natriumacetat und 120 µl 100%igem Ethanol unter Lichtausschluss versetzt. Die Probe wurde bei -70°C für 30 min gelagert und anschließend für 30 min bei 4°C und 14000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und das Pellet mit 250 µl 70%igem Ethanol gewaschen. Die Probe wurde erneut bei 4°C und 14000 rpm 20 min zentrifugiert, der Überstand entfernt. Nachdem das Pellet getrocknet war, wurde es in 5 µl entionisiertem Formamid gelöst, gemischt, und 10-20 min im Wasserbad (37°C) gelöst.

3.4.8.1.4 Vorhybridisierung der Probe

Damit die COT-DNA und das Lachssperma besser mit den repetitiven Sequenzen hybridisieren, wird ein Hybridisierungsmix bestehend aus SSC-Puffer (Sodium chloride in trisodium

citrate) und Dextransulfat zur Sonde hinzugegeben. Durch Erwärmen der Probe auf 73°C werden somit die unspezifischen repetitiven Sequenzen an die COT-DNA und das Lachsperma gebunden und stehen somit nicht mehr für weitere Reaktionen zur Verfügung.

Reagenzien

Mastermix (2x SSC/20% Dextransulfat) 5 µl

Durchführung:

Zu dem in 5 µl Formamid gelösten Pellet wurde 5 µl Mastermix hinzugefügt. Nachdem die Probe mit Parafilm verschlossen wurde, wurde sie 20 min bei 37°C im Wasserbad gelöst. Anschließend erfolgte eine Denaturierung der Doppelstränge bei 73°C im Wasserbad. Ein Reannealing fand 1 Stunde bei 37°C statt.

3.4.8.2 FISH

3.4.8.2.1 Vorbehandlung des Objektträgers

Aus Lymphozyten der Patienten SRS 46 und SRS 90 wurden nach Standardverfahren Objektträger mit Metaphasen hergestellt. Die aufgetropften Metaphasen wurden aus Routineuntersuchungen zur Verfügung gestellt.

Damit die Sonde besser mit den Chromosomen hybridisieren kann, wird der Objektträger mit Pepsin vorbehandelt. Weiterhin wird durch mehrere Waschstapfen mit Ethanol eine Dehydrierung der Chromosomen erreicht, welches den Zugang der Sonden zu den Chromosomen erleichtert.

Reagenzien

2x SSC, pH 7

0,01 M HCl mit 0,01% Pepsin

70% Ethanol

80% Ethanol

100% Ethanol

70% deionisiertes Formamid in 2x SSC, pH 7

Durchführung:

Nachdem der Objektträger 30 min bei 37°C mit 2xSSC inkubiert wurde, wurde er für 5 min mit 0,01 M HCl und 0,01% Pepsin behandelt. Anschließend wurde er kurz mit 0,01 M HCl gewaschen und jeweils 2 min in 70%/80%/100% Ethanol dehydriert. Nach einer 5-10 minütigen Trocknung des Trägers, wurde er zwei Minuten bei 73,5°C mit 70% deionisiertem Formamid in 2x SSC behandelt, welches zu einer Denaturierung der Chromosomen führt. Anschließend wurde erneut mit 70%/80%/100% Ethanol auf Eis gewaschen und der Objektträger 15 Minuten getrocknet.

3.4.8.2.2 Hybridisierung

Nachdem sowohl die Chromosomen des Objektträgers als auch die Sonde denaturiert sind, wird die Probe auf den Objektträger gegeben. Die Hybridisierung der Sonden benötigt mindestens 16 Stunden. Um eine Hintergrundfluoreszenz durch nichthybridisierte Sonden zu vermeiden, müssen nach der Hybridisierung die Sondenreste vom Objektträger durch Waschen mit deionisiertem Formamid und SSC-Puffer entfernt werden.

Durchführung:

Nachdem die Sonde kurz zentrifugiert wurde, wurden 10 µl auf den Objektträger aufgetragen. Der Objektträger wurde dann mit einem Deckglas und Fixogum luftdicht verschlossen. In einer feuchten Kammer bei 37°C wurde die Probe für 16 Stunden inkubiert. Nach der Hybridisierung der Sonde an die Zielsequenz, wurden die überschüssigen Sondenreste nach Entfernen des Deckgläschens 15 Minuten mit 50% deionisiertem Formamid in 2x SSC-Puffer bei 43°C gewaschen. Schließlich wurde der Objektträger 10 Sekunden bei Raumtemperatur in PBD-Puffer gewaschen und ohne auszutrocknen weiterverarbeitet.

3.4.8.2.3 Detektion von Biotin markierten Proben

Um die mit Biotin markierten Proben unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennen zu können, müssen die Sonden mit fluoreszierenden Substanzen markiert werden. Hierzu werden gegen das Biotin gerichtete Antikörper verwendet, die mit FITC gekoppelt sind (FITC-Avidin). FITC (Fluorescein Isothiocyanat) fluoresziert unter dem Mikroskop gelb-grün. Um das Fluoreszenzsignal zu verstärken, wird in einem zweiten Schritt ein biotinylierter Antikörper (Anti-Avidin), der gegen das Avidin gerichtet ist, hinzugefügt (Abb. 3.1). An diesen können bis zu vier Biotinmoleküle gebunden sein. Nach erneuter Zugabe von FITC-Avidin kann das Signal

somit verstärkt werden, da an jedem biotinylierten Nukleotid bis zu 5 fluoreszierende Antikörper gebunden werden können.

Um auch die Chromosomen unter dem Fluoreszenzmikroskop erkennen zu können, findet eine Gegenfärbung der Chromosomen mit 4',6-Diamino-2-Phenylidol (DAPI) statt. DAPI führt zu einer Blaufärbung der Chromosomen. Mit Hilfe bestimmter Filter können die Chromosomen- wie auch die Sondensignale unter dem Mikroskop erfasst werden.

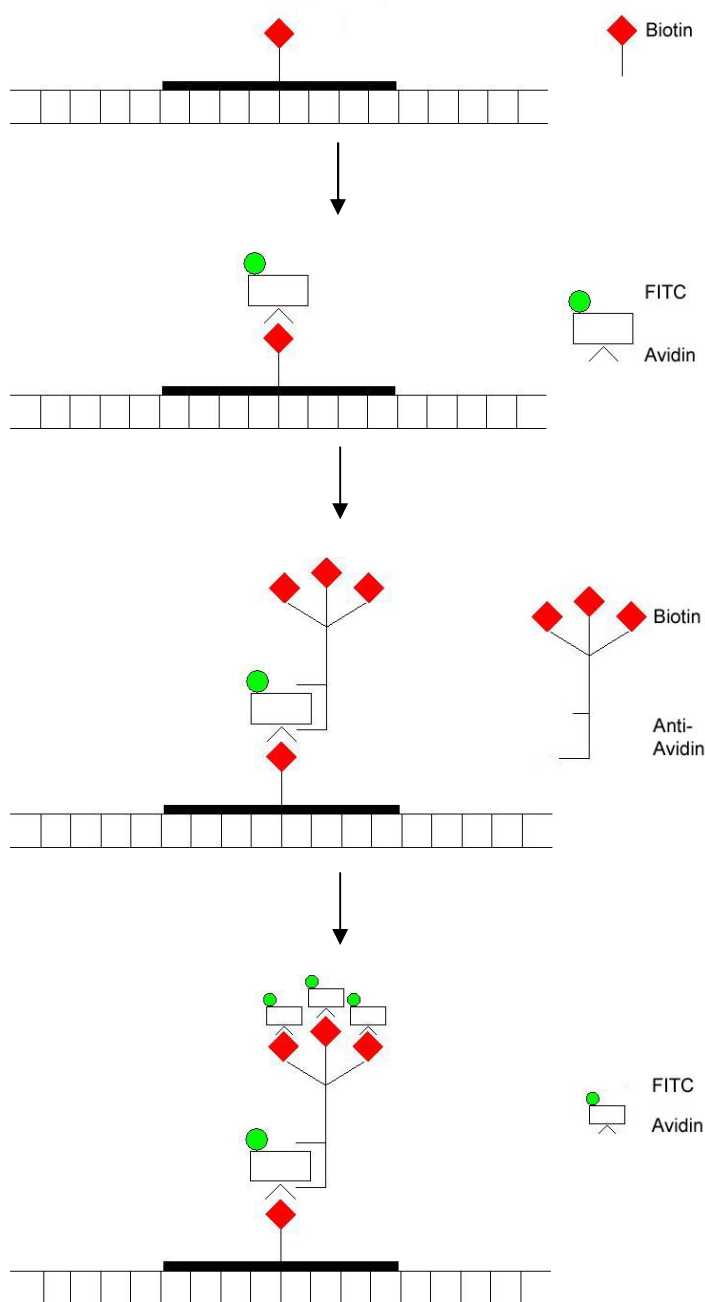


Abb. 3.1: Prinzip der FISH mit Verstärkung des Fluoreszenzsignals

Reagenzien

ISH Blocking Solution (Konzentration nach Herstellerangabe)	1200 µl
FITC-Avidin in ISH Blocking Solution (1:99)	200 µl
PBD	
Anti-Avidin in ISH Blocking Solution (1:99)	100 µl
DAPI	200 µl

Durchführung:

Zuerst wurde 300 µl ISH Blocking Solution (37°C) auf den Objektträger aufgetragen, mit einem Deckglas abgedeckt und im Dunkeln 30 Minuten bei 37°C in einer feuchten Kammer inkubiert. ISH Blocking Solution bindet an unspezifische Proteine auf dem Objektträger, so dass diese der Reaktion mit der Sonde nicht mehr zur Verfügung stehen. Anschließend wurde 100 µl FITC-Avidin hinzugefügt und erneut unter Lichtausschluss 30 Minuten in der feuchten Kammer inkubiert. Der Objektträger wurde dann dreimal für zwei Minuten in PBD-Puffer gewaschen, um überschüssiges FITC-Avidin zu entfernen. Nachdem die Reaktion durch Zugabe von Blocking Solution für 5 Minuten beendet wurde, wurde 100 µl Anti-Avidin aufgetragen. Die Reaktion fand bei 37°C für 30 Minuten in der feuchten Kammer statt. Der Objektträger wurde erneut drei Mal für zwei Minuten mit PBD-Puffer gewaschen und 5 Minuten mit ISH Blocking Solution inkubiert. Anschließend wurde FITC-Avidin aufgetragen und in der feuchten Kammer 30 Minuten inkubiert. Schließlich wurde der Objektträger in PBD gewaschen, ein letztes Mal mit Blocking Solution versetzt und durch Zugabe von 200 µl DAPI versetzt. Nach einer 20 minütigen Inkubation bei Raumtemperatur wurde der Objektträger mit Aqua dest. gewaschen und im Dunkeln getrocknet. Da die fluoreszierenden Moleküle sehr lichtempfindlich sind, werden vor der Eindeckelung drei Tropfen Antifade auf den Objektträger gegeben. Die Chromosomen können dann unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht werden.

4 Ergebnisse

4.1 UPD 11

In der vorliegenden Studie wurden 46 Patienten und ihre Eltern auf eine mUPD11 untersucht. Dabei wurden verschiedene Mikrosatellitenmarker im Bereich 11p15 verwendet, die distal und proximal zu den IGF2- und CDKN1C-Genen liegen (Abb. 4.1). Die Fragmente wurden mittels elektrophoretischer Auftrennung auf PAA-Gelen analysiert.

Bei sämtlichen Patienten und deren Eltern wurden die Marker D11S1984, D11S4177, D11S4046 und D11S1318 untersucht. Falls diese nicht aussagekräftig waren, so wurden zusätzlich die Marker D11S922 und D11S1758 analysiert (s. Tab. 7.16).

Die Mikrosatellitenmarker D11S4177 und D11S4046 wurden mittels Silberfärbung (s. Kap.4.3.4.1), die restlichen Marker mit Hilfe eines automatischen Sequenzierers detektiert (s. Kap. 4.3.4.2)

Die Ergebnisse der Untersuchung sind im Anhang in den Tabellen 7.10 – 7.15 dargestellt.

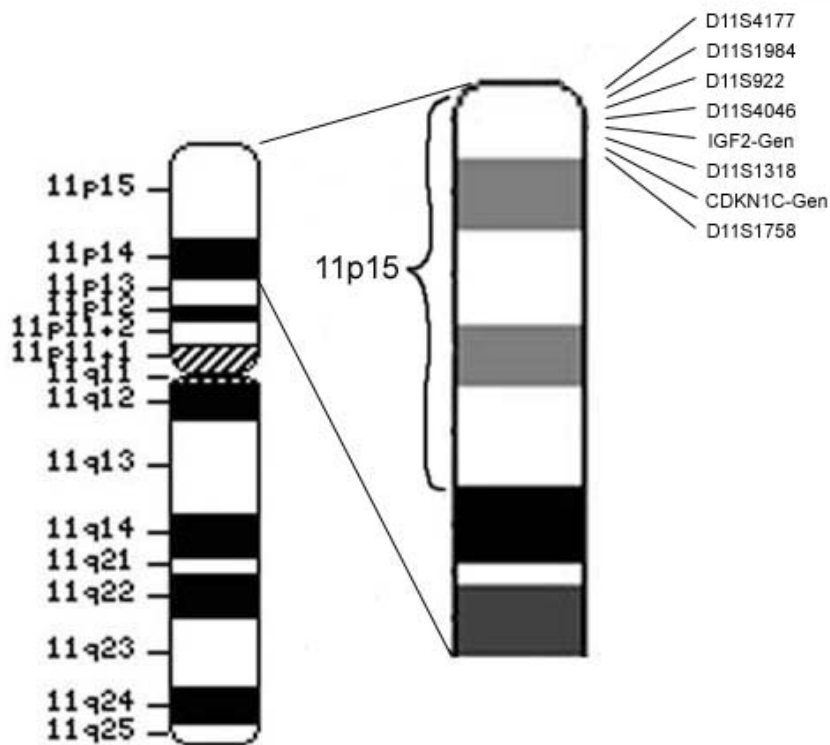


Abb. 4.1: Lokalisation der Mikrosatellitenmarker und der IGF2- und CDKN1C-Gene im Bereich 11p15

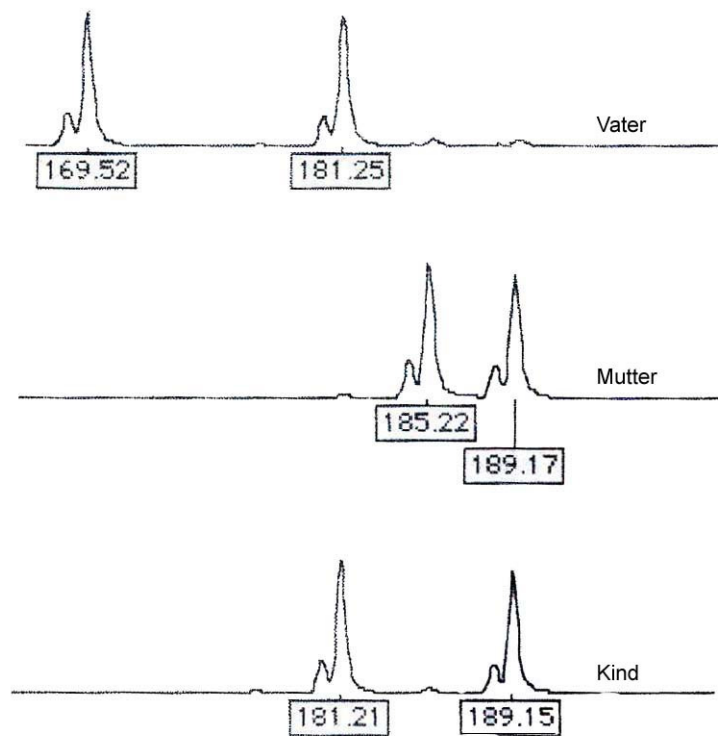


Abb. 4.2: Beispiel eines unauffälligen Elektropherogramms des Markers D11S1984. Das Kind hat sowohl ein mütterliches als auch ein väterliches Allel geerbt.

Bei Familie 17 lag nur die DNA des Vaters und des Patienten vor. In den Elektropherogramm des Markers D11S1984 fiel auf, dass der Patient kein väterliches Allel geerbt hat. Als Ursache kommt sowohl eine mUPD11 als auch eine falsche Vaterschaft in Frage. Zur Untersuchung der Vaterschaft wurden weitere Marker auf anderen Chromosomen untersucht. Auch bei den Markern D6S308 und D7S621 ließ sich beim Patienten kein väterliches Allel darstellen, so dass der angegebene Vater als leiblicher ausgeschlossen wurde (s. Tab. 7.18).

Bei den weiteren 45 untersuchten Patienten und deren Familien konnte eine UPD11 ausgeschlossen werden. Weiterhin konnte bei diesen Patienten keine partielle UPD des Bereichs 11p15.5 detektiert werden.

4.2 Duplikationen der Region 11p15

4.2.1 Mikrosatellitenanalyse

Mit Hilfe der fluoreszenzmarkierten Marker D11S1984, D11S4177, D11S4046 und D11S1318 ließen sich zusätzlich Duplikationen des Bereichs 11p15 detektieren (Tab. 7.17). Da die Patienten bei der Untersuchung auf eine vorliegende UPD teilweise mit Hilfe dersel-

ben fluoreszenzmarkierten Mikrosatellitenmarkern untersucht worden waren, konnten die schon vorhandenen Daten übernommen werden (s. Kap. 4.1).

Bei den Patienten SRS 46 und SRS 90 fiel in der Auswertung der Ergebnisse des Elektropherogramms auf, dass das von der Mutter stammende Allel im Vergleich zu dem väterlichen Allel eine verstärkte Fluoreszenz aufwies (Abb. 4.3 und 4.4). Diese Beobachtung konnte in mehreren Wiederholungen bestätigt werden, so dass ein Artefakt ausgeschlossen wurde. Dies führt zu der Vermutung, dass eine Duplikation des mütterlichen Allels vorliegt.

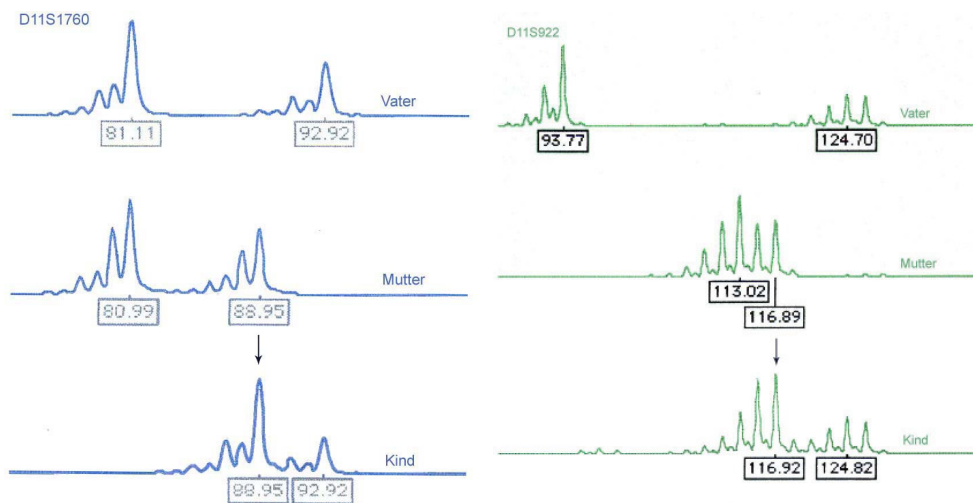


Abb. 4.3: Elektropherogramme der Familie SRS 46; bei dem Patienten SRS 46 ist eine verstärkte Fluoreszenz des maternalen Allels im Vergleich zum paternalen erkennbar

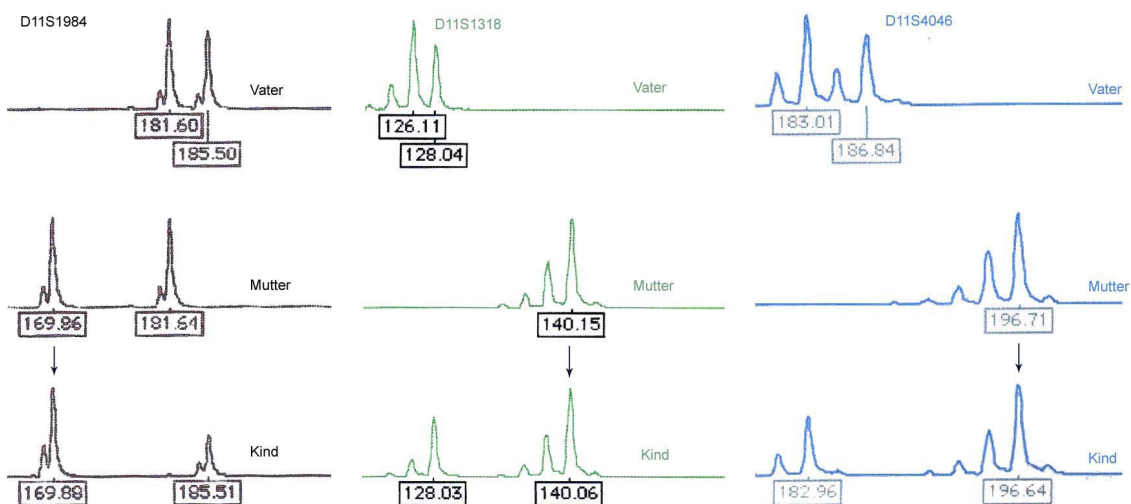


Abb. 4.4: Elektropherogramme der Familie SRS 90; das Fluoreszenzsignal des paternalen Allels von Patient SRS 90 ist deutlich schwächer als das Signal des maternalen Allels

Um die Größe des duplizierten Chromosomenabschnitts näher einzugrenzen, wurden für diese beiden Familien weitere Marker untersucht (Abb. 4.5). Die Ergebnisse sind für beide Familien in Tab. 4.1 dargestellt.

