

Diplomarbeit

**CHROMOSOMENABERRATIONEN  
BEI  
ENTWICKLUNGSRETARDIERUNGEN**

eingereicht von

**Stephanie Theresa Hirschbichler**

Mat.Nr.: 0312247

zur Erlangung des akademischen Grades

**Doktorin der gesamten Heilkunde**

**(Dr. med. univ.)**

an der

**Medizinischen Universität Graz**

ausgeführt am

**Institut für Humangenetik**

unter der Anleitung von

**PD MAG. DR. SCIENT. MED. THOMAS SCHWARZBRAUN  
SOWIE**

**AO. UNIV. - PROF. MAG. DR. RER. NAT. DR. SCIENT. MED. ERWIN PETEK**

Ort, Datum .....

(Unterschrift)

*Eidesstattliche Erklärung*

*Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne fremde Hilfe verfasst habe, andere als die angegebenen Quellen nicht verwendet habe und die den benutzten Quellen wörtlich oder inhaltlich entnommenen Stellen als solche kenntlich gemacht habe.*

*Graz, am 23. November 2010*

*Unterschrift*

## **Vorwort**

Die vorliegende Diplomarbeit ist im Rahmen meines letzten Studienjahres am Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz entstanden. Die Themenwahl „Chromosomenaberrationen bei Entwicklungsretardierungen“ entstand im Dialog mit meinem Diplomarbeitsbetreuer PD Mag. Dr. scient. med. Thomas Schwarzbraun. Sie beinhaltet sowohl die aktive Arbeit in den Laboren des Institutes für Humangenetik als auch eine intensive Literaturrecherche und setzt sich zum Ziel, die theoretischen Grundlagen einem Praxistest zu unterziehen.

Ich möchte mich an dieser Stelle herzlich bei PD Mag. Dr. scient. med. Thomas Schwarzbraun bedanken ohne den diese Arbeit nicht möglich gewesen wäre. Außerdem möchte ich mich bei den Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz bedanken, allen voran bei Herrn Peter Ulz, der mir während der gesamten Zeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Abschließend möchte ich allen danken, die mich während meines Werdegangs an der Medizinischen Universität Graz begleitet, unterstützt und geprägt haben, allen voran meinen Eltern.

Stephanie Hirschbichler  
Graz, 23. November 2010

# Widmung

Für meine Schwester Elisabeth

# Inhaltsverzeichnis

<b>Vorwort</b> .....	<b>ii</b>
<b>Widmung</b> .....	<b>iii</b>
<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>iv</b>
<b>Abkürzungen</b> .....	<b>vi</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>vii</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>vii</b>
<b>Zusammenfassung</b> .....	<b>viii</b>
<b>Abstract</b> .....	<b>ix</b>
<b>1 Einleitung</b> .....	<b>1</b>
<b>1.1 Ausgangssituation</b> .....	<b>1</b>
<b>1.2 Zielsetzung</b> .....	<b>2</b>
<b>2 Material und Methoden</b> .....	<b>3</b>
<b>2.1 GAG Karyogramme</b> .....	<b>3</b>
2.1.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe.....	3
2.1.2 Anwendungsgebiete.....	3
2.1.3 Ablauf/ Durchführung.....	3
2.1.4 Auswertung.....	4
<b>2.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung mittels FISH-Methode</b> .....	<b>4</b>
2.2.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe.....	5
2.2.2 Anwendungsgebiete.....	5
2.2.3 Ablauf/ Durchführung.....	5
2.2.4 Auswertung.....	5
<b>2.3 Polymerase Kettenreaktion</b> .....	<b>6</b>
2.3.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe.....	6
2.3.2 Anwendungsgebiete.....	8
2.3.3 Ablauf/ Durchführung.....	8
2.3.4 Auswertung.....	9
<b>2.4 Agarosegelelektrophorese</b> .....	<b>9</b>
2.4.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe.....	9
2.4.2 Anwendungsgebiete.....	9
2.4.3 Ablauf/ Durchführung.....	10
2.4.4 Auswertung.....	10
<b>2.5 Array-CGH (Comparative Genomic Hybridization)</b> .....	<b>11</b>
2.5.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe.....	11
2.5.2 Anwendungsgebiete.....	11
2.5.3 Ablauf/ Durchführung.....	11
2.5.4 Auswertung.....	12
<b>2.6 Real Time PCR</b> .....	<b>13</b>
2.6.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe.....	13
2.6.2 Anwendungsgebiete.....	15
2.6.3 Ablauf/ Durchführung.....	15
2.6.4 Auswertung.....	16
2.6.5 Real Time PCR und herkömmliche PCR im Vergleich.....	18