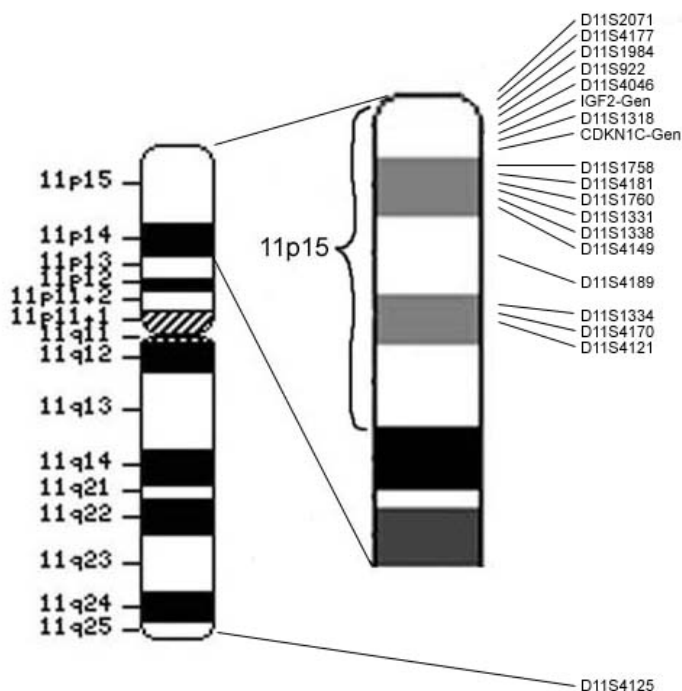


Abb. 4.5: Darstellung der verwendeten Marker zur Eingrenzung des duplizierten Bereichs bei den Patienten SRS 46 und SRS 90

Marker	Lokalisation (Mb von 11pter)	Vater SRS 46	Mutter SRS 46	Kind SRS 46	Vater SRS 90	Mutter SRS 90	Kind SRS 90
D11S2071	0,95	2,3	1,4	1,1,3	1,2	3,4	1,3,3
D11S4177	1,45	1,3	1,2	1,1,3	---	---	1,1
D11S1984	1,53	1,2	1,1	1,1	2,3	1,2	1,1,3
D11S922	1,57	1,4	2,3	3,3,4	1,1	2,3	1,3,3
D11S4046	1,92	1,2	1,1	1,1,2	1,2	3,3	1,3,3
D11S1318	2,29	2,4	1,3	3,3,4	1,2	3,3	1,3,3
D11S4088	2,71	2,2	1,1	1,1,2	1,4	2,3	3,3,4
D11S1758	4,70	2,2	1,3	1,1,2	---	---	1,1
D11S4181	4,73	1,1	2,3	1,2,2	---	---	1,1
D11S1760	5,34	1,3	1,2	2,2,3	3,4	1,2	1,1,4
D11S1338	5,95	1,2	1,2	2,2	1,2	2,2	1,2
D11S1331	7,15	2,3	1,2	1,1,2	1,2	2,2	1,2,2
D11S4149	9,09	1,2	2,2	2,2	2,2	1,2	2,2
D11S4189	11,45	1,1	2,3	1,2	1,1	2,2	1,2
D11S1334	12,81	1,3	2,3	2,3	1,3	2,2	2,3
D11S4170	14,37	2,3	1,3	1,3	1,2	1,3	1,3
D11S4121	15,24	2,3	1,2	1,2	1,2	1,1	1,2
D11S4125	133,98	1,2	3,4	1,3	1,4	2,3	1,2

Tab. 4.1: Ergebnisse der Fragmentanalyse der Familien SRS 46 und SRS 90

Bei den Patienten SRS 46 und SRS 90 liegt aufgrund dieser Ergebnisse eine mindestens 7,15 Mb große Duplikation des Bereichs 11p15 vor.

4.2.2 FISH

Bei den Patienten SRS 46 und SRS 90 wurde auf Grund der Ergebnisse der Fragmentanalyse (s. Kap. 4.2.1) eine Duplikation des maternalen Chromosoms 11 im Bereich 11p15 vermutet. Um diese Vermutung zu bestätigen, wurde an Chromosomenpräparaten der Patienten SRS 46 und SRS 90 eine FISH durchgeführt. Es wurde eine Sonde, die in dem nicht-duplizierten Bereich liegt (RP11-89P14) und eine Sonde (RP11-89F15), die in dem vermutlich duplizierten Bereich liegt, verwendet.

Unter dem Fluoreszenzmikroskop konnte mit Hilfe der Sonde RP11-89F15 bei beiden Patienten die Duplikation bestätigt werden. In der Abb. 4.6 ist eine FISH des Patienten SRS 90 mit der Sonde RP11-89F15 dargestellt. Auf den beiden Chromosomen 11 ist ein Signal zu sehen. Zusätzlich kann auf einem Chromosom 15 ein weiteres Signal beobachtet werden, welches dem duplizierten Material des Chromosoms 11 entspricht.

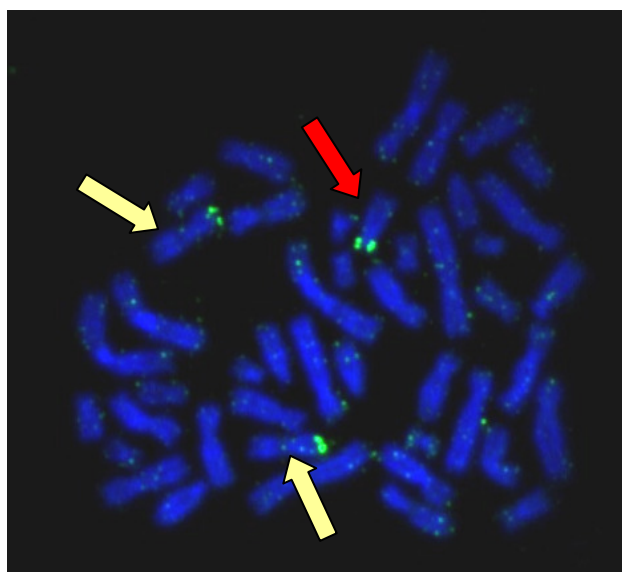


Abb. 4.6: FISH mit der Sonde RP11-89F15 und dem Chromosomenpräparat des Patienten SRS 90. Die gelben Pfeile markieren die beiden Chromosomen 11, der rote Pfeil markiert eines der Chromosomen 15 mit dem duplizierten Material des Chromosoms 11

4.3 Detektion von Varianten im IGF2-Gen mittels SSCP

Bei der Durchmusterung der 9 Exone sowie Exon-Intron-Übergängen des IGF2-Gens auf genetische Varianten mit Hilfe der SSCP wurden im Intron 2 und in den Exonen 3, 4, 5 und 6 sowie im 5'UTR und 3'UTR Auffälligkeiten entdeckt. Bei der anschließenden Sequenzierung der auffälligen Patienten konnten die Auffälligkeiten in den Exonen 4 und 5 nicht bestätigt werden.

Bei der Sequenzierung der anderen auffälligen Muster wurden folgende Varianten detektiert (Tab. 4.2 und Abb. 4.7):

Im Intron 2 wurde an der Stelle g.1156 eine bekannte Variante (g.1156 T>C) nachgewiesen. Ebenso wurden im Exon 3 (g.1252 T>C) sowie im 5'UTR (g.6814_6819 delAGGGC) und 3'UTR (g.1926 C>G) bekannte Varianten detektiert. Im Exon 6 wurde an der Stelle g.4225 eine bisher unbekannte Variante (g.4225 A>G) entdeckt.

Exon/Intron	Variante	Literatur
5'UTR	g.6814_6819 delAGGGC	Lucassen et al. 1993
Intron 2	g.1156 T>C	Gaunt et al. 2001
Exon 3	g.1252 T>C	Lucassen et al. 1993
Exon 6	g.4225 A>G	-----
3'UTR	g.1926 C>G	Gaunt et al. 2001

Tab. 4.2: Übersicht über die entdeckten Varianten im IGF2-Gen

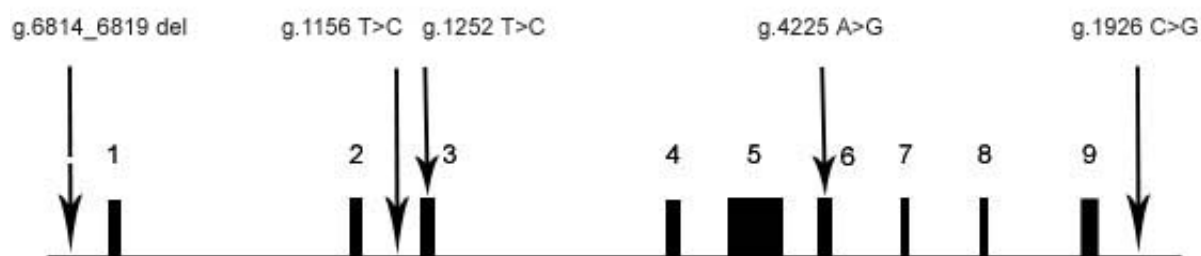


Abb. 4.7: Varianten im IGF2-Gen. Nummerierte Kästen entsprechen den Exonen, Pfeile entsprechen den detektierten Varianten (angelehnt an Gaunt et al. 2001)

Um das Auftreten der Varianten und ihrer Häufigkeit bei nicht-betroffenen Personen nachzuweisen, wurden gesunde Kontrollpersonen untersucht.

Die kompletten Genotypen der Patienten und Kontrollpersonen sind im Anhang tabellarisch dargestellt (Tab. 7.19 – 7.22).

4.3.1 g.6814_6819 delAGGGC, 5'UTR (Lucassen et al. 1993)

Bei der SSCP mit dem PCR-Produkt 5'UTR 1/2 trat bei den Bedingungen 4°C mit und ohne Glycerolzusatz sowie bei Raumtemperatur mit Glycerolzusatz drei unterschiedliche Bandenmuster auf (Abb. 4.8).

In der nachfolgenden Sequenzierung der Patienten 16, 17 und 22 zeigte sich, dass bei Patient 16 eine homozygote Deletion der 5 Basen AGGGC an der Stelle g.6814 vorlag. Der Patient 17 besaß an dieser Stelle eine homozygote Insertion der 5 Basen, Patient 22 hingegen war für die Variante heterozygot (Abb. 4.9).

Im ersten Schritt wurden 40 Patienten auf die Variante untersucht. Am häufigsten wurde der für die Insertion homozygote Genotyp nachgewiesen. Er wurde bei 17 Patienten entdeckt (Tab. 4.3). Der heterozygote Genotyp trat bei 14 Patienten auf, der für die Deletion homozygote Genotyp trat bei 9 Patienten auf. Alle drei Varianten konnten auch bei dem Kontrollenkollektiv detektiert werden. Die 68 untersuchten Kontrollen „T“ wiesen eine andere Häufigkeitsverteilung als die Patienten auf (Tab. 4.3). Auch bei den Kontrollen wurde die für die Insertion homozygote Variante am häufigsten gefunden (40 Kontrollen). 26 der Kontrollen „T“ stellten sich als heterozygote Genotypen dar, und nur 2 der 68 Kontrollen wiesen eine homozygote Deletion auf (Tab. 4.3). Die homozygote Deletion trat bei den Kontrollen „T“ mit einer Häufigkeit von 2,9% im Vergleich zu einer Häufigkeit von 22,5% bei den Patienten auf. Es zeigte sich nach einer statistischen Analyse dieser Daten ein statistisch-signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen „T“ ($p < 0,01$).

Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden weitere 19 Patienten untersucht. Es ergab sich folgende Häufigkeitsverteilung: Die homozygote Insertion trat acht Mal auf, die heterozygote Variante konnte bei 9 Patienten gefunden werden und eine homozygote Deletion wurde bei 2 Patienten nachgewiesen. Fasst man diese Zahlen mit den ursprünglich untersuchten Patienten zusammen, ergeben sich daraus folgende Häufigkeiten der Variante: Von den 59 untersuchten Patienten lag bei 39% eine Heterozygotie vor, 42,4% der Patienten stellten sich als homozygot für die Insertion dar und 18,6% der Patienten wiesen eine homozygote Deletion auf (Tab. 4.3).

Außerdem wurden 66 weitere Kontrollen untersucht, bei denen aber weder die Herkunft noch die Körpergröße bekannt war (Kontrollen „B“). Dabei zeigte sich im Vergleich zu den Kontrollen „T“ eine andere Häufigkeitsverteilung der Variante: Die homozygote Deletion ließ sich bei 12,1% der Kontrollen nachweisen, 42,4% der Kontrollen wiesen eine Heterozygotie auf und 45,5% der Kontrollen waren homozygot für die Insertion (Tab. 4.3). Diese Daten zeigen im Vergleich zu den Patienten keinen statistisch-signifikanten Unterschied.

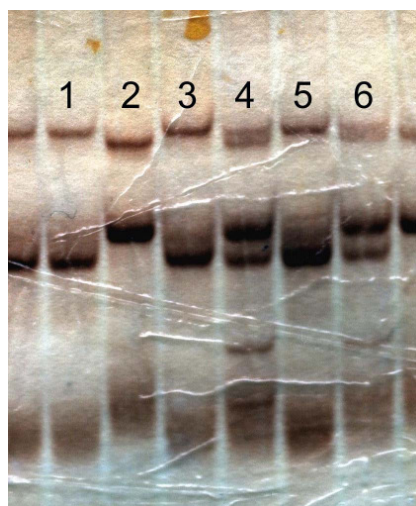


Abb. 4.8: SSCP des Fragments 5'UTR (4°C mit Glycerol). *Bahn 1,3,5:* Patienten SRS 14,17,26 mit Genotyp wt/wt; *Bahn 2:* Patient SRS 16 mit Genotyp del/del; *Bahn 4 und 6:* Patienten SRS 22 und 27 mit Genotyp wt/del

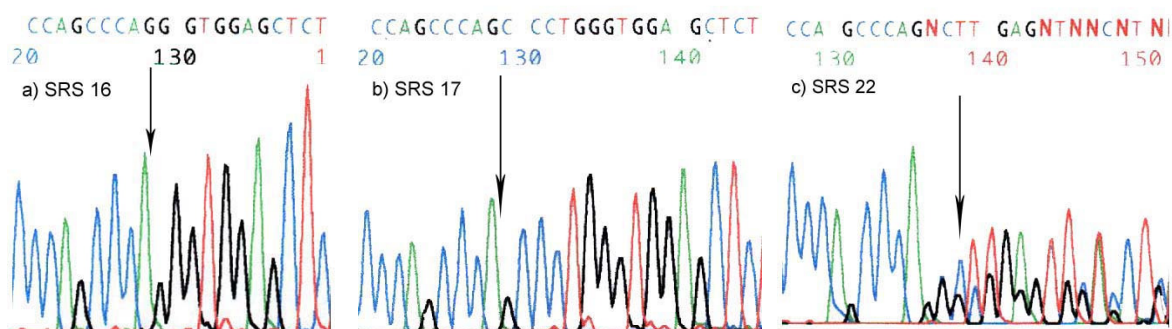


Abb. 4.9: Darstellung der Variante g.6814_6819 delAGGGC mittels Sequenzierung. a) SRS 16 Genotyp del/del, b) SRS 17 Genotyp wt/wt, c) SRS 22 Genotyp wt/del (die angegebene Sequenz entspricht dem Gegenstrang)

Genotyp	Häufigkeit SRS-Patienten (n=59)	Häufigkeit Kontrollen „T“ (n=68)	Häufigkeit Kontrollen „B“ (n=66)
wt/wt	42,4% (25)	58,8% (40)	45,5% (30)
wt/del	39,0% (23)	38,2% (26)	42,4% (28)
del/del	18,6% (11)	2,9% (2)	12,1% (8)

Tab. 4.3: Frequenzen der einzelnen Genotypen der Variante g.6814_6819 delAGGGC in SRS-Patienten, Kontrollen „T“ und Kontrollen „B“

4.3.2 g.1156 T>C, Intron 2 (Gaunt et al. 2001)

Bei der Untersuchung von Exon 3 mittels SSCP fielen in den Gelen mit Glycerolzusatz bei 4°C unterschiedliche Bandenmuster auf (Abb. 4.10). Es wurden wieder drei Mustervarianten, den drei Genotypen entsprechend, detektiert. Die nachfolgende Sequenzierung der Patienten SRS 12, SRS 13 und SRS 16 ergab folgendes Ergebnis (Abb. 4.11): An der Nukleotidposition g.1156 wurde eine schon bekannte Variante entdeckt. Diese besteht aus einem Austausch von Thymin gegen Cytosin.

Bei den Patienten wurde der Wildtyp (T/T) am häufigsten gefunden. Sie trat bei 18 der 40 untersuchten Patienten auf. Eine Heterozygotie (T/C) lies sich bei 17 Patienten nachweisen, der homozygote Genotyp (C/C) wurde bei 5 Patienten detektiert (Tab. 4.4).

Bei den 50 untersuchten Kontrollen „T“ ließen sich ähnliche Häufigkeiten der Variante nachweisen: Der Genotyp (T/T) wurde in dem Patientenkollektiv in 45% und im Kontrollkollektiv in 44% der Fälle gefunden. Eine Heterozygotie (T/C) ließ sich bei 42,5 % der Patienten und 52 % der Kontrollen nachweisen. Die seltenste Variante (C/C) lag bei 12,5% der Patienten und bei 4 % der Kontrollen vor (Tab. 4.4)

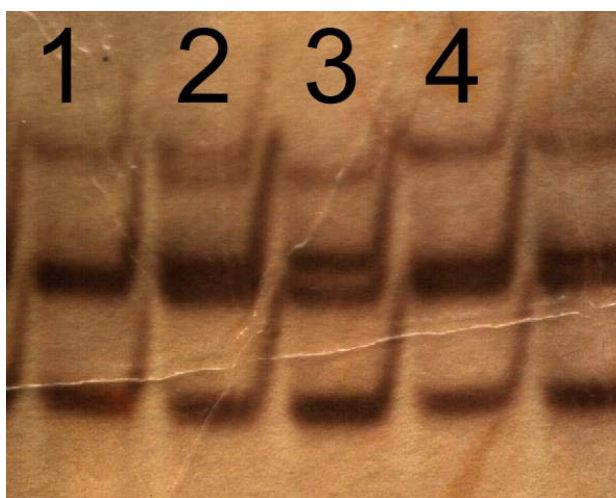


Abb. 4.10: SSCP des Fragments Exon 3 1/2 (4°C mit Glycerol) *Bahn 1 und 4:* Patienten 6 und 14 mit Genotyp T/T; *Bahn 2:* Patient 12 mit Genotyp T/C; *Bahn 3:* Patient 13 mit Genotyp C/C

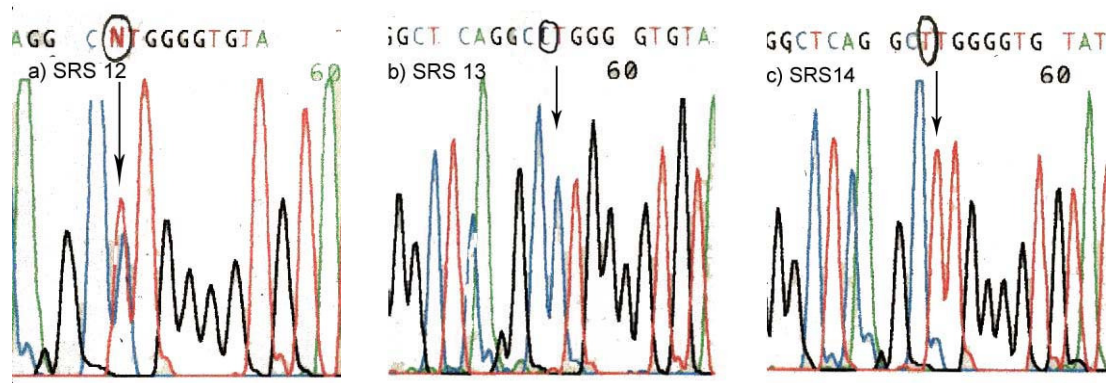


Abb. 4.11: Darstellung der Variante g.1156 T>C mittels Sequenzierung. a) SRS 12 Genotyp T/C, b) SRS 13 Genotyp C/C, c) SRS 14 Genotyp T/T

Genotyp	Häufigkeit SRS-Patienten (n=40)	Häufigkeit Kontrollen „T“ (n=50)
T/T	45,0% (18)	44,0% (22)
T/C	42,5% (17)	52,0% (26)
C/C	12,5% (5)	4,0% (2)

Tab. 4.4: Frequenzen der einzelnen Genotypen der Variante g.1156 T>C im Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv „T“

4.3.3 g.1252 T>C, Exon 3 (Lucassen et al. 1993)

Die SSCP des zweiten Teils von Exon 3 zeigt bei Raumtemperatur ohne Glycerolzusatz drei verschiedene Bandenmuster (Abb. 4.12). Das häufigste Muster (Abb. 4.12 *Bahn 1*) wurde bei 25 Patienten beobachtet. Dieses Muster entsprach in der Sequenzierung dem heterozygoten Genotyp T/C (Abb. 4.13). Der Wildtyp T/T wurde bei 9 Patienten und der homozygote Genotyp C/C bei 6 Patienten gefunden. Bei 62,5% der Patienten lag Heterozygotie vor, 22,5% der Patienten entsprachen dem Wildtypen und 15% der Patienten wiesen einen homozygoten Austausch von Thymin gegen Cytosin auf.

In den untersuchten Kontrollen „T“ wurde diese Variante in einer statistisch signifikanten unterschiedlichen Verteilung detektiert (Tab. 4.5). Bei den 50 untersuchten Kontrollen „T“ war der heterozygote Genotyp die häufigste Variante. Sie trat bei den Kontrollen ähnlich wie bei den Patienten (62,5%) in 60% der Fälle auf. Allerdings zeigte sich ein Unterschied in der Verteilung der homozygoten Genotypen: Eine Homozygotie T/T konnte nur in 6% der Kontrollen nachgewiesen werden. Der homozygote C/C-Genotyp dagegen trat in 34% der Kontrollen auf (Tab. 4.5)

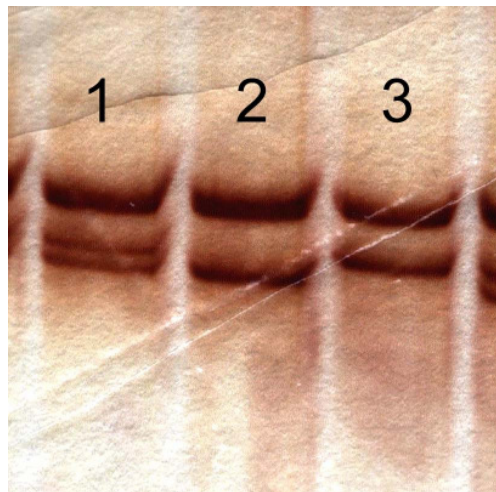


Abb. 4.12: SSCP des Fragments IGF2 3 3/4 (Raumtemperatur). *Bahn 1:* Patient SRS 3 mit Genotyp T/C; *Bahn 2:* Patient SRS 5 mit Genotyp T/T; *Bahn 3:* Patient SRS 6 mit Genotyp C/C

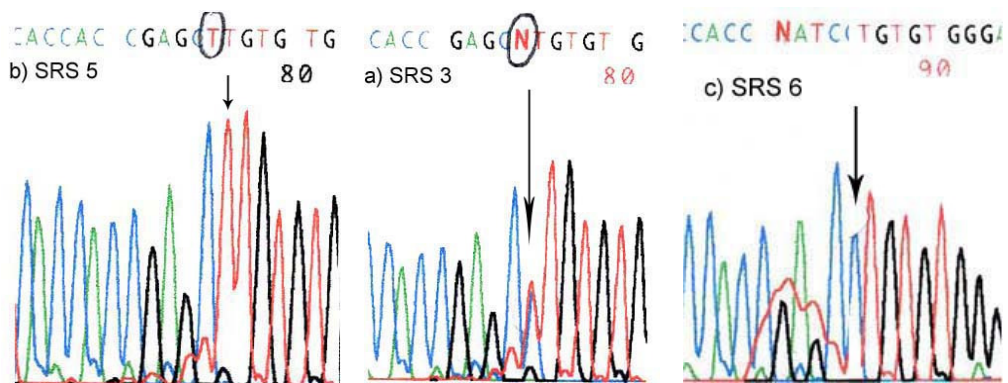


Abb. 4.13: Darstellung der Variante g.1252 T>C mittels Sequenzierung. a) SRS 3 Genotyp T/C, b) SRS 5 Genotyp T/T, c) SRS 6 Genotyp C/C

Genotyp	Häufigkeit SRS-Patienten (n=40)	Häufigkeit Kontrollen „T“ (n=50)
T/T	22, % (9)	6,0% (3)
T/C	62,5% (25)	60,0% (30)
C/C	15,0% (6)	34,0% (17)

Tab. 4.7: Frequenzen der einzelnen Genotypen der Variante g.1252 T>C im Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv „T“

4.3.4 g.4225 A>G, Exon 6

In der SSCP von Exon 6 wurden mit dem Primerpaar 6 3/4 ebenfalls drei verschiedene Bandenmuster bei den Bedingungen Raumtemperatur mit (Abb. 4.14) und ohne Glycerolzusatz sowie 4°C ohne Glycerolzusatz detektiert. Eine Basenveränderung wurde über die Sequenzierung der Patienten SRS 12, SRS 13 und SRS 16 bestätigt (Abb. 4.15). An der Nukleotidposition g.4225 wurde ein Austausch von Adenin gegen Guanin entdeckt. Diese in der Literatur noch nicht beschriebene Variante konnte sowohl im Patientenkollektiv als auch im Kontrollkollektiv „T“ nachgewiesen werden. Allerdings unterscheiden sich die beiden Kollektive in der Häufigkeitsverteilung des Varianten. Heterozygotie trat bei 50% der 39 untersuchten Patienten und bei 58% der 50 untersuchten Kontrollpersonen T auf. Ein Unterschied zeigte sich in der Verteilung der homozygoten Genotypen. Der homozygote Genotyp A/A wurde bei 5% der Patienten, der Genotyp G/G bei 45% der Patienten beobachtet. In dem Kontrollkollektiv dagegen wurde bei 24% der Personen der Wildtyp und bei 18% eine Homozygotie G/G nachgewiesen (Tab. 4.6).

Es wurden daraufhin weitere 19 Patienten und 43 Kontrollen „B“ untersucht. Bei dem Kontrollkollektiv „B“ wurde eine Heterozygotie in 39,5% der untersuchten Personen, der Wildtyp A/A in 16,3% und der homozygote G/G-Genotyp in 44,2% detektiert. 10 der zusätzlich untersuchten Patienten besaßen den heterozygoten Genotypen, 2 den A/A-Genotypen und 7 Patienten den G/G-Genotypen. Wenn man diese Daten mit den vorherigen Zahlen des ursprünglichen Patientenkollektivs zusammenfasst, ergibt sich die folgende Häufigkeitsverteilung (Tab. 4.6): 6,8% der Patienten besitzen die A/A-Variante (vorher 5%), 50,8% die heterozygote Variante (vorher 50%) und 42,4% die G/G-Variante (vorher 45%). Hier liegt wie bei der Variante g.6814_6819 delAGGGC (s. Kap. 4.3.1) ein statistisch-signifikanter Unterschied zwischen Patienten und Kontrollen „T“, nicht aber zwischen Patienten und Kontrollen „B“ vor.

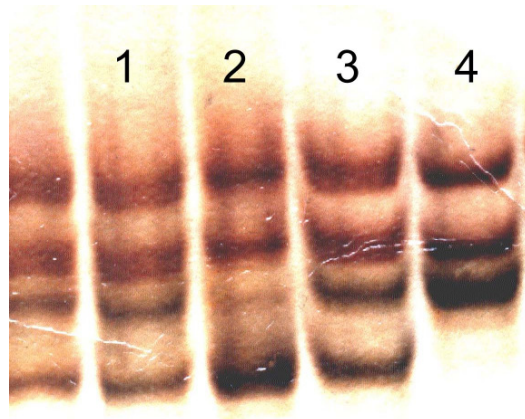


Abb. 4.14: SSCP des Fragments IGF2 6 3/4 (Raumtemperatur). *Bahn 1 und 3:* Patienten SRS 12 und SRS 14 mit Genotyp A/G; *Bahn 2:* Patient SRS 13 mit Genotyp A/A; *Bahn 3:* Patient SRS 16 mit Genotyp G/G

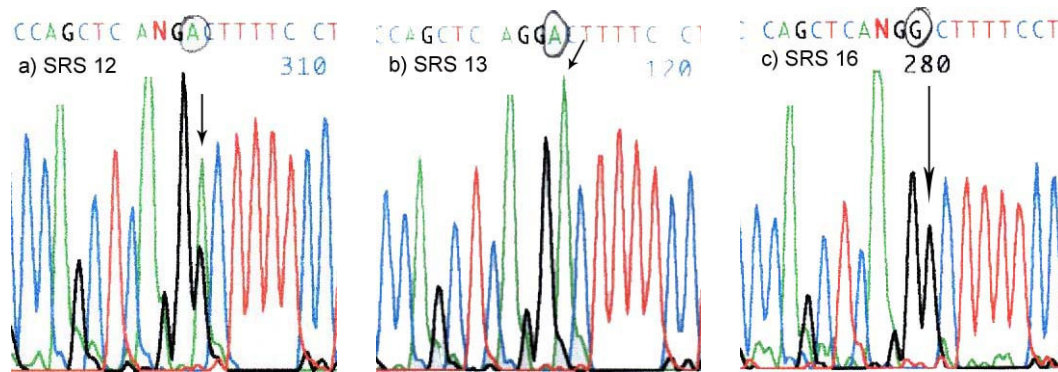


Abb. 4.15: Darstellung der Variante g.4225 A>G mittels Sequenzierung. a) SRS 12 Genotyp A/G, b) SRS 13 Genotyp A/A, c) SRS 16 Genotyp G/G

Genotyp	Häufigkeit SRS-Patienten (n=59)	Häufigkeit Kontrollen „T“ (n=50)	Häufigkeit Kontrollen „B“ (n=43)
A/A	6,8% (4)	24,0% (12)	16,3% (7)
A/G	50,8% (30)	58,0% (29)	39,5% (17)
G/G	42,5% (25)	18,0% (9)	44,2% (19)

Tab. 4.6: Frequenzen der einzelnen Genotypen der Variante g.4225 A>G im Patientenkollektiv sowie Kontrollkollektiv „T“ und „B“

4.3.5 g.1926 C>G, 3'UTR (Gaunt et al. 2001)

Die SSCP mit den PCR-Produkten der Primerpaare 3'-UTR lieferte drei unterschiedliche Bandenmuster entsprechend den Genotypen C/C, C/G und G/G (Abb. 4.16), die in 14, 21

bzw. 5 SRS-Patienten beobachtet wurden. Das unterschiedliche Bandenmuster konnte bei allen 4 SSCP-Bedingungen beobachtet werden. Die Variante ließ sich durch Sequenzierung der Patienten SRS 70, SRS 71 und SRS 76 bestätigen (Abb. 4.17). An der Stelle g.1926 wurde Cytosin gegen Guanin ausgetauscht. Bei dem Kontrollkollektiv „T“ lag eine etwas andere Häufigkeitsverteilung vor (Tab. 4.7): Der Genotyp C/C ließ sich bei 25 Personen nachweisen, eine Heterozygotie wurde bei 21 der 49 Kontrollpersonen detektiert und bei den restlichen 3 Personen trat der Genotyp G/G auf (Tab. 4.7).

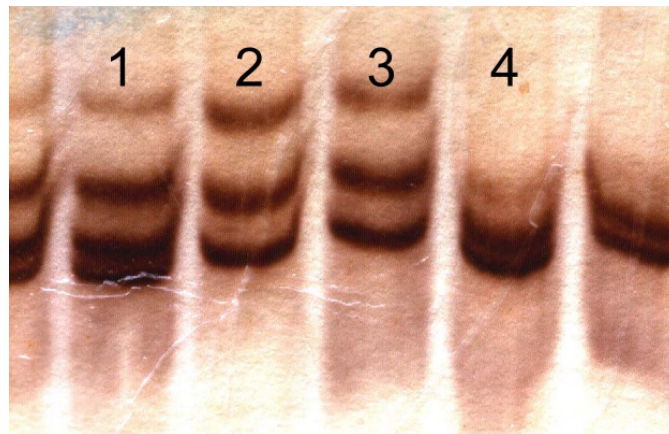


Abb. 4.16: SSCP des Fragments IGF2 3'UTR (4°C). *Bahn 1:* Patient SRS 70 mit Genotyp C/G; *Bahn 2 und 3:* Patienten SRS 71 und SRS 73 mit Genotyp C/C; *Bahn 4:* Patient SRS 76 mit Genotyp G/G

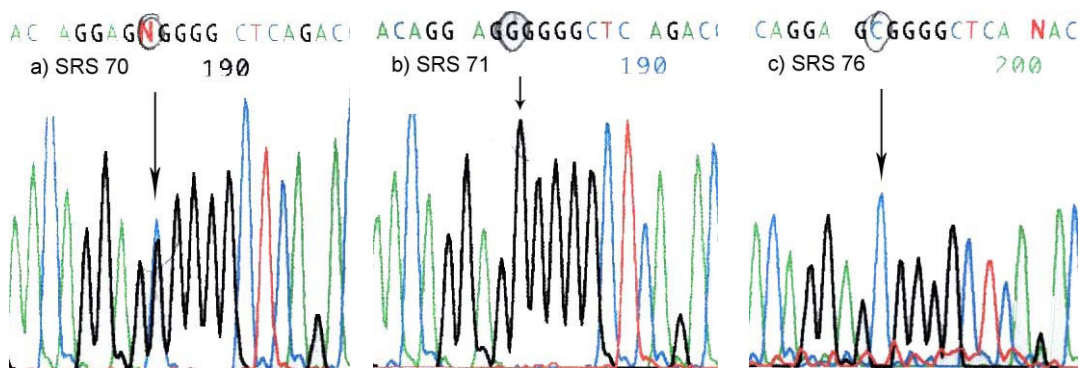


Abb. 4.17: Darstellung der Variante g.1926 C>G mittels Sequenzierung. a) SRS 70 Genotyp C/G, b) SRS 71 Genotyp C/C, c) SRS 76 Genotyp G/G (die angegebene Sequenz entspricht dem Gegenstrang)

Genotyp	Häufigkeit SRS-Patienten (n=40)	Häufigkeit Kontrollen „T“ (n=49)
C/C	35,0% (14)	51,0% (25)
C/G	52,5% (21)	42,9% (21)
G/G	12,5% (5)	6,1% (3)

Tab. 4.7: Frequenzen der einzelnen Genotypen der Variante g.1926 C>G im Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv „T“

4.4 Untersuchung des Methylierungsstatus des IGF2-Gens (Algar et al. 2000)

Zur Untersuchung des Methylierungsstatus wurden zunächst heterozygote Patienten und Kontrollen für die bekannte *ApaI*-Variante (g.8767 G>A) (Algar et al. 2000) gesucht. Bei Heterozygotie entstehen im Verdau mit dem Enzym *ApaI* drei Fragmente mit den Längen 292 bp, 228 bp und 64 bp (Abb. 4.19). Bei den Wildtypen dagegen entstehen Fragmente mit den Längen 228 bp und 64 bp, bei Homozygotie (A/A) entsteht ein unverdautes Fragment der Länge 292 bp (Abb. 4.18). Unter den untersuchten 40 SRS-Patienten lag bei 19 Patienten (47,5%) eine Heterozygotie der *ApaI*-Variante vor (Tab. 4.8). Bei 7 der SRS-Patienten wurde der Wildtyp, bei 14 eine Homozygotie nachgewiesen. Bei den 43 untersuchten Kontrollen „T“ wurde eine ähnliche Häufigkeitsverteilung gefunden. Bei 4,7% der Kontrollen wurde der Wildtyp detektiert, 41,8% stellten sich als heterozygoten Genotypen dar, bei 53,5% wurde der homozygote Genotyp A/A entdeckt.

Genotyp	Häufigkeit SRS-Patienten (n=40)	Häufigkeit Kontrollen „T“ (n=43)
G/G	17,5% (7)	4,7% (2)
G/A	47,5% (19)	41,8% (18)
A/A	35,0% (14)	53,5% (23)

Tab. 4.8: Frequenzen der einzelnen Genotypen der *ApaI*-Variante im Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv „T“

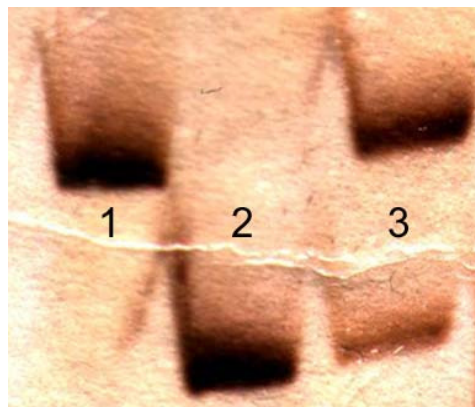


Abb. 4.19: Darstellung der Variante g.8767 G>A mittels *ApaI*-Verdau; *Bahn 1*: Kontrolle T 70 mit Genotyp G/G; *Bahn 2*: Kontrolle T 72 mit Genotyp A/A; *Bahn 3*: Kontrolle T 73 mit Genotyp G/A

Die heterozygoten Personen wurden zunächst mit *HpaII* verdaut, anschließend wurde eine PCR durchgeführt und das Produkt wurde schließlich mit *ApaI* verdaut (Algar et al. 2000).

Auf einem Agarosegel sollte das aufgetragene verdaute Produkt entweder eine Bande mit der Länge 1199 bp oder zwei Banden mit den Längen 971 bp und 128 bp zeigen (s. Kap. 3.3.7.2).

Da durch unvollständigen *HpaII* Verdau (Abb. 4.20) in der nachfolgenden PCR auch das maternale nichtmethylierte Allel repliziert wird, entstehen bei dem *ApaI* Verdau sowohl das 1199 bp Fragment als auch die Fragmente mit den Längen 971 bp und 128 bp. Allerdings sollte das von dem Vater stammende Allel in der PCR verstärkt gebildet worden sein. Daher sollten entweder das 1199 bp lange Fragment oder die beiden Fragmente mit den Längen 971 bp und 128 bp in dem nachfolgendem *ApaI* Verdau vermehrt entstehen. Zum Vergleich soll deshalb ein nicht mit *HpaII* verdautes PCR-Produkt mit *ApaI* verdaut werden. In diesem verdauten Produkt sollten alle drei Fragmente in gleicher Menge vorhanden sein. Durch Vergleich der Bandenstärken des *HpaII/ApaI*-verdauten Produkts mit den Bandenstärken des *ApaI*-verdauten Produkts, kann das methylierte Allel festgestellt werden.

In der vorliegenden Arbeit ließen die unterschiedlichen Bandenstärken sowohl in untersuchten Kontrollpersonen als auch bei den untersuchten Patienten keine Aussage zu (Abb. 4.21).

Nach Rücksprache mit Algar et al., stellte sich heraus, dass die Methode unzuverlässig ist und ihnen ähnliche Schwierigkeiten bereitete.

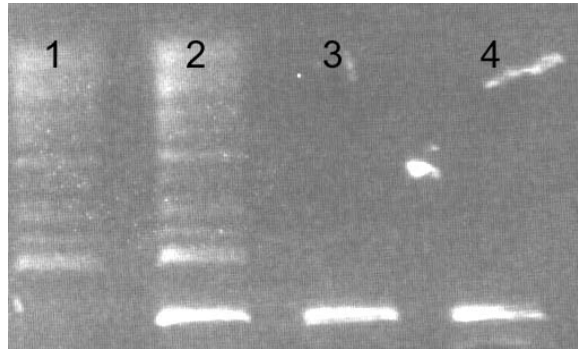


Abb. 4.20: Unvollständiger *HpaII*-Verdau der genomischen DNA. *Bahn 1:* Lambda-DNA; *Bahn 2:* Lambda-DNA und Patienten DNA; *Bahn 3:* Patienten DNA; *Bahn 4:* Unverdaute Probe

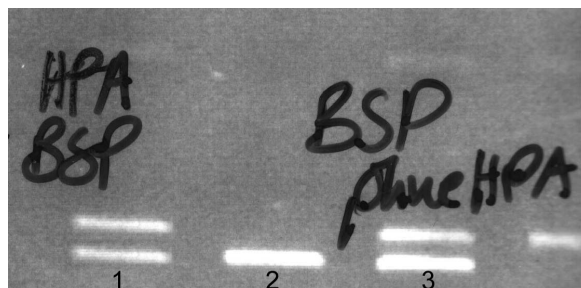


Abb. 4.21: *ApaI*-Verdau; *Bahn 1* zeigt die verdaute Kontrolle 6 nach vorherigem *HpaII*-Verdau, *Bahn 2* zeigt die gleiche Kontrolle ohne vorherigen *HpaII*-Verdau. Auf beiden Bahnen sieht man zwei Fragmente mit den Längen 1199 bp und 971 bp, die eine gleiche Intensität aufwiesen

4.5 Detektion von Varianten im CDKN1C-Gen mittels Sequenzierung

In der Literatur sind viele Varianten für das CDKN1C beschrieben worden (Algar et al. 2000, Lam et al. 1999, Matsuoka et al. 1996). Deshalb können in einem untersuchten Fragment mehrere Varianten vorliegen, welche beliebig miteinander kombiniert sein können, so dass in einer SSCP viele verschiedene Bandenmuster auftreten, die schwer zu differenzieren sind. Aus diesem Grund wurde das CDKN1C-Gen in der vorliegenden Arbeit nicht mittels SSCP, sondern mittels direkter Sequenzierung nach Sanger untersucht.

39 SRS-Patienten wurden in der vorliegenden Arbeit durch Sequenzierung auf Varianten der DNA-Sequenz untersucht. Dabei wurde im 5'UTR eine in der Literatur noch nicht beschriebene Variante entdeckt, bei der an der Nukleotidposition g.963 Guanin durch Adenin ersetzt wurde. Weiterhin wurden im Exon 1 die in der Literatur schon bekannten Polymorphismen an der Nukleotidposition g.1144 G>A und im Exon 2 eine 12 bp Deletion zwischen der Nukleo-

tidposition g.1711 und der Position g.1738. nachgewiesen (Lam et al. 1999, Matsuoka et al. 1996).

Im Intron 3 wurde eine in der Literatur noch nicht bekannte Veränderung gefunden, bei der an der Nukleotidposition g.2773 eine Insertion von Guanin (g.2773_2774 insG) zu beobachten ist. Außerdem wurde im Exon 3 an der Nukleotidposition g.2681 eine neue Variante entdeckt, bei der Cytosin durch Thymin ersetzt worden ist (Abb. 4.22). Dieser Basenpaartausch führt aber nicht zu einer Veränderung der Aminosäuresequenz.

Die in der Literatur beschriebenen weiteren 12 bp Deletionen an der Nukleotidposition g.1767 sowie g.1842 im Exon 2 konnten nicht nachgewiesen werden.

Die Genotypen sind im Anhang in den Tabellen 7.23 und 7.24 dargestellt.

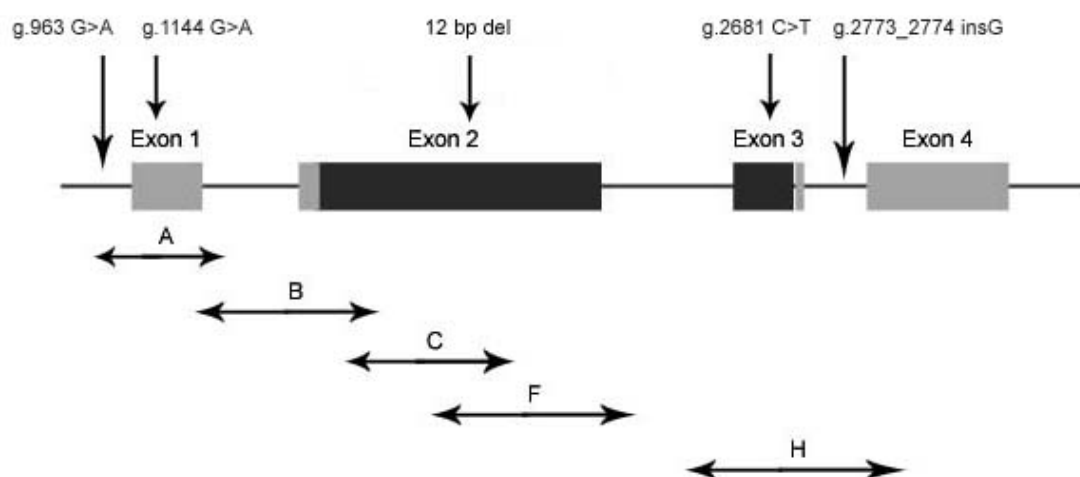


Abb. 4.22: CDKN1C-Gen mit Primerpaaren und gefundenen Varianten; schwarze Kästen entsprechen der kodierenden Region (angelehnt an Algar et al. 2000)

Exon/Intron	Variante	Literatur
Exon 1	g.963 G>A	-----
Exon 1	g.1144 G>A	Lam et al. 1999
Exon 2	12 bp Deletion	Matsuoka et al. 1996
Exon 3	g.2681 C>T	-----
Intron 3	g.2773_2774 insG	-----

Tab. 4.10: Übersicht über die detektierten Varianten im CDKN1C-Gen

4.5.1 Varianten im Bereich des Primerpaars A (Exon 1)

Die Sequenzierung sämtlicher Patienten im Bereich des Primerpaars A führte zur Detektion einer Variante an der Nukleotidposition g.963 und einer weiteren Veränderung an der Nukleotidposition g.1144.

4.5.1.1 g. 963 G>A, 5'UTR

In der Nukleinsäuresequenz des Patienten SRS 56 wurde an der Nukleotidposition g.963 eine Heterozygotie für den Austausch der Base Guanin gegen Adenin beobachtet (Abb. 4.23). Diese Variante konnte bei keinem der weiteren 38 untersuchten SRS-Patienten nachgewiesen werden.

Um das Kontrollkollektiv „T“ schneller und einfacher auf diese Veränderung hin zu untersuchen, wurde ein Verdau mit dem Enzym *RsaI* etabliert. Dieses Enzym erkennt die Sequenz GTAC und schneidet zwischen Thymin und Adenin. In der Wildtypsequenz existiert diese Erkennungsstelle nicht, so dass zwei Fragmente mit den Längen 357 bp und 16 bp entstehen. Liegt an der Position g.963 allerdings ein Adenin vor, so wird das Fragment an dieser Stelle geschnitten, und es entstehen drei Fragmente mit den Längen 333 bp, 24 bp und 16 bp. Tritt die Variante wie bei Patient SRS 56 heterozygot auf, so werden vier Fragmente mit den Längen 357 bp, 333 bp, 24 bp und 16 bp gebildet (Abb. 4.24).

Diese Variante konnte bei keiner der 61 untersuchten Kontrollpersonen T beobachtet werden (Tab. 4.10).

Weiterhin wurden die Eltern des Patienten SRS 56 untersucht. Bei der Mutter konnte ebenso wie bei dem Patienten Heterozygotie nachgewiesen werden, bei dem Vater wurde der Wildtyp detektiert.

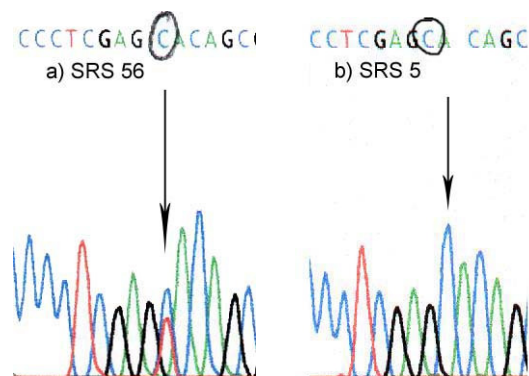


Abb. 4.23: Darstellung der Variante g.963 G>A mittels Sequenzierung. a) SRS 56 Genotyp G/A, b) SRS 5 Genotyp G/G (die angegebene Sequenz entspricht dem Gegenstrang)

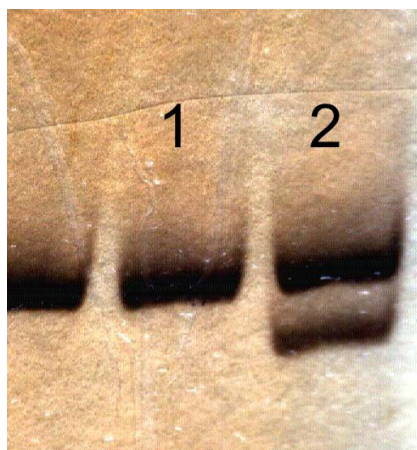


Abb. 4.24: Darstellung der Variante g.963 G>A mittels *RsaI*-Verdau. *Bahn 1:* Patient SRS 5 (Genotyp G/G) zeigt die eine Bande mit der Länge 357 bp; *Bahn 2:* Patient 56 (Genotyp G/A) zeigt zwei Banden mit den Längen 357 bp und 333 bp (die 16 bp und 24 bp großen Fragmente sind nicht zu erkennen)

Genotyp	Häufigkeit SRS-Patienten (n=39)	Häufigkeit Kontrollen „T“ (n=61)
G/G	97,4% (38)	100,0% (61)
G/A	2,6% (1)	0% (0)
A/A	0% (0)	0% (0)

Tab. 4.10: Frequenzen der einzelnen Genotypen der Variante g.963 G>A im Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv „T“

4.5.1.2 g.1144 G>A, Exon 1 (Lam et al. 1999)

Bei 5 der 39 untersuchten SRS-Patienten wurde an der Nukleotidposition g.1144 ein heterozygoter Austausch von Guanin gegen Adenin detektiert. Die anderen 34 Patienten stellten sich als Wildtypen (G/G) dar (Abb. 4.25).

Um das Kontrollkollektiv „T“ schneller und kostengünstiger auf die in der Literatur bekannte Variante zu untersuchen, wurde ein Verdau etabliert. Hierzu wurde das Restriktionsenzym *ScrFI* verwendet, welches die Erkennungssequenz CCNGG aufweist. Wurde die Wildtypsequenz des Fragmentes mit diesem Enzym verdaut, so entstanden Fragmente mit den Längen 102 bp, 89 bp, 80 bp, 60 bp und 42 bp. Liegt eine homozygote Variante vor, bei der das Guanin an der Position g.1144 gegen Adenin ausgetauscht wurde, so entstehen Fragmente mit den Längen 140 bp, 102 bp, 89 bp und 42 bp. Lag wie bei dem SRS-Patienten 26 eine Heterozy-

gotie vor, so führte dies zu der Entstehung von 6 Fragmenten mit den Längen 140 bp, 102 bp, 89 bp, 80 bp, 60 bp und 42 bp (Abb. 4.26)

Es wurden 51 Kontrollpersonen mit Hilfe des *ScrFI* Verdau untersucht. Die Variante trat unter den Kontrollen mit einer ähnlichen Häufigkeit auf wie unter den Patienten. 5 der untersuchten Kontrollpersonen wiesen einen heterozygoten Genotypen auf, die anderen 46 Personen entsprachen dem Wildtypen (Tab.4.11). Bei keinem der untersuchten Patienten und keiner der Kontrollpersonen konnte eine Homozygotie für die Variante nachgewiesen werden.

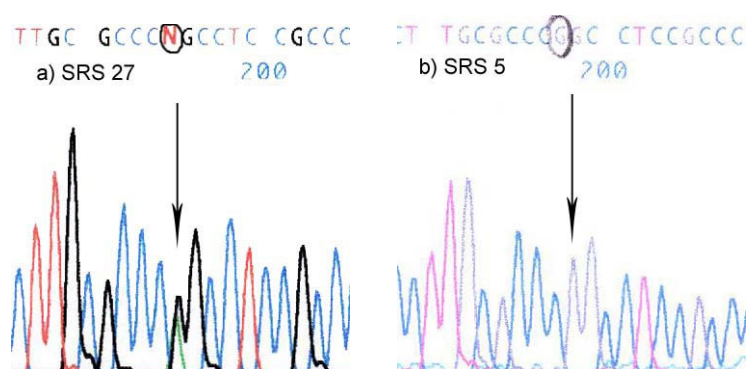


Abb. 4.25: Darstellung der Variante g.1144 G>A mittels Sequenzierung. a) SRS 27 Genotyp G/A, b) SRS 5 Genotyp G/G

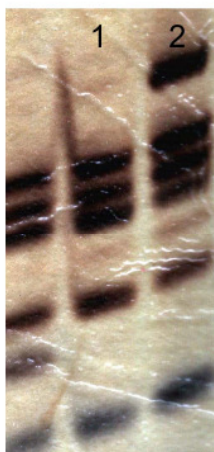


Abb. 4.26: Darstellung der Variante g.1144 G>A mittels *ScrFI* Verdau. *Bahn 1:* Patient SRS 5 (Genotyp G/G) zeigt 5 Banden mit den Längen 102 bp, 89 bp, 80 bp, 60 bp und 42 bp; *Bahn 2:* Patient SRS 27 (Genotyp G/A) zeigt 6 Banden mit den Längen 140 bp, 102 bp, 89 bp, 80 bp, 60 bp und 42 bp

Genotyp	Häufigkeit in SRS-Patienten (n=39)	Häufigkeit in Kontrollen „T“ (n=51)
G/G	87,0% (34)	90,0% (46)
G/A	13,0% (5)	10,0% (5)
A/A	0% (0)	0% (0)

Tab. 4.11: Frequenzen der unterschiedlichen Genotypen der Variante g.1144 G>A im Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv „T“

4.5.2 Varianten im Bereich des Primerpaars C (Exon 2)

Bei der Durchmusterung des Patientenkollektivs im Bereich des Primerpaars C wurde eine 12 bp lange Deletion im Bereich der polymorphen PAPA-Region gefunden. Dabei handelt es sich um eine Deletion von 12 Basenpaaren zwischen den Nukleotidpositionen g.1711 und g.1738.

4.5.2.1 12 bp Deletion im PAPA-Bereich, Exon 2 (Matsuoka et al. 1996)

18 der 39 untersuchten SRS-Patienten entsprachen in der Sequenzierung ihrer DNA im Bereich des Primerpaars C der Wildtypsequenz. Dies entspricht einer Häufigkeit von 46,0% (Tab. 4.12). Bei dem Patienten SRS 5 konnte eine homozygote 12 bp Deletion nachgewiesen werden (Abb. 4.27). Die restlichen 20 Patienten (51,0%) besaßen einen heterozygoten Genotypen. Um die Häufigkeitsverteilung der Variante in dem Patientenkollektiv mit der der Normalbevölkerung zu vergleichen, wurden 58 Kontrollpersonen des Kollektivs „T“ untersucht. Um die Kontrollen schneller zu durchmustern, wurde die Variante auf einem denaturierenden PAA-Gel (Abb. 4.28) mit anschließender Silberfärbung (s. Kap. 3.3.4.1) dargestellt. Dabei wurde folgende Häufigkeitsverteilung beobachtet: am häufigsten ließ sich der Wildtyp in 53,4% der Fälle nachweisen. Eine Heterozygotie wurde bei 32,8% der Kontrollpersonen, eine Homozygotie für die Deletion bei 13,8% detektiert (Tab. 4.12).

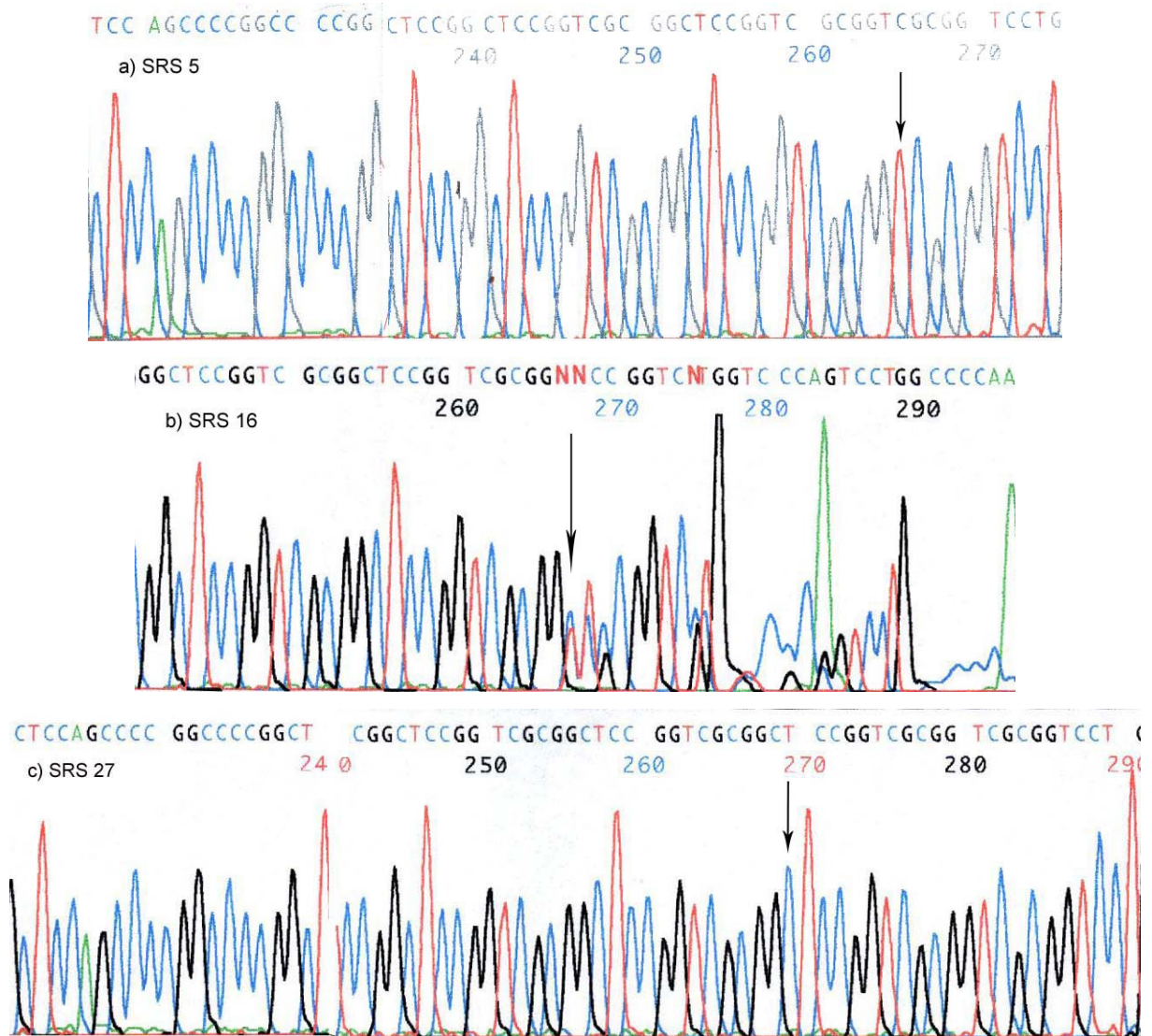


Abb. 4.27: Darstellung der PAPA-Variante mittels Sequenzierung. a) SRS 5 Genotyp del/del, b) SRS 16 Genotyp wt/del, c) SRS 27 Genotyp wt/wt

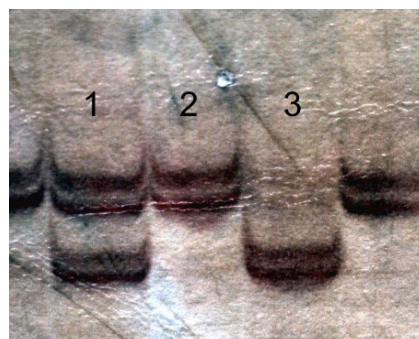


Abb. 4.28: Darstellung der PAPA-Variante mittels Fragmentanalyse und Silberfärbung. *Bahn 1:* Patient SRS 16 mit Genotyp wt/del; *Bahn 2:* Patient 5 mit Genotyp del/del; *Bahn 3:* Patient 27 mit Genotyp wt/wt

Genotyp	Häufigkeit SRS-Patienten (n=39)	Häufigkeit Kontrollen „T“ (n=58)
wt/wt	46,0% (18)	53,4% (31)
wt/del	51,0% (20)	32,8% (19)
del/del	3,0% (1)	13,8% (8)

Tab. 4.12: Frequenzen der Genotypen der PAPA-Variante im Patienten- und Kontrollkollektiv „T“

4.5.3 Varianten im Bereich des Primerpaars H (Exon 3, Intron 3, Exon 4)

Im Bereich des Primerpaars H konnten zwei neue Varianten detektiert werden. An der Nukleotidposition g.2681 im Exon 3 konnte bei einem Patienten ein Austausch von Cytosin gegen Thymidin beobachtet werden. Außerdem wurde im Intron 3 eine Insertion von Guanin an der Nukleotidposition g.2773 entdeckt.

4.5.3.1 g.2681 C>T, Exon 3

Bei einem einzigen Patienten (SRS 71) wurde an der Position g.2681 ein heterozygoter Austausch der Base Cytosin gegen Thymidin festgestellt (Abb. 4.29). Bei den anderen 38 untersuchten Patienten trat diese Veränderung nicht auf. Der Austausch der Base führt zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz, so dass die Variante wahrscheinlich keinen Einfluss auf das Protein hat. Das Kontrollkollektiv „T“ wurde mit Hilfe der SSCP auf die Variante untersucht. Hierzu wurde das Primerpaar H3 F/R verwendet, welches die Variante umschließt. Bei keinem der 58 untersuchten Kontrollen „T“ konnte die Variante detektiert werden. Weiterhin wurden die Eltern des Patienten SRS 71 auf die Variante untersucht. Bei beiden Eltern wurde die Wildtypsequenz nachgewiesen (Abb. 4.30).

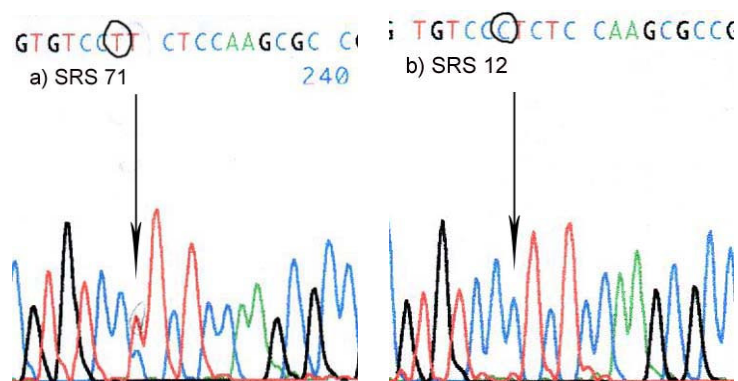


Abb. 4.29: Darstellung der Variante g.2681 C>T mittels Sequenzierung. a) SRS 71 Genotyp C/T, b) SRS 12 Genotyp C/C

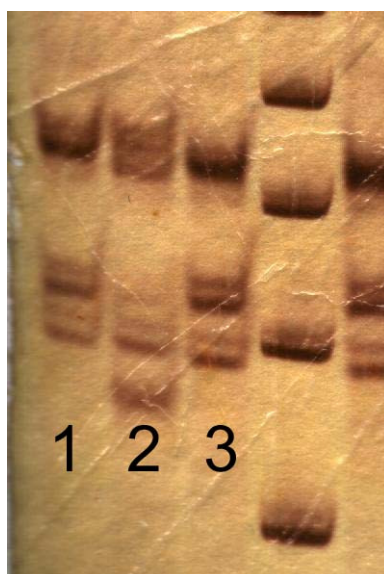


Abb. 4.30: SSCP des Fragments H3 F/R (4°C). *Bahn 1* : Vater des Patienten SRS 71 mit Genotyp C/C; *Bahn 2*: Patienten SRS 71 mit Genotyp C/T; *Bahn 3*: Mutter des Patienten SRS 71 mit Genotyp C/C

Genotyp	Häufigkeit SRS-Patienten (n=39)	Häufigkeit Kontrollen „T“ (n=58)
C/C	97,4% (38)	100,0% (58)
C/T	2,6% (1)	0% (0)
T/T	0% (0)	0% (0)

Tab. 4.13: Frequenzen der Genotypen g.2681 C>T im Patienten- und Kontrollkollektiv „T“

4.5.3.2 g.2773_2774 insG (Intron 3)

Bei 5 SRS-Patienten (Tab. 4.14) konnte eine homozygote Insertion von Guanin an der Position g.2773 gefunden werden (Abb. 4.31). 20 der 39 untersuchten SRS-Patienten besaßen einen

heterozygoten Genotyp, bei 13 Patienten wurde der Wildtyp nachgewiesen. In dem Kontrollkollektiv „T“ wurde die Variante mittels SSCP nachgewiesen. Da das Fragment mit dem Primerpaar H mit einer Länge von 469 bp für die Analyse zu groß war, wurde der Vorwärtsprimer umgelegt (H2 F). Es entstand ein 188 bp großes Fragment, welches die Variante umschloss (Abb. 4.32). In der SSCP mit diesem neuen Primerpaar konnten die drei verschiedenen Bandenmuster unter allen 4 SSCP-Bedingungen detektiert werden (Abb. 4.33). Es wurden 41 Kontrollpersonen untersucht, von denen 24 ein Bandenmuster aufwiesen, welches dem Wildtypen entsprach. Bei 13 Personen wurde eine Heterozygotie entdeckt, die restlichen 5 Personen stellten sich in der SSCP als homozygot für die Insertion dar (Tab. 4.14).

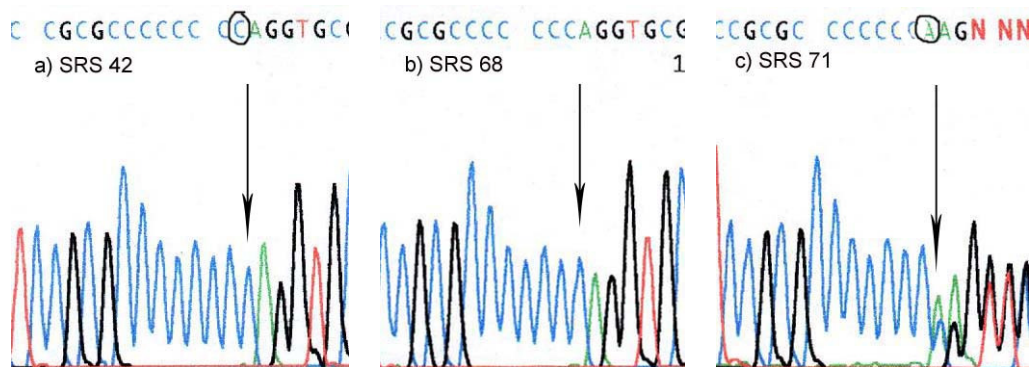


Abb. 4.31: Darstellung der Variante g.2773_2774 insG mittels Sequenzierung. a) SRS 42 Genotyp ins/ins, b) SRS 68 Genotyp wt/wt, c) SRS 71 wt/ins

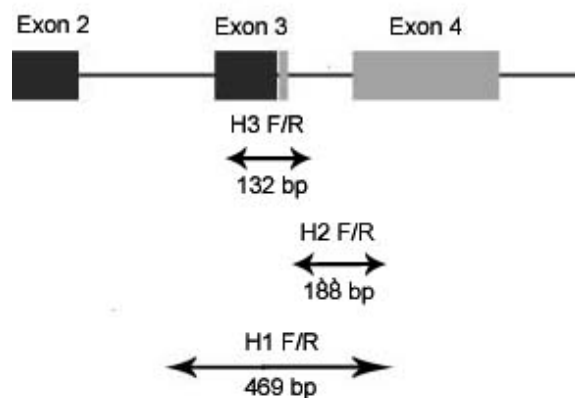


Abb. 4.32: Darstellung der Primerpaare H1 F/R, H2 F/R und H3 F/R des CDKN1C-Gens. Schwarze Bereiche entsprechen der kodierenden Region.

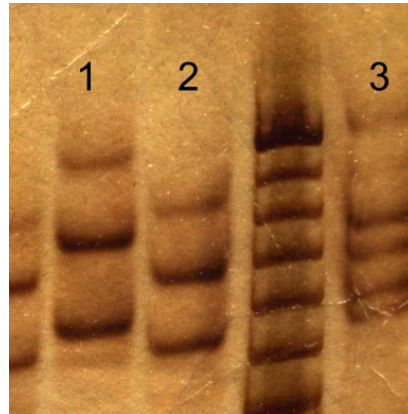


Abb. 4.33: SSCP des Fragments H2 F/R (4°C). *Bahn 1* : Patient SRS 2 mit Genotyp wt/ins; *Bahn 2*: Patienten SRS 3 mit Genotyp wt/wt; *Bahn 3*: Patient SRS 12 mit Genotyp ins/ins

Genotyp	Häufigkeit SRS-Patienten (n=39)	Häufigkeit Kontrollen „T“ (n=58)
wt/wt	34,2% (13)	57,1% (24)
wt/ins	52,6% (20)	31,0% (13)
ins/ins	13,2% (5)	11,9% (5)

Tab. 4.13: Frequenzen der einzelnen Genotypen der Variante g.2773_2774 insG im Patientenkollektiv und Kontrollkollektiv „T“

5 Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die Beteiligung einer maternalen Duplikation des Bereichs 11p15 sowie einer mUPD11 an der Ätiologie des SRS überprüft. Weiterhin sollten zwei geprägte Kandidatengene in der Region 11p15.5, die Gene IGF2 und CDKN1C, auf Veränderungen ihrer DNA-Sequenz untersucht werden. Zusätzlich wurden die Häufigkeiten bekannter Varianten in diesen Genen mit den Häufigkeiten der Varianten der Normalbevölkerung verglichen.

Da eine Veränderung der genomischen Prägung des IGF2-Gens an der Entstehung des SRS beteiligt sein könnte, sollte in der vorliegenden Arbeit zusätzlich der Methylierungsstatus des IGF2-Gens bei SRS-Patienten untersucht werden.

5.1 Validität der angewandten Methoden

5.1.1 PCR

Zur Durchführung molekulargenetischer Untersuchungen war eine Etablierung der PCR-Bedingungen für die einzelnen Fragmente nötig. Dies wurde hauptsächlich durch Veränderungen der Annealingtemperatur und -dauer sowie der Zyklenzahl erreicht.

Im Fall des IGF2-Gens (einige Primersequenzen und PCR-Bedingungen wurden von Gaunt et al. 2001 übernommen) war die Etablierung der PCR-Bedingungen einiger Fragmente problematisch, so dass zum einen neue Primer ausgewählt werden mussten, zum anderen die Q-Solution der Firma Qiagen verwendet wurde.

Bei der Untersuchung des Methylierungsstatus des IGF2-Gens konnte die PCR mit dem Primerpaar P3/P4 erst nach einer Aufreinigung der verdauten DNA und anschließender PCR mit dem Expand High Fidelity System der Firma Roche etabliert werden.

Aufgrund des hohen GC-Anteils im CDKN1C-Gen wurde die Etablierung der Fragmente erst durch Zugabe von DMSO und veränderten $MgCl_2$ -Konzentrationen erreicht.

5.1.2 Fragmentanalyse

Zum Nachweis einer mUPD11 sowie einer maternalen Duplikation des Bereichs 11p15 wurde in der vorliegenden Studie die Fragmentanalyse verwendet (Fisher et al. 2002). Die Fragmente zur Untersuchung einer mUPD wurden zunächst mittels Silberfärbung (s. Kap.3.3.4.1) de-

tektiert. Allerdings war die Auswertung der Bandenmuster der Marker D11S1984 und D11S1318 schwierig, so dass diese Fragmente nach Fluoreszenzmarkierung mittels eines automatischen Sequenzierers analysiert wurden.

Bei der Untersuchung auf eine maternale Duplikation des Bereichs 11p15 wurden die Fragmente mit Hilfe eines automatischen Sequenzierers detektiert. Anhand der Elektropherogramme wurde bei Vorliegen einer Heterozygotie die Intensität der beiden Allele miteinander verglichen. Eine stark unterschiedliche Intensität der Allele weist auf eine Duplikation eines Allels hin (s. Kap. 4.2.1).

5.1.3 SSCP

Die SSCP wurde in der vorliegenden Arbeit zur Untersuchung des IGF2-Gens auf Veränderungen der Gen-Sequenz verwendet. Zusätzlich wurde sie zur schnelleren und kostengünstigen Analyse der Häufigkeiten der Variante g.2773_2774 insG und g.2681 C>T des CDKN1C-Gens bei Kontrollen eingesetzt.

Die Detektion von Varianten mittels SSCP ist abhängig von der Fragmentgröße und den Laufbedingungen. Nach Sheffield et al. (1993) liegt die Sensitivität der SSCP bei Fragmenten bis zu einer Größe von 300 bp bei 90%. Sind die zu untersuchenden Fragmente größer als 300 bp, nimmt die Sensitivität der SSCP ab.

Um in der vorliegenden Studie eine möglichst hohe Detektionsrate zu erhalten, wurden die Fragmentgrößen möglichst klein gehalten und Gelläufe unter vier verschiedenen Bedingungen durchgeführt.

In dieser Studie wurden mit Hilfe der SSCP im IGF2-Gen fünf Varianten detektiert.

In den untersuchten Fragmenten des IGF2-Gens wurden in der vorliegenden Studie alle von Gaunt et al. (2002) beschriebenen Varianten mittels SSCP nachgewiesen. Zusätzlich wurde die Variante g.4225 A>G entdeckt, die bisher in der Literatur noch nicht beschrieben worden ist. Die Sensitivität der SSCP in der vorliegenden Arbeit war somit sehr hoch.

Im Exon 4 sowie Exon 5 des IGF2-Gens traten in der SSCP verschiedene Bandenmuster auf. Bei der anschließenden Sequenzierung konnte keine Veränderung der Sequenz entdeckt werden. Dies könnte darauf zurückzuführen sein, dass manche Banden nach der Färbung nur schwach zu sehen sind und diese bei schwachen PCR-Produkten völlig verschwinden. Dadurch wird ein unterschiedliches Bandenmuster vorgetäuscht. Zum anderen können Fehler der *Taq*-Polymerase sowie unspezifische PCR-Produkte zu veränderten Bandenmustern führen.

Weiterhin wurde die SSCP zur Untersuchung der Häufigkeiten der Variante g.2773_2774 insG sowie der Variante g.2681 C>T des CDKN1C-Gens im Kontrollkollektiv „T“ verwendet. Mit dem ursprünglichen Primerpaar H konnte die Variante in dem 469 bp großem Fragment nicht detektiert werden. Durch Auswahl eines neuen Vorwärtsprimers konnte das Fragment auf 188 bp bzw. 132 bp verkleinert werden und die Variante in der nachfolgenden SSCP detektiert werden.

5.1.4 Sequenzierung

Die in der SSCP auffälligen Proben wurden mit Hilfe der direkten Sequenzierung genauer untersucht, um Position und Art der Variante zu bestimmen.

Im IGF2-Gen konnten bis auf zwei Ausnahmen die Auffälligkeiten der SSCP bestätigt werden (s. Kap. 5.1.4).

Bei allen Patienten wurde das CDKN1C-Gen mit Hilfe der Sequenzierung nach Sanger untersucht (s. Kap. 3.3.6). Dabei wurden 5 verschiedene Varianten des Gens gefunden. Die Varianten g.963 G>A und g.2681 C>T wurden jeweils nur bei einem Patienten des Kollektivs nachgewiesen. Um einen fehlerhaften Einbau eines Nukleotids durch die *Taq*-Polymerase auszuschließen, wurde die Sequenzierung dieser Patienten zur Bestätigung des Ergebnisses wiederholt.

5.1.5 Restriktionsverdau

5.1.5.1 Restriktionsverdau zur Detektion von Varianten

Mit Hilfe des Restriktionsverdaus können bekannte Varianten nachgewiesen werden. In der vorliegenden Arbeit wurden Restriktionsverdaue zur Untersuchung zweier Varianten des CDKN1C-Gens bei Kontrollpersonen verwendet.

Bei der Variante g.963 G>A wird durch den Basenaustausch von Guanin gegen Adenin eine zusätzliche Schnittstelle für das Enzym *RsaI* erzeugt, bei der Variante g.1144 G>A dagegen wird durch Basenaustausch eine Schnittstelle des Enzyms *ScrFI* zerstört.

5.1.5.2 Restriktionsverdau zur Untersuchung des Methylierungsstatus (nach Algar et al. 2000)

Mittels Restriktionsverdau sollte der Methylierungsstatus des IGF2-Gens untersucht werden. Zunächst wurden mit Hilfe des Enzyms *ApaI* heterozygote Patienten und Kontrollpersonen für die Variante g.8767 G>A bestimmt (Algar et al. 2000). Die genomische DNA der heterozygoten Personen wurde mit dem methylierungssensitiven Enzym *HpaII* verdaut. Nach anschließender PCR wurde das Fragment mit *ApaI* verdaut (s. Kap. 3.3.7.2). In der vorliegenden Studie entstanden statt der erwarteten zwei Fragmente drei Fragmente. Bei den Patienten könnte dies auf eine Methylierung beider Allele zurückzuführen sein. Da aber auch bei gesunden Kontrollpersonen drei Fragmente entstanden, kann keine Fehl-methylierung für diese Beobachtung verantwortlich sein.

Als Erklärung kommt ein unvollständiger Verdau des Enzyms *HpaII* in Frage. Dieser wurde auf einem 1%igen Agarosegel nachgewiesen. Mittels unmethylierter λ -DNA wurde ein Funktionsverlust des Enzyms ausgeschlossen. Weiterhin wurde durch einen gemeinsamen Verdau von λ -DNA und Patienten-DNA eine Beeinträchtigung der Funktion des Enzyms durch Salze etc. in der Patienten-DNA ausgeschlossen. Eine höhere Enzymkonzentration und längere Restriktionsverdauzeiten führten zu keiner Verbesserung.

Weiterhin könnte eine unvollständige Methylierung des IGF2-Gens für die Beobachtung verantwortlich sein. Eine unvollständige Methylierung führt nach dem *HpaII*-Verdau in der PCR zu einer Replikation beider *ApaI*-Allele. Allerdings wird das ursprünglich methylierte Allel verstärkt gebildet. Daher entstehen in dem anschließendem *ApaI*-Verdau drei unterschiedlich lange Fragmente. Diese sollten aber, da sie sich in ihrer Menge unterscheiden, auf einem 2%igen Agarosegel unterschiedlich starke Banden produzieren (s. Kap. 4.4). Zum Vergleich wurde ein vorher nicht mit *HpaII* verdautes PCR-Produkt mit *ApaI* verdaut und aufgetragen. Eine unterschiedliche Intensität der Banden konnte aber nicht nachgewiesen werden.

Aufgrund dieser Probleme kann keine Aussage über den Methylierungsstatus des IGF2-Gens bei SRS-Patienten gemacht werden.

In Zukunft soll versucht werden mittels einer Bisulfidbehandlung und anschließender DHPLC den Methylierungsstatus des IGF2-Gens zu überprüfen. Bei dieser Methode wird genomische DNA mit Bisulfid behandelt, welches unmethylierte Cytosinreste desaminiert. Dadurch werden die Cytosine zu Uracilen umgewandelt (Baumer et al. 2001). Es werden anschließend zwei verschiedene PCR mit spezifischen Primerpaaren für den methylierten sowie den un-

methylierten Strang durchgeführt. Der Ersatz von Cytosin durch Uracil führt zu einer Konformationsänderung der DNA, welche mit Hilfe der DHPLC detektiert werden kann.

5.2 Maternale uniparentale Disomie des Chromosom 11

In der vorliegenden Studie wurde bei den 46 untersuchten Patienten eine mUPD11 ausgeschlossen. Diese scheint also nicht an der Entstehung des SRS beteiligt zu sein.

Kotzot et al. (2001) postulierten im Zusammenhang mit BWS, dass eine Zelllinie mit einer mUPD11 nicht überlebensfähig sei (s. Kap.2.2.1.1). Diese Hypothese könnte erklären, warum keine mUPD11 bei SRS-Patienten gefunden wurde.

Ebenso konnte bei den 46 untersuchten Patienten keine partielle UPD des Bereichs 11p15.5 detektiert werden. Allerdings können kleinere Segmente mit UPD nicht ausgeschlossen werden.

5.2.1 Maternale Duplikation des Bereichs 11p15

Bei den Patienten SRS 46 und SRS 90 konnte in den Elektropherogrammen der Mikrosatellitenanalyse ein verstärktes Signal des maternalen Allels beobachtet werden. Zur Bestätigung und näheren Eingrenzung des duplizierten Bereichs wurden weitere Marker analysiert. Aus diesen Untersuchungen ließ sich schließen, dass bei den beiden Patienten ein mindestens 7,4 Mb großer Bereich maternal dupliziert vorlag. Zur Bestätigung dieser Beobachtung wurde zusätzlich eine FISH durchgeführt. Für die Patienten SRS 46 und SRS 90 konnte die Duplikation des maternalen Bereichs 11p15 unter dem Fluoreszenzmikroskop nachgewiesen werden. Es wurde jeweils eine Fluoreszenz auf Chromosom 11 nachgewiesen. Zusätzlich konnte bei dem Patienten SRS 46 auf Chromosom 10 und bei dem Patienten SRS 90 auf Chromosom 90 ein weiteres Signal beobachtet werden. Da die Sonde auch mit einem der beiden Chromosomen 10 hybridisiert, kann davon ausgegangen werden, dass der duplizierte Bereich des Chromosoms 11 auf ein Chromosom 10 bzw. 15 transloziert ist. Somit weist der Patient SRS 46 den Karyotypen 46 XY der(10)(t10;11)(q26.3;p15.3) auf. Die exakte Karyotypisierung des Patienten SRS 90 steht noch aus.

Sowohl Kosaki et al. (2000) und Fisher et al. (2002) berichteten von maternalen Duplikationen des Bereichs 11p15 im Zusammenhang mit Wachstumsretardierung. In der vorliegenden Studie wurde bei zwei Patienten mit SRS und damit verbundener Wachstumsretardierung eine maternale Duplikation des Bereichs 11p15 entdeckt. Mit den Beobachtungen von Kosaki et

al. (2000) und Fisher et al. (2002) sind somit sechs Patienten mit einer maternalen Duplikation des Bereichs 11p15 bekannt.

Diese Duplikation könnte bei den beiden SRS-Patienten die Ursache des Syndroms sein. Zum einen könnte durch die Duplikation das SRS über die vermehrte Expression wachstumsunterdrückender Gene oder zum anderen durch die verminderte Expression wachstumsfördernder Gene entstehen.

Die klinischen Merkmale der beiden Patienten SRS 46 und SRS 90 sowie der beiden lebenden Patienten von Fischer et al. (2002) sind in der Tabelle 5.1 dargestellt. Ein Geburtsgewicht unter der dritten Perzentile sowie postnataler Kleinwuchs wird bei allen vier Patienten beobachtet. Die dreieckige Gesichtsform wird allerdings nur bei einem der Patienten gefunden, bei Wollmann et al. (1995) wird diese bei 79% der Patienten beobachtet. Klinodaktylie V dagegen tritt bei allen vier Patienten mit einer maternalen Duplikation des Bereichs 11p15 auf. Diese wird nach Wollmann et al. (1995) nur bei 68% der Patienten beobachtet. Die unterschiedliche Verteilung der Häufigkeiten der Symptome lässt vermuten, dass die maternale Duplikation zu einem eigenen Phänotypen führt. Daher ist zu überlegen, ob in Zukunft das SRS klinisch in Untergruppen unterteilt werden sollte. Allerdings ist die Anzahl der bekannten Patienten mit einer maternalen Duplikation des Bereichs 11p15.5 zu klein um genaue Aussagen zu treffen.

Bei den 44 weiteren untersuchten Patienten konnte keine Duplikation nachgewiesen werden. Somit konnte bei 5% der SRS-Patienten in dieser Studie eine Duplikation des maternalen Bereichs 11p15 entdeckt werden, die möglicherweise für das Syndrom verantwortlich sein könnte. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, sind Untersuchungen an weiteren Patientenkollektiven notwendig.

Hinzu kommt, dass mit der Mikrosatellitenanalyse Duplikationen von kleineren Bereichen nicht detektiert werden können. Daher ist es durchaus vorstellbar, dass auch bei einigen der unauffälligen Patienten kleinere Duplikationen der maternalen Region 11p15 vorliegen.

Symptom	Häufigkeit (n=143)	Fisher 1	Fisher 2	SRS 46	SRS 90
Geburtsgewicht <3. Perzentile	94%	+	+	+	+
Kleinwuchs	99%	+	+	+	+
Dreieckige Gesichtsform	79%	-	+	-	
Klinodaktylie V	68%	+	+	+	+
Skelettasymmetrie	51%	-	-	+	
Brachydaktylie V	48%			+	
Syndaktylie	19%	+			
Relative Makrozephalie	64%	-	-		+
Ohranomalien	53%			+	+
Herabhängende Mundwinkel	46%	-	+	-	
Zahnfehlstellungen	28%			+	
Verfrühte Pubertät	8%	-			
Muskuläre Hy- potrophie/Hypotonie	45%		-	+	
Motorische/neuropsychologische Verzögerung	37%	+	-	+	
Piepsige Stimme	22%			+	+

Tab. 5.1: Darstellung der klinischen Symptomen der beiden SRS-Patienten und der beiden Patienten von Fisher et al. (2002) im Vergleich zu den Häufigkeiten in SRS-Kollektiven (Wollmann et al. 1995)

5.3 IGF2-Gen

In der vorliegenden Studie wurden im IGF2-Gen fünf Varianten entdeckt, von denen vier bereits in der Literatur beschrieben worden waren (Lucassen et al. 1993; Gaunt et al. 2001). Drei Varianten liegen im untranslatierten Bereich (g.6814_6819 delAGGGC, g.1156 T>C, g.1926 C>G) und führen damit zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz. Die beiden anderen Varianten, darunter auch die bisher in der Literatur nicht beschriebene Variante g.1252 T>C, liegen in den Exonen 3 (g.1252 T>C) und 6 (g.4225 A>G) des IGF2-Gens. Da nur die Exone 7, 8 und 9 translatiert werden, entstehen auch durch diese beiden exonischen Varianten keine Veränderungen der Aminosäuresequenz.

Bei allen detektierten Varianten wurde das Auftreten in nicht-betroffenen normalwüchsigen deutschen Kontrollen „T“ untersucht. Die Varianten g.1156 T>C und g.1926 C>G traten in

ähnlicher Häufigkeit in SRS-Patienten und den phänotypisch unauffälligen Kontrollen auf ($p > 0,016$).

Bei den Varianten g.6814_6819 delAGGGC, g. 1252 T>C und g.4225 A>G dagegen wurde ein statistisch-signifikanter Unterschied ($p > 0,01$) zwischen den SRS-Patienten und den Kontrollen „T“ beobachtet. Es wurden zusätzlich weitere Kontrollen des Kontrollkollektivs „B“ untersucht. Bei diesem Kollektiv handelt es sich um Blutspender unbekannter Herkunft und Körpergröße. Diese Kontrollen zeigten auch eine unterschiedliche Verteilung der Varianten im Vergleich zu den SRS-Patienten, die aber im Gegensatz zu den Kontrollen „T“ nicht statistisch-signifikant ist. Da in dem Kontrollkollektiv „B“ wahrscheinlich auch Personen erfasst wurden, die nicht deutschstämmig sind, könnte diese Beobachtung darauf hindeuten, dass die Variante in verschiedenen Populationen in unterschiedlichen Häufigkeiten auftritt. Daher könnten im Kontrollkollektiv „T“ (ein rein deutsches Kollektiv) bestimmte Varianten im Vergleich zu dem gemischten Kontrollkollektiv „B“ in unterschiedlicher Frequenz vorkommen. Wenn man davon ausgeht, dass die Varianten tatsächlich mit der Körpergröße korrelieren, könnte ein statistisch-nicht signifikanter Unterschied zwischen Patienten Kontrollen „B“ dadurch entstehen, dass im Kontrollkollektiv „B“ kleinwüchsige Patienten mit erfasst werden.

Möglicherweise treten die Unterschiede aber durch eine zu geringe Patientenzahl auf.

Gaunt et al. (2001) beschreiben einen Zusammenhang des BMI mit den beiden Varianten g.1156 T>C und g.1926 C>G. Personen, die homozygot sind, haben einen signifikant niedrigeren BMI als die Wildtypen oder heterozygote Personen. Interessanterweise ist die Häufigkeit dieser beiden Varianten im SRS-Patientenkollektiv und im Kontrollkollektiv ähnlich.

Die Autoren beschreiben auch einen Zusammenhang zwischen der Variante g.6814_6819 delAGGGC im 5'UTR und dem BMI. Sie postulieren, dass die Deletion der fünf Basenpaare zu einer Konformationsänderung der DNA führt, welche wiederum die Promotorfunktion beeinträchtigen könnte. 27 bp von der Variante entfernt liegt die Bindungsstelle des CCAAT/enhancer binding Proteins (CEBP α), welches den IGF2 P1 Promotor aktiviert. Es ist also vorstellbar, dass eine Deletion der fünf Basenpaare AGGGC zu einer geringeren Affinität des Enhancers zu seiner Bindungsstelle führt, welches dann in einer verminderten Expression des IGF2-Gens resultiert. Eine Deletion der 5 Basenpaare könnte durch den gleichen Mechanismus zu Kleinwuchs und SRS führen.

Da das IGF2-Gen nur paternal exprimiert wird, ist es denkbar, dass auch eine Heterozygotie über den von Gaunt et al. (2001) postulierten Mechanismus zu einem Kleinwuchs führt. Wenn eine Person die Deletion paternal erbt, so ist eine geringere Expression des IGF2-Gens denkbar. Wenn eine Person die Deletion maternal erbt, sollte die Expression des Gens nicht beein-

flusst werden, da das paternale Allel dem Wildtypen entspricht. Es ist vorstellbar, dass SRS-Patienten mit einer Heterozygotie die 5bp Deletion paternal geerbt haben, welches in einer verminderten Genexpression resultiert. Die heterozygoten Kontrollen dagegen könnten die Deletion maternal geerbt haben, was die Expression des IGF2-Gens nicht beeinflussen würde.

Um einen Zusammenhang zwischen den Varianten und dem SRS zu bestätigen oder auszuschließen, sind daher weitere Untersuchungen an größeren Patienten- und Kontrollkollektiven deutscher Herkunft notwendig.

5.4 CDKN1C-Gen

Im CDKN1C-Gen wurden in der vorliegenden Arbeit fünf Varianten entdeckt, darunter drei in der Literatur noch nicht beschriebene Veränderungen der DNA-Sequenz. Die bekannten Varianten g.1144 G>A und die 12 bp Deletion im PAPA-Bereich sowie die in der Literatur noch nicht publizierte Variante g.2773_2774 insG im Intron 3 wurden im Patienten- und Kontrollkollektiv „T“ mit ähnlichen Häufigkeiten gefunden.

Die zwei weiteren entdeckten Varianten g.963 G>A und g.2681 C>T konnten jeweils nur bei einem SRS-Patienten nachgewiesen werden.

Die Variante g.963 G>A im 5'UTR liegt 264 bp vom Startcodon des CDKN1C-Gens entfernt. Eine Heterozygotie dieser Veränderung wurde bei Patient SRS 56 detektiert. Bei keiner der 62 untersuchten Kontrollen konnte dieser Austausch beobachtet werden. Bei der Untersuchung der Eltern des Patienten SRS 56 stellte sich heraus, dass auch die Mutter eine Heterozygotie aufwies. Da das CDKN1C-Gen maternal exprimiert wird, ist es vorstellbar, dass die Variante beim Patienten SRS 56 zu einer veränderten Expression des Gens führt.

Die Variante g.2681 C>T im Exon 3 wurde bei dem Patienten SRS 71 heterozygot detektiert. Bei der Untersuchung der Eltern des Patienten SRS 71 wurde beobachtet, dass beide Eltern die Wildtyp-Sequenz aufweisen, so dass von einer Neumutation ausgegangen werden muss. Die Variante konnte bei keiner der 59 untersuchten Kontrollen nachgewiesen werden. Da der Austausch von Cytosin gegen Thymin zu keiner Veränderung der Aminosäuresequenz führt, führt die Variante wahrscheinlich nicht zu der Bildung eines veränderten Proteins. Daher kann davon ausgegangen werden, dass die Variante nicht für das SRS verantwortlich ist.

Mutationen im CDKN1C-Gen scheinen also bei der Entstehung des SRS keine wesentliche Rolle zu spielen. Allerdings kann eine Beteiligung des CDKN1C-Gens an der Ätiologie des Syndroms bei einzelnen Patienten nicht ausgeschlossen werden.

5.5 Ausblick

In der vorliegenden Studie konnte eine wesentliche Beteiligung einer mUPD11 an der Ätiologie des SRS ausgeschlossen werden. Inwieweit diese Veränderung bei einzelnen Patienten eine Rolle spielen, kann nicht abgeschätzt werden. Ebenso scheinen Mutationen im IGF2- und CDKN1C-Gen nicht wesentlich für das Krankheitsbild verantwortlich zu sein.

Zusätzlich zu den vier von Kosaki et al. (2000) und Fisher et al. (2002) beschriebenen Patienten mit Kleinwuchs und einer maternalen Duplikation des Bereichs 11p15 wurden in der vorliegenden Studie zwei weitere SRS-Patienten mit einer Duplikation des maternalen Bereichs 11p15 detektiert. Es kann davon ausgegangen werden, dass eine maternale Duplikation dieses Bereichs an der Ätiologie des SRS beteiligt ist. Daher sollte bei weiteren SRS-Patienten routinemäßig nach maternalen Duplikationen des Bereichs 11p15 gesucht werden. Zusätzlich sollte in Zukunft an anderen IUGR-Kollektiven eine Beteiligung einer maternalen Duplikation an der Ätiologie des SRS untersucht werden.

Im Zusammenhang mit dem SRS wird bei etwa 7-10% der Patienten eine mUPD7 beobachtet (zur Übersicht Hitchins et al 2001). In der vorliegenden Arbeit wurde bei 5% der SRS-Patienten eine maternale Duplikation des Bereichs 11p15 entdeckt.

Auf Grund dieser Beobachtungen sind vermutlich sowohl Faktoren auf Chromosom 7 als auch Faktoren auf Chromosom 11 an der Entstehung des SRS beteiligt. Daher sollte überlegt werden, ob es nicht verschiedene Untergruppen des Syndroms gibt, die sich klinisch zwar ähnlich sind, aber durch verschiedene Mechanismen entstehen.

Die Duplikation des Bereichs 11p15 im Zusammenhang mit dem SRS lässt vermuten, dass geprägte Gene im Bereich 11p15 für die Entstehung des Syndroms verantwortlich sind. Besonders interessant sind die Gene CDKN1C und IGF2, da Veränderungen der Nukleotidsequenz und des Methylierungsstatus dieser beiden Gene im Zusammenhang mit dem BWS beobachtet worden sind (s. Kap. 2.2.1.4.). Eine wesentliche Beteiligung von Mutationen in den geprägten wachstumsregulierenden IGF2- und CDKN1C-Genen an der Ätiologie des SRS konnten in der vorliegenden Studie aber bereits ausgeschlossen werden. In Zukunft sollten weitere wachstumsregulierende geprägte Gene des Bereichs 11p15 wie z.B. die H19- und ZNF215-Gene untersucht werden (s. Abb. 2.4).

In der vorliegenden Arbeit konnte ein Zusammenhang zwischen dem SRS und auftretenden Varianten im IGF2-Gen nicht eindeutig geklärt werden (s. Kap. 5.4). Daher sollte zukünftig mit größeren Patienten- und Kontrollkollektiven ein Zusammenhang zwischen Varianten des IGF2-Gens und dem SRS untersucht werden.

6 Zusammenfassung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, eine Beteiligung des Chromosoms 11 an der Ätiologie des SRS zu untersuchen. Dabei wurde zum einen die Beteiligung einer mUPD11 sowie einer Duplikation des maternalen Bereichs 11p15.5 analysiert. Zum anderen wurden die beiden geprägten Kandidatengene IGF2 und CDKN1C in der Region 11p15.5 auf Mutationen untersucht. Weiterhin wurden die Häufigkeiten bekannter Varianten dieser Gene mit den Häufigkeiten der Varianten in Kontrollkollektiven verglichen.

Zusätzlich sollte in der vorliegenden Arbeit eine Veränderung des Methylierungsstatus des IGF2-Gens untersucht werden.

In einem Patientenkollektiv bestehend aus 46 SRS-Patienten konnte bei keinem der Patienten eine mUPD11 detektiert werden, so dass eine wesentliche Beteiligung einer mUPD11 an der Ätiologie des SRS ausgeschlossen werden konnte.

Bei der Untersuchung des Patientenkollektivs auf eine Duplikation des maternalen Bereichs 11p15.5 konnte allerdings bei zwei der 46 untersuchten Patienten eine Duplikation festgestellt werden. Diese wurde für die Patienten SRS 46 und SRS 90 mit Hilfe der FISH bestätigt. Sowohl Kosaki et al. (2000) als auch Fisher et al. (2002) berichten von Duplikationen dieses Bereiches im Zusammenhang mit Kleinwuchs und SRS. Mit den beiden in dieser Studie entdeckten Patienten sind somit sechs Fälle einer maternalen Duplikation 11p15.5 bekannt. In der vorliegenden Arbeit wurde bei 5% der untersuchten Patienten eine maternale Duplikation des Bereichs 11p15.5 beobachtet. Daher kann davon ausgegangen werden, dass eine Duplikation dieses Bereichs an der Ätiologie des SRS beteiligt ist. Diese könnte zum einen über eine vermehrte Expression von wachstumsunterdrückenden Genen oder über eine verminderte Expression wachstumsfördernder Gene zu dem Syndrom führen.

Bei 40 SRS-Patienten, bei denen keine Duplikation detektiert werden konnte, wurde nach Mutationen in den wachstumsregulierenden IGF2- und CDKN1C-Genen gesucht.

Im IGF2-Gen konnte keine Mutation entdeckt werden. Allerdings konnten insgesamt 5 Varianten (g.6814_6819 delAGGGC, g.1156 T>C, g.1926 C>G, g.1252 T>C, g.4225 A>G) detektiert werden, von denen die Variante g.1252 T>C in der Literatur bisher noch nicht beschrieben worden ist.

Da Gaunt et al. (2001) bei einigen Varianten des IGF2-Gens einen Zusammenhang zwischen dem BMI und den Varianten beobachtet hatten, wurden die Häufigkeiten der Varianten des

IGF2-Gens mit den Häufigkeiten in deutschen normalwüchsigen Patienten verglichen. Dabei fiel auf, dass sich die Häufigkeitsverteilung der Varianten g.6814_6819 delAGGGC, g. 1252 T>C und g.4225 A>G in den beiden Kollektiven statistisch-signifikant unterschieden. Um dieses Ergebnis zu bestätigen, wurden weitere 19 SRS-Patienten und 66 Kontrollen unbekannter Herkunft sowie Körpergröße untersucht. Es konnte wieder eine unterschiedliche Häufigkeitsverteilung der Varianten beobachtet werden, die aber nach statistischer Analyse der Daten nicht mehr signifikant war. Daher sollte in Zukunft bei weiteren SRS-Patienten und Kontrollen bekannter Körpergröße und Herkunft die Varianten g.6814_6819 delAGGGC, g. 1252 T>C und g.4225 A>G untersucht werden, um einen möglichen Zusammenhang zwischen den Varianten und dem SRS zu bestätigen oder auszuschließen.

Für die Variante g.6814_6819 delAGGGC wird von Gaunt et al. (2001) postuliert, dass diese Deletion zu einer verminderten Affinität des CCAAT/enhancer binding Proteins (CEBP α) zu seiner Bindungsstelle, die 27 bp von der Deletion entfernt liegt, führt. Dies wiederum resultiert in einer verminderten IGF2 Promotoraktivität P1 und damit in einer geringeren Expression des IGF2-Gens. Über diesen Mechanismus könnte die Variante g.6814_6819 delAGGGC zu Kleinwuchs führen.

Im CDKN1C-Gen wurden zwei in der Literatur schon bekannte Varianten (g.1144 G>A und die 12 bp Deletion im PAPA-Bereich des Gens) beobachtet. Weiterhin wurden drei bisher in der Literatur noch nicht beschriebene Veränderungen der DNA-Sequenz detektiert (g.963 G>A und g.2681 C>T, g.2773_2774 insG). Die Variante g.2773_2774 insG sowie die beiden bekannten Varianten g.1144 G>A und die 12 bp Deletion im PAPA-Bereich wurden im Kontroll- und Patientenkollektiv in ähnlicher Häufigkeit beobachtet. Eine Heterozygotie der Varianten g.963 G>A und g.2681 C>T dagegen konnten jeweils nur bei einem Patienten des SRS-Kollektives und bei keiner der 70 untersuchten Kontrollpersonen gefunden werden. Die Variante g.963 G>A liegt 264 bp vom Startcodon des CDKN1C-Gens entfernt und führt somit zu keiner veränderten Aminosäuresequenz. Die Variante wurde bei dem Patienten SRS 56 maternal vererbt. Da das CDKN1C-Gen maternal exprimiert wird, ist es denkbar, dass die Variante auf dem maternal vererbten Allel zu einer vermehrten Expression des CDKN1C-Gens und damit zu einer Wachstumsunterdrückung führt. Die Variante g.2681 C>T liegt im Exon 3. Sie wurde bei dem Patienten SRS 71 detektiert. Da beide Eltern die Wildtypsequenz aufweisen, liegt bei diesem Patienten eine Neumutation vor. Sie führt aber zu keiner Veränderung der Proteinsequenz, so dass davon ausgegangen werden kann, dass sie nicht für die Entstehung des SRS verantwortlich ist.

Über Veränderungen des Methylierungsstatus des IGF2-Gens kann in der vorliegenden Arbeit leider keine Aussage getroffen werden. Der methylierungssensitive Verdau nach Algar et al. (2000) konnte nicht etabliert werden, da kein vollständiger Verdau der genomischen DNA mit dem Enzym *HpaII* erreicht werden konnte. In Zukunft sollte der Methylierungsstatus des IGF2-Gens mit Hilfe anderen Methoden überprüft werden.

Zusammenfassend zeigen die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit, dass eine maternale Duplikation des Bereichs 11p15.5 an der Ätiologie des SRS beteiligt ist. Um festzustellen wie häufig diese Veränderung zu SRS führt, sind Untersuchungen an weiteren Patientenkollektiven erforderlich. Die Duplikation im Bereich 11p15.5 lässt vermuten, dass geprägte Gene dieses Bereichs an der Entstehung des Syndroms beteiligt sind. Eine wesentliche Beteiligung der geprägten wachstumsregulierenden IGF2- und CDKN1C-Gene konnte in der vorliegenden Studie ausgeschlossen werden. Allerdings konnte ein Zusammenhang zwischen bekannten Varianten des IGF2-Gens und dem SRS nicht eindeutig geklärt werden, so dass weitere Untersuchungen an größeren Kontroll- und SRS-Kollektiven notwendig sind. Zusätzlich sollte in weiteren Studien bei SRS-Patienten nach Mutationen und Prägungsveränderungen anderer wachstumsregulierender Gene im Bereich 11p15.5 gesucht werden.

7 Anhang

7.1 Verwendete Primer

Marker	Name	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz
GGAA17G05	D11S1984	gggtgacagagcaaaattct	acacctggatcttggactca
AFMb355za9	D11S4177	gacggtgaaccagtcatt	tgtcagcacagaggcagagt
AFMb042yf5	D11S4046	actccagcctgggaaac	tgatagacacaccattgc
AFM218xe1	D11S1318	cccgtatggcaacagg	tgtgcatgncatgagt
AFM217yb10	D11S922	ggggcatctttggcta	tccggtttggttcagg
AFM098yb3	D11S1758	gtcaaggtagcccaggaaat	ccagtgttctcacaactgagta

Tab. 7.1: Mikrosatellitenmarker zur Untersuchung von Chromosom 11 auf eine UPD11 oder eine Duplikation

Marker	Name	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz
	D11S2071	agggcaatgaggacatgaac	atgtggctggccacctg
AFMa155te9	D11S4088	gggcagaggcagtggag	gcatgtttcgggggtg
AFMc006xb9	D11S4181	gggcacctgtaatccca	gaactgagaccaagaacattattcc
AFM114yc9	D11S1760	gatcctaagtgttccccac	aaacgatgtctgtccactca
AFM277wg1	D11S1331	gctgcttccatgagaggatactg	gcagagccctttgcagtctt
AFM289yc5	D11S1338	gacggttaactgtatatctaagac	taatgctacttattggagtgtg
AFMb285xh9	D11S4149	tgaattatacccctgaccaa	cccagccaatatcagca
AFM330wd5	D11S4189	gcaccctcaactgacc	ggccctgcataagagc
AFM283wg1	D11S1334	tgcagcatagnctgt	agctttattgaaagtcatTTTTg
AFMb341ye5	D11S4170	cacacatcattcctcagaag	aatttaagtcaatcccaatc
AFM306xg5	D11S4121	acctcccacccagat	tcagttgttctcagtgtagtttatg
AFMa337yd1	D11S4125	gaagtcaaaaccctgaagt	tctagtgcagcagaatcccaa

Tab 7.2: Zusätzliche Mikrosatellitenmarker zur Eingrenzung der maternalen Duplikation bei den Patienten SRS 46 und 90

Exon	Primer- bezeichnung	Nukleotid- position (Klon)	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz
5'UTR	SNP1/2	6733-6960 (GI 307071)	tgacctagctacctgtggctg	tgagctcagagcttcaggaccag
1	1 1/2	6935-7128 (GI 307071)	gccctgttctgaagctctg	ccatggacggctgctgccga
1	1 3/4	7057-7277 (GI 307071)	gggtggacggccggacactg	ggcaacagcttgccgatgg
2	2 1/2	-7-256 (X03432)	aagtgccttcgtttctccag	caagggatgggagcccagtta
3	3 1/2	1083-1248 (GI 2706516)	aagccgctgccagatcctg	cggtggtgactcttcggccc
3	3 3/4	1164-1486 (GI 2706516)	tatggggagggggctttgc	tcagggtgctgagacactc
4	4 1/2	228-448 (GI 33051)	gtttagtcattaatcacggt	gctctggggacttcgtagga
4	4 3/4	384-607 (GI 33051)	ccccaacccgcgcacagcg	gaagaccggggacaatgcc
4	4 5/6	545-797 (GI 33051)	caggaaagcgaccgggcatt	aggggagcagagggcgagg
5	5 1/2	1668-1892 (GI 33003)	ccccgctcttgctcgggtt	gagcgcgggcaggcgtgggc
5	5 3/4	1811-2057 (GI 33003)	ccgcagttcgaatgatctcc	aagaggagggcgggggaat
5	5 5/6	1982-2196 (GI 33003)	cggtcccgggcgccgtccgc	aaggggagcggcccaggct
5	5 7/8	2102-2289 (GI 33003)	gcaggcagtcggctcgcag	gcgggcgccagctcggttt
5	5 9/10	2254-2524 (GI 33003)	cccgggctcgcgacggcaga	aggcgagagggcgggcgtga
5	5 11/12	2474-2706 (GI 33003)	ccagtcctagcctccgact	gctgttgcataagataga
5	5 13/14	2656-2874 (GI 33003)	cactctgtctctcccactat	ccgagtcgccccggccgaat
5	5 15/16	2753-3050 (GI 33003)	ggccccccagccccgaaga	gccgggagcgggcggagg
6	6 1/2	3825-4097 (GI 33003)	ggagccccggctgggaggag	gcgggctgggcggctgcagg
6	6 3/4	4056-4265 (GI 33003)	cggeccacgctgggectcg	agcatgcagcgggtgcggagc
9	9 3/4	8041-8247 (GI 33003)	cgccgtggtcaggaggagg	cgccgtggtcaggaggagg
3'UTR	UTR 13/14	1887-2117 (X07868)	aggccaaagtcccgctaaga	aaggaggccagcctcacaag

Tab. 7.3: Primersequenzen zur Untersuchung des IGF2-Gens auf Mutationen. Die Primersequenzen wurden von Gaunt et al. (2001) übernommen. Die fett gedruckten Sequenzen wurden wegen unspezifischer PCR-Produkte verändert.

Primerbezeichnung	Nukleotidposition (Klon)	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz
P2/P3	g.8703-g.8995 (X03562)	cttgactttgagtcaaattgg	ggcgtgccaattacattca
P3/P4	g.7796-g.8995 (X03562)	gctcagacgctggctcctt	ggcgtgccaattacattca

Tab. 7.4: Primersequenzen für die Untersuchung des Methylierungsstatus des IGF2-Gens nach Algar et al. 2000

Exon	Primerbezeichnung	Nukleotidposition	Vorwärtssequenz	Rückwärtssequenz
1	A F/R	g.939-1311 (GI 992945)	gctggtgcgcactagtactactg	gcgtccacaggccaagtgcgctg
2	B F/R	1238-1516 (GI 992945)	cgtccctccgcagcaacatcc	acctgcaccgtctcgcggtagaacg
2	C F/R	1462-1766 (GI 992945)	agtggaccgaagtggacagcgactc	ggggccaggaccgcgacc
2	F F/R	1616-2162 (GI 992945)	aggaggcgccggagcagctgcc-tagtgtc	cttaatgccacgggaggagg
3	H F/R	2458-2926 (GI 992945)	ttggcgggcgacgtaaacaagctg	ggttgctgctacatgaacgg
3	H2 F/R	2739-2926 (GI 992945)	cggtagccaagtgagtaca	ggttgctgctacatgaacgg
3	H3 F/R	GI 992945	cagatttcttcgccaagcgc	tgttaccacttggtcaccg

Tab. 7.5: Primersequenzen zur Untersuchung des CDKN1C-Gens (nach Lam et al. 1999)

7.2 PCR-Bedingungen

Marker	Modifikationen	PCR-Programm	Zyklenzahl
D11S1984		94°C 30'', 59°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S4177		94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	35
D11S4046	Q-Solution	94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S1318	Q-Solution	94°C 30'', 55°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S922		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S1758		94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	35
D11S2071		94°C 30'', 55°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S4088	Q-Solution	94°C 30'', 62°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S4181		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S1760		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S1331		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S1338		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S4149		94°C 30'', 59°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S4189	Q-Solution	94°C 30'', 59°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S1334		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	35
D11S4170		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	35
D11S4121		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	40
D11S4125		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	40

Tab. 7.6: PCR-Bedingungen der Mikrosatellitenmarker

Primer	Modifikationen	PCR-Programm	Zyklenzahl
P2/P3		94°C 30'', 55°C 1', 72°C 1'30''	40
P3/P4	Accu-Prime	94°C 30'', 65,5°C 45'', 72°C 2'	39

Tab. 7.7: PCR-Bedingungen der Primerpaare zur Überprüfung des Methylierungsstatus des IGF2-Gens

Primer	Modifikationen	PCR-Programm	Zykluszahl
SNP1/2		94°C 30'', 47°C 1', 72°C 1'30''	40
1 1/2	Q-Solution	94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	35
1 3/4	Q-Solution	94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	40
2 1/2		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	40
3 1/2	Q-Solution	94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	40
3 3/4		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	35
4 1/2	Q-Solution	94°C 30'', 51°C 1', 72°C 1'30''	40
4 3/4		94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	35
4 5/6	Q-Solution	94°C 30'', 66°C 1', 72°C 1'30''	40
5 1/2	Q-Solution	94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	40
5 3/4	Q-Solution	94°C 30'', 61°C 1', 72°C 1'30''	40
5 5/6	Q-Solution	94°C 30'', 62°C 1', 72°C 1'30''	40
5 7/8		94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	40
5 9/10	Q-Solution	94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	35
5 11/12	Q-Solution	94°C 30'', 53°C 1', 72°C 1'30''	35
5 13/14	Q-Solution	94°C 30'', 53°C 1', 72°C 1'30''	35
5 15/16	Q-Solution	94°C 30'', 64°C 1', 72°C 1'30''	40
6 1/2	Q-Solution	94°C 30'', 69°C 1', 72°C 1'30''	40
6 3/4	Q-Solution	94°C 30'', 57°C 1', 72°C 1'30''	40
9 3/4	Q-Solution	94°C 30'', 58°C 1', 72°C 1'30''	40
UTR 13/14	Q-Solution	94°C 30'', 59°C 1', 72°C 1'30''	35

Tab. 7.8: PCR-Bedingungen der IGF2-Primer

Primer	Veränderte Reagenzien	PCR-Programm	Zykluszahl
A F/R	MgCl ₂ 0,66mM DMSO 12%	94°C 30'', 50°C 1', 72°C 1'30''	40
B F/R	Q-Solution	94°C 30'', 60°C 30'', 72°C 1'30''	40
C F/R	MgCl ₂ 0,66mM DMSO 10%	94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	40
F F/R	MgCl ₂ 0,66mM DMSO 12%	94°C 45'', 60°C 1'30'', 72°C 1'30''	40
H F/R	MgCl ₂ 0,66mM DMSO 11%	94°C 30'', 50°C 1', 72°C 1'30''	40
H2 F/R	Q-Solution	94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	40
H3 F/R	Q-Solution	94°C 30'', 60°C 1', 72°C 1'30''	40

Tab. 7.9: PCR-Bedingungen der CDKN1C-Primer

7.3 Ergebnisse der Mikrosatellitenanalyse

Familie	Vater	Mutter	Kind	Informativität
2	3,4	1,2	1,4	+
3	1,4	2,3	1,2	+
5	1,2	1,3	2,3	+
6	1,3	2,3	3,3	+
12	1,2	1,2	2,2	+
13	2,4	1,3	2,3	+
14	1,1	1,2	1,1	+
16	-	1,2	1,3	+
17	1,3	-	2,3	+
22	3,3	1,2	2,3	+
26	1,1	1,2	1,1	+
27	1,4	2,3	3,4	+
29	-	2,3	1,3	+
32	1,3	1,2	1,2	-
34	2,3	1,1	1,3	+
35	1,1	-	1,2	+
37	1,1	2,2	1,2	+
40	2,2	1,3	1,2	+
41	2,2	1,3	2,3	+
42	1,2	3,3	2,3	+
44	-	2,3	1,2	+
45	1,1	1,2	1,2	-
46	1,2	2,2	1,2	+
50	1,1	2,3	1,3	+
51	1,2	2,2	1,2	+
55	1,1	1,1	1,1	-
56	2,2	1,3	1,2	+
57	1,2	2,2	1,2	+
59	1,2	2,2	1,2	+
63	1,2	2,3	1,3	+
65	1,2	2,3	1,3	+
66	1,3	2,3	3,3	+
68	1,2	3,3	1,3	+
70	1,2	-	2,3	+
71	2,3	1,3	2,3	+
73	1,2	3,4	2,3	+
76	-	1,2	1,2	-
80	1,2	1,3	2,3	+
83	1,2	2,3	1,3	+
84	2,3	1,4	3,4	+
90	2,3	1,1	1,3	+
91	1,3	2,2	1,2	+
93	1,2	3,4	1,4	+
96	1,1	2,3	1,2	+

Tab. 7.10: Ergebnisse der Untersuchung des Patientenkollektivs auf mUPD11 mit dem Mikrosatellitenmarker D11S4046.

Familie	Vater	Mutter	Kind	Informativität
2	1,3	1,2	1,2	-
3	1,1	1,1	1,1	-
5	1,2	1,2	1,2	-
6	1,3	1,2	1,2	-
12	1,1	1,2	1,1	+
13	1,2	3,4	2,4	+
14	1,3	1,2	2,3	+
16	-	1,2	1,2	-
17	1,4	-	2,3	+
19	2,4	1,3	1,4	+
22	1,3	1,2	1,1	+
25	2,3	1,1	1,3	+
26	1,2	3,4	1,4	+
27	3,4	1,2	2,3	+
29	-	2,2	1,2	+
32	1,2	2,2	2,2	-
34	1,2	1,2	1,2	-
35	1,2	-	1,3	+
37	2,3	1,1	1,2	+
40	1,3	1,2	1,2	-
41	1,3	2,4	1,2	+
42	3,4	1,2	2,3	+
44	-	2,3	1,3	+
45	2,4	1,3	3,4	+
46	1,2	1,1	1,1	-
50	2,3	1,2	1,3	+
51	1,2	3,3	2,3	+
55	-	1,3	1,2	+
56	1,3	2,2	2,3	+
57	1,3	2,4	1,2	+
59	1,1	1,2	1,2	-
63	1,1	1,2	1,2	-
65	1,1	1,1	1,1	-
66	1,1	1,1	1,1	-
68	1,3	2,4	2,3	+
70	1,2	-	2,2	+
71	-	1,2	2,3	+
73	2,3	1,2	1,3	+
76	1,3	2,3	1,3	+
80	2,3	1,2	1,3	+
83	1,3	2,4	3,4	+
84	1,2	2,2	1,2	+
90	2,3	1,2	1,3	+
91	1,3	2,2	1,2	+
93	1,1	1,2	1,1	+
96	3,4	1,2	2,4	+

Tab. 7.11: Ergebnisse der Untersuchung des Patientenkollektivs auf mUPD11 mit dem Mikrosatellitenmarker D11S1984.

Familie	Vater	Mutter	Kind	Informativität
2	1,2	3,4	1,4	+
3	1,3	2,3	1,2	+
5	1,2	2,3	1,2	+
6	1,1	2,3	1,2	+
12	1,2	1,2	1,1	+
13	1,2	1,2	2,2	+
14	1,2	2,2	2,2	+
16	-	1,2	2,3	+
17	1,2	-	1,2	+
19	1,3	1,2	2,3	+
22	1,3	2,4	1,2	+
25	2,4	1,3	1,2	+
26	1,2	2,3	2,3	+
27	1,3	2,2	1,2	+
29	-	1,2	1,2	-
32	2,2	1,3	2,3	+
34	1,4	2,3	2,4	+
35	1,2	1,2	2,2	+
37	1,3	1,2	2,3	+
40	1,2	1,3	1,3	-
41	1,1	1,2	1,1	+
42	1,3	2,3	1,2	+
44	-	2,2	1,2	+
45	2,3	1,3	3,3	+
46	2,4	1,3	3,4	+
50	1,3	1,2	1,1	+
51	1,2	2,3	1,2	+
55	-	1,2	1,3	+
56	2,3	1,2	1,3	+
57	1,1	2,2	1,2	+
59	1,2	3,3	1,3	+
63	1,2	2,3	2,2	+
65	3,4	1,2	1,4	+
66	1,2	3,3	1,3	+
68	1,3	1,2	1,1	+
70	2,2	-	1,2	+
71	1,1	1,2	1,2	-
73	1,2	1,3	2,3	+
76	-	1,2	1,2	-
80	1,1	1,2	1,2	-
83	1,1	1,2	1,1	+
84	1,2	1,2	2,2	+
90	1,2	3,3	1,3	+
91	-	1,2	2,3	+
93	2,3	1,2	1,3	+
96	1,3	2,2	1,2	+

Tab. 7.12: Ergebnisse der Untersuchung des Patientenkollektivs auf mUPD11 mit dem Mikrosatellitenmarker D11S1318.

Familie	Vater	Mutter	Kind	Informativität
2	2,3	1,2	1,2	-
3	1,2	3,3	2,3	-
5	2,4	1,3	3,4	+
6	2,2	1,2	1,2	-
12	2,2	1,2	2,2	+
13	2,3	1,4	2,4	+
14	1,3	2,2	2,3	+
16	-	1,1	1,2	+
17	1,3	-	2,3	+
19	1,2	1,1	1,2	+
22	1,2	1,2	1,1	+
25	2,3	1,3	2,3	+
26	1,2	2,2	1,2	+
27	1,3	2,4	3,4	+
29	-	1,2	1,1	+
32	2,3	1,2	1,2	-
34	1,3	2,3	1,3	+
35	1,1	-	1,1	+
37	1,3	2,2	1,2	+
40	1,1	1,1	1,1	-
41	2,3	1,3	1,2	+
42	1,3	1,2	1,1	+
44	-	1,2	1,2	-
45	2,2	1,3	1,2	+
46	1,3	1,2	1,3	+
50	2,3	1,3	1,3	-
51	2,3	1,4	2,4	+
55	-	1,2	2,3	+
56	1,3	2,2	1,2	+
57	2,3	1,3	1,2	+
59	1,2	2,3	2,3	-
63	1,2	2,2	1,2	+
65	1,1	2,3	1,2	+
66	1,1	1,1	1,1	-
68	2,3	1,3	1,3	-
70	2,2	-	1,2	+
71	1,2	2,2	1,2	+
73	1,2	2,3	2,3	+
76	-	1,2	1,2	-
80	1,1	1,2	1,2	-
83	1,3	2,2	1,2	-
84	1,3	2,3	1,3	+
90	1,2	1,2	1,1	+
91	3,4	1,2	1,4	+
93	1,1	1,2	1,1	+
96	3,3	1,2	1,3	+

Tab. 7.13: Ergebnisse der Untersuchung des Patientenkollektivs auf mUPD11 mit dem Mikrosatellitenmarker D11S4177.

Familie	Vater	Mutter	Kind	Informativität
17	1,2	-	2,3	+
35	1,1	-	1,1	+
40	1,2	2,3	2,3	-
46	2,2	1,3	1,2	+
70	1,2	-	1,2	+
71	1,2	1,2	1,2	-
76	-	1,2	1,1	+
80	2,2	1,1	1,2	+

Tab. 7.14: Ergebnisse der Untersuchung nichtinformativer Patienten auf mUPD11 mit dem Mikrosatellitenmarker D11S1758.

Familie	Vater	Mutter	Kind	Informativität
2	1,2	3,4	2,4	+
3	1,1	2,3	1,2	+
12	1,3	2,4	1,4	-
17	1,2	-	1,3	+
16	-	1,2	1,3	+
29	1,3	-	2,3	+
32	1,2	1,2	1,2	-
35	1,2	-	1,2	+
40	1,2	3,3	2,3	+
42	1,3	2,3	3,3	+
46	1,4	2,3	3,4	+
55	-	1,3	2,3	-
65	2,2	1,3	1,2	+
70	1,3	-	2,3	+
71	1,2	3,3	1,3	+
76	-	1,3	1,2	+
90	1,1	2,3	1,3	+
91	1,1	2,3	1,2	+
96	1,2	3,4	2,3	+

Tab. 7.15: Ergebnisse der Untersuchung nichtinformativer Patienten auf mUPD11 mit dem Mikrosatellitenmarker D11S922.

Marker	Vater SRS 17	SRS-Patient 17
D11S1758	1,2	2,3
D11S922	1,2	1,3
D11S1984	1,4	2,3
D11S1318	1,2	1,2
D11S4177	1,3	2,3
D11S4046	1,3	2,3
D11S2071	2,3	1,3
D11S4189	1,3	1,2
D11S1349	2,3	1,1
D11S1999	2,2	1,2
D11S1346	1,1	2,2
D11S4189	1,3	1,2
D11S1329	2,3	1,1
D11S934	1,3	1, 2
D11S925	1,2	1,1
D6S308	2,4	1,3
D6S1828	1,2	1,2
D7S260	1,2	2,2
D7S640	1,1	1,1
D7S621	1,3	2,4

Tab. 7.18: Marker zur Vaterschaftsüberprüfung von Patient SRS 17

7.4 Genotypen der Patienten und Kontrollen

7.4.1 IGF2-Gen

Patient SRS	g.6814_6819 delAGGGC	g.1156 T>C	g.1252 T>C	g.4225 A>G	g.1926 C>G	g.8767 G>A
2	wt	T/C	T/C	A/G	C/C	A/A
3	wt	T/C	T/C	A/G	C/C	A/A
5	wt	T/C	T/T	G/G	C/G	G/A
6	wt	T/T	C/C	A/G	C/C	A/A
12	wt/del	T/C	T/C	A/G	C/C	A/A
13	wt	C/C	C/C	A/A	C/C	A/A
14	wt	T/T	T/C	A/G	C/C	A/A
16	del/del	T/T	T/T	G/G	G/G	G/G
17	wt	T/C	T/C	G/G	C/C	A/A
22	wt/del	T/C	T/C	A/G	C/G	G/A
26	wt	T/C	T/C	G/G	C/G	G/A
27	wt/del	T/T	T/T	G/G	C/G	G/A
29	del/del	T/T	T/T	G/G	G/G	G/G
32	wt/del	T/T	T/C	A/G	C/G	G/A
34	wt/del	T/T	T/C	A/G	C/G	G/A
35	del/del	T/T	T/C	G/G	C/G	A/A
37	del/del	T/T	T/C	A/G	C/G	G/G
40	del/del	C/C	T/C	G/G	C/C	A/A
41	wt/del	T/C	T/C	G/G	C/G	G/A
42	wt	T/C	T/T	G/G	C/G	G/A
44	wt	C/C	T/T	G/G	C/G	G/A
45	wt	T/T	C/C	A/G	C/C	A/A
50	wt	T/T	C/C	A/G	C/C	A/A
51	wt/del	T/T	T/C	A/G	C/G	G/A
55	wt/del	T/T	T/C	A/G	C/G	G/A
56	wt/del	T/T	T/C	A/G	C/G	G/A
57	del/del	T/C	T/C	A/G	G/G	G/G
59	wt	T/C	T/C	A/G	C/G	G/A
63	wt	T/C	T/C	G/G	C/G	G/A
68	wt/del	C/C	T/C	A/G	C/G	G/A
70	wt/del	T/C	T/C	A/G	C/G	G/A
71	wt	T/C	T/C	G/G	C/C	A/A
73	wt	T/C	C/C	A/A	C/C	A/A
76	del/del	T/T	T/T	G/G	G/G	G/G
80	del/del	T/T	T/T	G/G	G/G	G/G
83	del/del	C/C	T/C	G/G	C/C	G/A
84	wt/del	T/C	T/T	A/G	C/G	G/A
91	wt/del	T/T	C/C	A/G	C/C	A/A
93	wt/del	T/T	T/C	G/G	C/G	G/G
96	wt	T/C	T/C	G/G	C/G	G/A

Tab. 7.19: Detektierte Varianten im IGF2-Gen im SRS-Patientenkollektiv

Kontrollen „T“	g.6814_6819 delAGGGC	g.1156 T>C	g.1252 T>C	g.4225 A>G	g.1926 C>G	g.8767 G>A
1	wt/del	T/C	T/C	A/G	C/C	----
2	wt/del	T/T	T/C	A/G	C/G	----
3	wt/del	T/T	T/C	G/G	G/G	----
4	wt	T/T	C/C	A/G	C/C	----
6	wt	T/T	C/C	A/G	C/C	----
8	wt	T/C	T/C	A/G	C/G	----
9	wt	T/T	T/C	A/G	C/G	----
10	wt/del	T/C	T/C	G/G	C/G	G/A
13	wt	T/T	T/C	G/G	G/G	G/G
14	wt/del	T/T	T/C	G/G	C/G	G/A
15	wt/del	T/T	C/C	A/A	C/C	A/A
17	wt	T/T	C/C	A/A	C/C	A/A
18	wt	C/C	C/C	A/G	C/C	A/A
19	wt	T/C	C/C	A/G	C/G	G/A
20	wt	T/C	T/T	G/G	C/G	G/A
21	wt	T/C	C/C	A/G	----	A/A
23	del/del	T/T	T/C	A/G	C/G	G/A
24	wt/del	C/C	T/C	A/G	C/C	A/A
25	wt	T/C	C/C	A/A	C/C	G/A
26	wt	T/T	T/C	A/G	C/G	G/A
34	wt	T/C	C/C	A/G	C/G	A/A
35	wt	T/C	C/C	A/A	C/C	A/A
36	wt	T/T	T/C	A/G	C/C	A/A
37	wt	T/T	T/C	A/G	C/C	G/A
38	wt	T/T	T/C	A/G	C/C	G/A
39	wt/del	T/C	T/C	A/G	C/G	G/A
40	wt/del	T/C	T/C	G/G	C/G	G/A
43	wt	T/C	T/C	A/G	C/G	A/A
44	wt/del	T/C	T/C	A/A	C/C	A/A
45	wt	T/C	T/C	A/A	C/C	A/A
47	wt	T/T	T/C	A/G	C/G	G/A
50	wt/del	T/C	T/C	A/G	C/C	A/A
51	wt	T/T	C/C	A/A	C/C	----
52	wt	T/C	T/C	A/G	C/G	A/A
53	wt	T/C	C/C	A/A	C/G	A/A
54	wt/del	T/T	T/T	G/G	C/C	----
55	wt	T/T	C/C	A/A	C/C	A/A
56	wt	T/C	T/C	A/G	C/C	A/A
57	wt/del	T/C	T/C	A/G	C/C	----
58	wt	T/C	C/C	A/G	C/G	A/A
59	wt	T/C	C/C	A/A	C/C	A/A
60	wt/del	T/C	T/T	G/G	C/G	G/A
61	wt/del	T/T	T/C	A/G	C/C	G/A
63	wt	T/T	C/C	A/G	G/G	A/A
65	wt	T/T	T/C	A/G	C/G	G/A
66	wt/del	T/C	T/C	A/G	C/G	G/A

67	wt	T/C	T/C	G/G	C/C	A/A
68	wt/del	T/T	T/C	A/G	C/C	A/A
69	wt/del	T/C	T/C	A/A	C/G	G/A
70	wt	T/C	C/C	A/A	C/C	G/G
71	wt/del	-----	-----	-----	-----	A/A
72	wt	-----	-----	-----	-----	A/A
73	wt/del	-----	-----	-----	-----	G/A
74	del/del	-----	-----	-----	-----	-----
80	wt/del	-----	-----	-----	-----	-----
81	wt	-----	-----	-----	-----	-----
82	wt/del	-----	-----	-----	-----	-----
84	wt/del	-----	-----	-----	-----	-----
85	wt	-----	-----	-----	-----	-----
86	wt	-----	-----	-----	-----	-----
87	wt	-----	-----	-----	-----	-----
88	wt	-----	-----	-----	-----	-----
92	wt/del	-----	-----	-----	-----	-----
93	wt	-----	-----	-----	-----	-----
94	wt	-----	-----	-----	-----	-----
95	wt	-----	-----	-----	-----	-----
96	wt/del	-----	-----	-----	-----	-----
97	wt/del	-----	-----	-----	-----	-----

Tab. 7.20: Detektierte Varianten im IGF2-Gen im Kontrollkollektiv „T“

Kontrollkollektiv „B“	g.6814_6819 delAGGGC	g.4225 A>G
1	wt	A/A
2	wt	G/G
3	wt	G/G
4	wt/del	A/G
5	wt/del	-----
6	wt	G/G
7	wt	A/G
8	wt/del	G/G
9	del/del	G/G
10	wt/del	G/G
11	wt/del	G/G
12	wt	A/A
13	wt	G/G
14	wt/del	G/G
15	wt	G/G
17	wt/del	A/G
18	wt/del	A/G
19	wt	A/A
20	wt/del	A/G
21	wt/del	A/A
22	wt	G/G
23	wt	G/G

24	wt/del	G/G
25	wt/del	A/G
26	wt	A/G
27	wt/del	A/G
28	wt	A/G
29	wt	A/A
30	wt/del	A/G
31	wt	A/G
32	wt	G/G
33	wt	A/G
34	wt/del	G/G
35	wt/del	G/G
36	wt	G/G
37	wt/del	-----
38	wt/del	G/G
39	wt	A/A
40	wt/del	A/G
41	wt/del	A/A
42	wt/del	A/G
43	wt	A/G
44	wt/del	A/G
45	wt/del	G/G
46	wt	A/G
47	wt	-----
48	wt/del	-----
49	wt	-----
50	wt	-----
51	wt	-----
52	del/del	-----
53	wt/del	-----
54	wt	-----
55	del/del	-----
56	wt	-----
57	del/del	-----
58	del/del	-----
59	wt	-----
60	wt/del	-----
61	wt	-----
63	del/del	-----
64	wt/del	-----
65	del/del	-----
66	wt	-----
68	wt/del	-----
69	del/del	-----

Tab. 7.21: Genotypen des Kontrollkollektivs „B“ für die Varianten g.6814_6819 delAGGGC und g.4225 A>G im IGF2-Gen.

Weitere SRS-Patienten	g.6814_6819 delAGGGC	g.4225 A>G
1	wt	A/G
7	wt/del	G/G
9	wt/del	G/G
18	wt	A/A
19	wt	A/G
21	wt	A/A
25	wt/del	A/G
30	wt/del	G/G
49	wt/del	A/G
58	wt/del	G/G
65	wt	A/G
66	wt/del	A/G
81	del/del	G/G
85	wt	A/G
89	del/del	G/G
92	wt/del	A/G
95	wt/del	G/G
99	wt	A/G
100	wt	A/G

Tab. 7.22: Genotypen weiterer SRS-Patienten für die Varianten g.6814_6819 delAGGGC und g.4225 A>G im IGF2-Gen.

7.4.2 CDKN1C-Gen

Patient SRS	g.963 G>A	g.1144 G>A	12 bp Deletion (Exon 2)	g.2681 C>T	g.2773_2774 insG
2	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
3	G/G	G/G	wt	C/C	wt
5	G/G	G/G	del/del	C/C	wt/ins
6	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
12	G/G	G/G	wt/del	C/C	ins/ins
13	G/G	G/A	wt/del	C/C	wt/ins
14	G/G	G/G	wt/del	C/C	ins/ins
16	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
17	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt
22	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt
26	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt
27	G/G	G/A	wt	C/C	wt/ins
29	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
32	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
34	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
35	G/G	G/G	wt	C/C	wt
37	G/G	G/G	wt	C/C	ins/ins
40	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt
41	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt
42	G/G	G/G	wt/del	C/C	ins/ins
44	G/G	G/A	wt	C/C	wt/ins
50	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt
51	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
55	G/G	G/G	wt	C/C	wt
56	G/A	G/G	wt	C/C	wt/ins
57	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
59	G/G	G/G	wt	C/C	wt
63	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
68	G/G	G/G	wt	C/C	wt
70	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
71	G/G	G/A	wt	C/T	wt/ins
73	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
76	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
80	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
83	G/G	G/A	wt	C/C	wt/ins
84	G/G	G/G	wt/del	C/C	-----
91	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt
93	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
96	G/G	G/G	wt	C/C	wt

Tab. 7.23: Detektierte Varianten des CDKN1C-Gens im SRS-Patientenkollektiv

Kontrollkollektiv „T“	g.963 G>A	g.1144 G>A	12 bp Deletion (Exon 2)	g.2681 C>T	g.2773_2774 insG
1	G/G	-----	wt	C/C	wt
4	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt
6	G/G	G/G	wt	C/C	wt
8	G/G	G/A	wt	C/C	wt
9	G/G	G/A	del/del	C/C	wt/ins
10	G/G	G/G	wt/del	C/C	ins/ins
13	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
14	G/G	-----	wt/del	C/C	wt/ins
15	G/G	G/G	del/del	C/C	wt/ins
17	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
18	G/G	-----	wt	C/C	wt
19	G/G	G/G	wt	C/C	wt
20	G/G	G/G	wt	C/C	wt
21	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
23	G/G	G/G	wt	C/C	wt
24	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
25	G/G	G/G	wt	C/C	wt
26	G/G	G/A	wt/del	C/C	ins/ins
34	G/G	-----	wt/del	C/C	wt
35	G/G	G/G	wt	C/C	wt
36	G/G	G/G	wt	C/C	wt
37	G/G	G/G	del/del	C/C	ins/ins
38	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
39	G/G	G/G	wt	C/C	wt
40	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
43	G/G	G/G	wt	C/C	wt
44	G/G	G/G	del/del	C/C	wt
45	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
47	G/G	G/G	wt/del	C/C	ins/ins
50	G/G	G/G	wt	C/C	wt
51	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt/ins
52	G/G	G/G	wt	C/C	wt
53	G/G	G/G	del/del	C/C	wt
54	G/G	G/G	wt	C/C	wt
55	G/G	-----	wt	C/C	wt/ins
56	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt
57	G/G	G/G	wt	C/C	wt
58	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
59	G/G	G/G	del/del	C/C	ins/ins
60	G/G	-----	wt/del	C/C	wt
61	G/G	G/G	wt	C/C	wt/ins
63	G/G	G/G	wt	C/C	wt
65	G/G	G/G	wt/del	C/C	wt
66	G/G	G/G	wt/del	C/C	-----
67	G/G	G/A	wt	C/C	-----
68	G/G	G/G	wt	C/C	-----

70	G/G	G/G	wt	C/C	-----
71	G/G	G/A	wt	C/C	-----
72	G/G	G/G	wt/del	C/C	-----
73	G/G	G/G	wt/del	C/C	-----
74	G/G	G/G	wt/del	C/C	-----
80	G/G	G/G	wt/del	C/C	-----
81	G/G	G/G	wt/del	C/C	-----
82	G/G	G/G	wt	C/C	-----
84	G/G	G/G	wt	C/C	-----
85	G/G	G/A	wt	C/C	-----
86	G/G	G/A	wt	C/C	-----
87	G/G	G/G	-----	C/C	-----
88	G/G	G/G	wt/del	C/C	-----
92	G/G	-----	wt	C/C	-----
94	G/G	-----	wt	C/C	-----

Tab. 7.24: Detektierte Varianten im CDKN1C-Gen im Kontrollkollektiv "T"

8 Literaturliste

8.1 Zitierte Publikationen

- Algar E, Brickell S, Deeble G, Amor D (2002)
Analysis of CDKN1C in Beckwith Wiedemann Syndrome. *Hum Mut* 15: 497-508.
- Barlow DP (1997)
Competition- a common motif for the imprinting mechanism? *Embo J* 16: 6899-6905.
- Bartolomei MS and Tilghman SM (1997)
Genomic imprinting in mammals. *Annu Rev Genet* 31: 493-525.
- Baumer A, Wiedemann U, Hegersberg M, Schnitzel A (2001)
A novel MSP/DHPLC Method for the Investigation of the methylation status of imprinted genes enables the molecular detection of low cell mosaicisms. *Hum Mut* 17: 423-430
- Boyes J and Bird A (1992)
Repression of genes by DNA methylation depends on CpG density and promoter strength: evidence for involvement of a methyl-CpG binding protein. *Embo J* 11: 327-333.
- Brown KW, Gardner A, Williams JC, Mott MG, McDermott A, Maitland NJ (1992)
Paternal origin of 11p15 duplications in the Beckwith-Wiedemann syndrome. A new case and review of the literature. *Cancer Genet Cytogenet* 58: 66-70.
- Cassidy SB (1997)
Prader-Willi syndrome. *J Med Genet* 34: 917-923.
- Chauvel PJ, Moore CM, Haslam RH (1975)
Trisomy-18 mosaicism with features of Russell-Silver syndrome. *Dev Med Child Neurol* 17: 220-224.
- Cowell CT (1995)
Short stature. In: Brook CGD (ed) *Clinical Paediatric Endocrinology*, Third edn. Blackwell Science Ltd
- DeChiara TM, Robertson ET, Efstratiadis A (1991)
Parental imprinting of the mouse insulin-like growth factor II gene. *Cell* 64: 849-59.
- Duncan PA, Hall JG, Shapiro LR, and Vibert BK (1990)
Three-generation dominant transmission of the Silver-Russell syndrome. *Am J Med Genet* 35: 245-250.
- Eggerding FA, Schonberg SA, Chehab FF, Norton ME, Cox VA, Epstein CJ (1994)
Uniparental isodisomy for paternal 7p and maternal 7q in a child with growth retardation. *Am J Hum Genet* 55: 253-265.

Eggermann T, Wollmann HA, Kuner R, Eggermann K, Enders H, Kaiser P, Ranke MB (1997)

Molecular studies in 37 Silver-Russell syndrome patients: frequency and etiology of uniparental disomy. *Hum Genet* 100: 415-419.

Eggermann T, Wollmann HA, Zerres K (2002)

Maternale uniparentale Disomie 14; ein weiteres Imprintingsyndrom. *Monatsschr Kinderheilkd* 150: 856-865.

Elliott M and Maher ER (1994)

Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 31: 560-564.

Engel E (1980)

A new genetic concept: uniparental disomy and its potential effect, isodisomy. *Am J Med Genet* 6: 137-143.

Engel JR, Smallwood A, Harper A, Higgins MJ, Oshimura M, Reik W, Schofield PN, Maher ER (2000)

Epigenotype-phenotype correlations in beckwith-wiedemann syndrome. *J Med Genet* 37: 921-926.

Escobar V, Gleiser S, Weaver DD (1978)

Phenotypic and genetic analysis of the silver-Russell syndrome. *Clin Genet* 13: 278-288.

Falls JG, Pulford DJ, Wylie AA, Jirtle RL (1999)

Genomic imprinting: implications for human disease. *Am J Pathol* 154: 635-647.

Fisher AM, Thomas NT, Cockwell A, Stecko O, Kerr B, Temple IK, Clayton P (2002) Duplications of chromosome 11p15 of maternal origin result in a phenotype that includes growth retardation. *Hum Genet* 111: 290-296.

Gaunt TR, Cooper JA, Miller GJ, Day IN, O'Dell SD (2001)

Positive associations between single nucleotide polymorphisms in the IGF2 gene region and body mass index in adult males. *Hum Mol Genet* 10: 1491-501.

Giannoukakis N, Deal C, Paquette J, Goodyer CG, Polychronakos C (1993)

Parental genomic imprinting of the human IGF2 gene. *Nat Genet* 4, 98-101.

Grandjean V, Smith J, Schofield PN, Ferguson-Smith AC (2000)

Increased IGF-II protein affects p57kip2 expression in vivo and in vitro: implications for Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97:5279-5284.

Hassold T, Hunt P (2001)

To err (meiotically) is human: the genesis of human aneuploidy. *Nat Rev Genet* 2: 280-291.

Hatada I, Ohashi H, Fukushima Y, Kaneko Y, Inoue M, Komoto Y, Okada A, Ohishi S, Nabetani A, Morisaki H, Nakayama M, Niikawa N, Mukai T (1996)

An imprinted gene p57KIP2 is mutated in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nat Genet* 14: 171-173.

Henry I, Puech A, Riesewijk A, Ahnine L, Mannens M, Beldjord C, Bitoun P, Tournade MF, Landrieu P, Junien C (1993)

Somatic mosaicism for partial paternal isodisomy in Wiedemann-Beckwith syndrome: a post-fertilization event. *Eur J Hum Genet* 1: 19-29.

Hitchins MP, Stanier P, Preece MA, Moore GE (2001)

Silver-Russell syndrome: a dissection of the genetic aetiology and candidate chromosomal regions. *J Med Genet* 38: 810-819.

Hwa V, Oh Y, Rosenfeld RG (1999)

The insulin-like growth factor-binding protein (IGFBP) superfamily. *Endocr Rev* 20: 761-87.

Joyce JA, Lam WK, Catchpoole DJ, Jenks P, Reik W, Maher ER, Schofield PN (1997) Imprinting of IGF2 and H19: lack of reciprocity in sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome. *Hum Mol Genet* 6: 1543-1548.

Joyce CA, Sharp A, Walker JM, Bullman H, and Temple IK (1999)

Duplication of 7p12.1-p13, including GRB10 and IGFBP1, in a mother and daughter with features of Silver-Russell syndrome. *Hum Genet* 105: 273-280.

Kornfeld S (1992)

Structure and function of the mannose 6-phosphate/insulin-like growth factor II receptors. *Annu Rev Biochem* 61: 307-330.

Kosaki K, Kikuchi T, Yoshihashi H, Kosaki R, Suzuki T, Smith R, Matsuo N (2000)

Russell-Silver syndrome as a phenotype resulting from defects in the IGF1R axis: the ligand IGF2, its receptor IGF1R, or the signaling modulator GRB10. *Am J Hum Genet* 67: 1932.

Kotzot D, Schmitt S, Bernasconi F, Robinson WP, Lurie IW, Ilyina H, Mehes K, Hamel BC, Otten BJ, Hergersberg M, Werder E, Schoenle E, Schinzel A (1995)

Uniparental disomy 7 in Silver-Russell syndrome and primordial growth retardation. *Hum Mol Genet* 4: 583-587.

Kotzot D (1999)

Abnormal phenotypes in uniparental disomy (UPD): fundamental aspects and a critical review with bibliography of UPD other than 15. *Am J Med Genet* 82: 265-274.

Kotzot (2001)

Complex and segmental uniparental disomy (UPD): review and lessons from rare chromosomal complements. *J Med Genet* 38: 497-507.

Lam WW, Hatada I, Ohishi S, Mukai T, Joyce JA, Cole TR, Donnai D, Reik W, Schofield PN, Maher ER (1999)

Analysis of germline CDKN1C (p57KIP2) mutations in familial and sporadic Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) provides a novel genotype-phenotype correlation. *J Med Genet* 36: 518-23.

Lee MH, Reynisdottir I, Massague J (1995)

Cloning of p57KIP2, a cyclin-dependent kinase inhibitor with unique domain structure and tissue distribution. *Genes Dev* 9: 639-649.

- Li M, Squire JA, Weksberg R (1998)
Overgrowth syndromes and genomic imprinting: from mouse to man. *Clin Genet* 53: 165-70.
- Lin CC, Santolaya-Forgas J (1998)
Current concepts of fetal growth restriction: part I. Causes, classification, and pathophysiology. *Obstet Gynecol* 92:1044-1055.
- Lucassen AM, Julier C, Beressi JP, Boitard C, Froguel P, Lathrop M, Bell JI (1993) Susceptibility to insulin dependent diabetes mellitus maps to a 4.1 kb segment of DNA spanning the insulin gene and associated VNTR. *Nat Genet* 4: 305-310.
- Maher ER and Reik W (2000)
Beckwith-Wiedemann syndrome: imprinting in clusters revisited. *J Clin Invest* 105: 247-252.
- Matsuoka S, Edwards MC, Bai C, Parker S, Zhang P, Baldini A, Harper JW, Elledge SJ (1995)
p57(KIP2), a structurally distinct member of the p21(CIP1) Cdk inhibitor family, is a candidate tumor suppressor gene. *Genes Dev* 9: 650-662.
- Matsuoka S, Thompson JS, Edwards MC, Bartletta JM, Grundy P, Kalikin LM, Harper JW, Elledge SJ, Feinberg AP (1996)
Imprinting of the gene encoding a human cyclin-dependent kinase inhibitor, p57KIP2, on chromosome 11p15. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3026-3030.
- Midro AT, Debek K, Sawicka A, Marcinkiewicz D, Rogowska M (1993)
Second observation of Silver-Russel syndrome in a carrier of a reciprocal translocation with one breakpoint at site 17q25. *Clin Genet* 44: 53-55.
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF (1988)
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16: 1215.
- Monk D, Wakeling EL, Proud V, Hitchins M, Abu-Amero SN, Stanier P, Preece MA, Moore GE (2000)
Duplication of 7p11.2-p13, including GRB10, in Silver-Russell syndrome. *Am J Hum Genet* 66: 36-46.
- Nicholls RD, Saitoh S, Horsthemke B (1998)
Imprinting in Prader-Willi and Angelman syndromes. *Trends Genet* 14: 194-200.
- Nissley P, Lopaczynski W (1991)
Insulin-like growth factor receptors. *Growth Factors* 5: 29-43.
- O'Keefe D, Dao D, Zhao L, Sanderson R, Warburton D, Weiss L, Anyane-Yeboah K, Tycko B (1997)
Coding mutations in p57KIP2 are present in some cases of Beckwith-Wiedemann syndrome but are rare or absent in Wilms tumors. *Am J Hum Genet* 61: 295-303.
- Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989)
Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86: 2766-2770.

Preece MA, Abu-Amero SN, Ali Z, Abu-Amero KK, Wakeling EL, Stanier P, Moore GE (1999)

An analysis of the distribution of hetero- and isodisomic regions of chromosome 7 in five mUPD7 Silver-Russell syndrome probands. *J Med Genet* 36: 457-460.

Price SM, Stanhope R, Preece MA, Trembath RC (1999)

The Spectrum of Silver-Russell syndrome: a clinical and molecular genetic study and new diagnostic criteria. *J Med Genet* 36: 837-842.

Ramirez-Duenas ML, Medina C, Ocampo-Campos R, Rivera H (1992)

Severe Silver-Russell syndrome and translocation (17;20) (q25;q13). *Clin Genet* 41: 51-53.

Reik W, Brown KW, Schneid H, Le Bouc Y, Bickmore W, Maher ER (1995)

Imprinting mutations in the Beckwith-Wiedemann syndrome suggested by altered imprinting pattern in the IGF2-H19 domain. *Hum Mol Genet* 4: 2379-2385.

Reik W and Maher ER (1997)

Imprinting in clusters: lessons from Beckwith-Wiedemann syndrome. *Trends Genet* 13: 330-334.

Russell A (1954)

A syndrome of "Intra-uterine" dwarfism recognizable at birth with cranio-facial dysostosis, disproportionately short arms, and other anomalies (5 examples). *Proceedings of the Royal Society of Medicine* 47: 1040-1044.

Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977)

DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 74: 5463-7.

Shaffer LG, McCaskill C, Adkins K, Hassold TJ (1998)

Systematic search for uniparental disomy in early fetal losses: the results and a review of the literature. *Am J Med Genet* 79: 366-372.

Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993)

The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions. *Genomics* 16: 325-332.

Silver H, K., Kiyasu W, George J, Deamer W, C. (1953)

Syndrome of congenital hemihypertrophy, shortness of stature, and elevated urinary gonadotropins. *Pediatrics* 12: 368-375.

Slatter RE, Elliott M, Welham K, Carrera M, Schofield PN, Barton DE, Maher ER (1994)

Mosaic uniparental disomy in Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 31: 749-753.

Slavotinek A, Gaunt L, Donnai D (1997)

Paternally inherited duplications of 11p15.5 and Beckwith-Wiedemann syndrome. *J Med Genet* 34: 819-826.

Smilnich NJ, Day CD, Fitzpatrick GV, Caldwell GM, Lossie AC, Cooper PR, Smallwood AC, Joyce JA, Schofield PN, Reik W, Nicholls RD, Weksberg R, Driscoll DJ, Maher ER, Shows TB, Higgins MJ (1999)

A maternally methylated CpG island in KvLQT1 is associated with an antisense paternal transcript and loss of imprinting in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Proc Natl Acad Sci USA* 96: 8064-8069.

Spence JE, Perciaccante RG, Greig GM, Willard HF, Ledbetter DH, Hejtmancik JF, Pollack MS, O'Brien WE, Beaudet AL (1988)

Uniparental disomy as a mechanism for human genetic disease. *Am J Hum Genet* 42: 217-226.

Tamura T, Tohma T, Ohta T, Soejima H, Harada N, Abe K, Niikawa N (1993)

Ring chromosome 15 involving deletion of the insulin-like growth factor 1 receptor gene in a patient with features of Silver-Russell syndrome. *Clin Dysmorphol* 2: 106-113.

Tate PH and Bird AP (1993)

Effects of DNA methylation on DNA-binding proteins and gene expression. *Curr Opin Genet Dev* 3: 226-231.

Teebi AS (1992)

Autosomal recessive Silver-Russell syndrome. *Clin Dysmorphol* 1: 151-156.

Weber JL (1990)

Informativeness of human (dC-dA)_n·(dG-dT)_n polymorphisms. *Genomics* 7: 524-530.

Weber JL and Wong C (1993)

Mutation of human short tandem repeats. *Hum Mol Genet* 2:1123-1128.

Weksberg R, Glaves M, Teshima I, Waziri M, Patil S, Williams BR (1990)

Molecular characterization of Beckwith-Wiedemann syndrome (BWS) patients with partial duplication of chromosome 11p excludes the gene MYOD1 from the BWS region. *Genomics* 8: 693-698.

Wilson GN, Sauder SE, Bush M, Beitins IZ (1985)

Phenotypic delineation of ring chromosome 15 and Russell-Silver syndromes. *J Med Genet* 22: 233-236.

Wollmann HA, Kirchner T, Enders H, Preece MA, Ranke MB (1995)

Growth and symptoms in Silver-Russell syndrome: review on the basis of 386 patients. *Eur J Pediatr* 154: 958-968.

Wollmann HA (1998)

Intrauterine growth restriction: definition and etiology. *Horm Res* 49: 1-6.

Wollmann HA, Klingebiel KH (2002)

Intrauterine Wachstumsretardierung und Silver-Russell-Syndrom. *Palatium Verlag*

Zhang P, Liegeois NJ, Wong C, Finegold M, Hou H, Thompson JC, Silverman A, Harper JW, DePinho RA, Elledge SJ (1997)

Altered cell differentiation and proliferation in mice lacking p57KIP2 indicates a role in Beckwith-Wiedemann syndrome. *Nature* 387: 151-158.

8.2 Eigene Publikationen

ORIGINALARBEITEN:

Eggermann T, Meyer E, Obermann C, Wollmann HA (2003)

Genetic disturbances in Silver-Russell syndrome and significance for molecular genetic testing. *Am J Hum Genet* 73(5): 738

Eggermann T, Meyer E, Obermann C, Heil I, Schüler H, Ranke MB, Eggermann K, Wollmann HA (2005)

Is maternal duplication of 11p15 associated with Silver-Russell syndrome? *J Med Genet* 42(5): e26

Eggermann T, Schönherr N, Meyer E, Obermann C, Mavany M, Eggermann K, Rank MB, Wollmann HA (2005)

Epigenetic mutations in 11p15 in Silver-Russell syndrome are restricted to the telomeric imprinting domain. *J Med Genet* 2005 Oct 19; [Epub ahead of print]

Obermann C, Meyer E, Prager S, Tomiuk J, Wollmann HA, Eggermann T (2004)

Searching for genomic variants in IGF2 and CDKN1C in SRS patients. *Mol Genet Metab* 82: 246-250

KONGRESSBEITRÄGE:

Eggermann K, Meyer E, Schoenherr N, Obermann C, Wollmann HA, Eggermann T (2005)

Maternal duplications in 11p15 are associated with intrauterine and postnatal growth retardation. *Chromosome Res* 13:15.3-P (Poster)

Eggermann T, Obermann C, Meyer E, Prager S, Tomiuk J Wollmann HA (2004)

Do genomic variants in IGF2 and CDKN1C contribute to the etiology of Silver-Russell syndrome? *Eur J Hum Genet* 12S: P0576 (Poster)

Meyer E, Obermann C, Korsch E, Wollmann HA, Eggermann T (2004)

New cases of autosomal recessive Silver-Russell syndrome. *Eur J Hum Genet* 12S: P0018 (Poster)

Obermann C, Meyer E, Wollmann HA, Eggermann T (2003)

Searching for maternal UPD(11) in Silver-Russell syndrome patients. *Medgen* 15: P232 (Poster)

9 Abkürzungsverzeichnis

AS	Angelman-Syndrom
BMI	Body-mass-index
BWS	Beckwith-Wiedemann-Syndrom
CF	Cystische Fibrose
CDKN1C	Cyclin dependant kinase inhibitor 1 C
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
IGF 2	Insulin like growth factor
IGFBP	Insulin like growth factor binding protein
IUGR	Intrauterine growth retardation
mUPD	Maternale uniparentale Disomie
pUPD	Paternale uniparentale Disomie
PWS	Prader-Willi-Syndrom
SRS	Silver-Russell-Syndrom
UPD	Uniparentale Disomie

10 Danksagung

Herrn Prof. Dr. med. Klaus Zerres danke ich für die Bereitstellung des Themas sowie die Ermöglichung der Durchführung der Arbeit am Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum der RWTH Aachen.

Herrn Prof. Dr. med. Joseph Neulen, Klinik für gynäkologische Endokrinologie und Reproduktionsmedizin der Frauenklinik des Universitätsklinikums der RWTH Aachen, danke ich für die Übernahme der Zweitkorrektur.

Bei Herrn Dr. rer. nat. Thomas Eggermann möchte ich besonders für seine unkomplizierte und ruhige Art, seine vielen Ratschläge sowie seine geduldige Korrektur der Arbeit bedanken.

Bei Herrn PD Dr. Dr. H. A. Wollmann der Universitätskinderklinik Tübingen möchte ich mich für die Bereitstellung des Patientenkollektives bedanken.

Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Tomiuk, Institut für Anthropologie und Humangenetik der Universität Tübingen, danke ich für die durchgeführten statistischen Analysen.

Mein Dank gilt den SRS-Patienten und ihren Familien für die Teilnahme an der Studie.

Christa, Claudia, Esther, Jan und Susi sowie allen anderen Mitarbeitern der Humangenetik Aachen danke ich für die vielen Ratschläge und Aufmunterungen sowie den lockeren und lustigen Laboralltag.

Besonders bedanken möchte ich mich bei Fabian Küpper, der es in verzweifelten Momenten immer schaffte durch Twix-Riegel und „Zaubergrottengänge“ meine Laune zu heben.

Weiterhin möchte ich mich bei meinen Eltern bedanken, die mich stets gefördert haben und mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben.

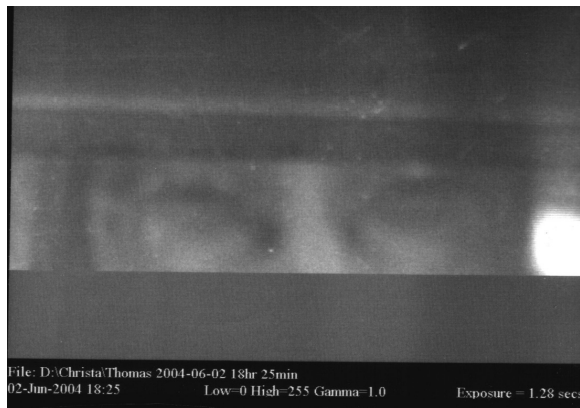
Mein Dank gilt allen meinen Freunden, die es in dem letzten Jahr immer geschafft haben mich in kürzester Zeit wieder aufzubauen und vom Laboralltag abzulenken.

Schließlich möchte ich mich besonders bei Michael Evangelou bedanken, der vor allem während der Verfassung dieser Arbeit meine schlechten Launen ertragen musste und mir trotzdem mit seiner immer guten Laune zur Seite stand.

11 Erklärung

Hiermit erkläre ich, Caitriona Obermann, eidesstattlich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und alle in Anspruch genommenen Hilfen in der Dissertation angegeben habe.

Aachen, den 16.10.2006



12 Lebenslauf

Name: Caitriona Obermann
Geburtsdatum: 22.06.1978
Geburtsort: Craigavon/N. Irland
Staatsangehörigkeit: deutsch
Familienstand: ledig

Schulbildung:

1984-1986 Grundschule Lahntal Sterzhausen
1986-1988 Grundschule Wetter/Hessen/Nassau
1988-1992 Gymnasium Philippinum Marburg
1992-1993 Deutsche Schule Singapur
1993-1997 Hilda-Gymnasium Pforzheim

Studium:

1997-1998 Architektur-Studium an der RWTH Aachen
1998-2005 Medizin Studium an der RWTH Aachen
05.09.2000 Ärztliche Vorprüfung
28.08.2001 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
2003-2004 Promotion an dem Institut für Humangenetik der RWTH Aachen unter
der Leitung von Prof. Dr. med K. Zerres
15.03.2005 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Bisherige Berufstätigkeit:

02.2003-07.2004 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Arbeitsmedizin der RWTH
Aachen
10.2003-10.2006 Wissenschaftliche Hilfskraft am Institut für Humangenetik der RWTH
Aachen