<b>3</b>	<b>Empirisches Beispiel - Patient 12002</b>	<b>19</b>
3.1	Patient 12002	19
3.2	Das Krankheitsbild	20
3.3	Der vorausgegangene gendiagnostische Verlauf	20
<b>4</b>	<b>Real Time PCR bei Patient 12002</b>	<b>22</b>
4.1	Durchgänge 1-3	23
4.1.1	Durchgang 1	23
4.1.2	Durchgang 2	24
4.1.3	Durchgang 3	24
4.2	Durchgang 4	25
4.3	Durchgang 5	27
4.4	Durchgang 6	28
4.5	Durchgang 7	30
4.6	Durchgang 8	31
<b>5</b>	<b>Ergebnisse - Duplizierte Gene</b>	<b>33</b>
5.1	ABCA11P	37
5.2	ZNF721	38
5.3	PIGG- Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class G	38
5.4	Phosphodiesterase 6b, cGMP spezifisch, ROD, beta; PDE6b	38
5.5	ATP-Synthase, H <sup>+</sup> -transportierender, mitochondrialer F <sub>0</sub> Komplex, ATP 5I	39
5.6	Myosin, Leichtketten 5 abhängig; MYL5	39
5.7	PCGF3	39
5.8	LOC100129917	40
5.9	Complexin 1; CPLX1	40
5.10	Cyclin G assoziierte Kinase; GAK	41
5.11	MFSD7	42
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>43</b>
<b>7</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>48</b>
<b>8</b>	<b>Anhang</b>	<b>50</b>

## Abkürzungen

BAC-CGH	Bacterial Artificial Chromosome-CGH
BNS Syndrom	Blitz Nick Salaam Syndrom
Ca <sup>2+</sup>	Calcium
CGH	Comparative Genomic Hybridisation
Chr.	Chromosom
Cp-Wert	Crossing Point Wert
Ct-Wert	Cycle Treshold Wert
EEG	Elektroenzephalogramm
FET	Fluoreszenz Energie Transfer
FISH	Fluoreszenz in situ Hybridisierung
kb	Kilobasen
mA	Milliampere
Mb	Megabasen
Mg <sup>2+</sup>	Magnesium
mV	Millivolt
ng	Nanogramm
OMIM <sup>®</sup>	Online Medelian Inheritance in Man
PCR	Polymerase chain reaction, Polymerase Kettenreaktion
RefSeq	Reference Sequence
UCSC <sup>®</sup>	University of California, Santa Cruz Genome Bioinformatics Group
μl	Mikroliter
μM	Mikromolar

## Abbildungsverzeichnis

ABBILDUNG 1 AUSWERTUNGSKURVE DES FLUORESCENZSIGNALS .....	16
ABBILDUNG 2 AMPLIFICATION PLOT VOM 17.11.2009.....	23
ABBILDUNG 3 AMPLIFICATION PLOT VOM 03.12.2010.....	24
ABBILDUNG 4 AMPLIFICATION PLOT VOM 07.12.2009.....	25
ABBILDUNG 5 AMPLIFICATION PLOT VOM 12.01.2010.....	26
ABBILDUNG 6 AMPLIFICATION PLOT VOM 01.02.2010.....	28
ABBILDUNG 7 AMPLIFICATION PLOT VOM 04.02.2010.....	29
ABBILDUNG 8 AMPLIFICATION PLOT VOM 11.02.2010.....	31
ABBILDUNG 9 AMPLIFICATION PLOT VOM 28.04.2010.....	32
ABBILDUNG 10 CHR4:880.473-946.473 .....	34
ABBILDUNG 11 CHR4:891.905-905.528.....	34
ABBILDUNG 12 CHR4:404.726-424.726.....	36
ABBILDUNG 13 CHR4:404.726-891.905.....	36

## Tabellenverzeichnis

TABELLE 1 CT-WERT ALS QUANTIFIZIERUNGSMABSTAB.....	17
TABELLE 2 PRIMERSEQUENZEN UND ERGEBNISSE VOM 17.11.2009.....	23
TABELLE 3 PRIMERSEQUENZEN UND ERGEBNISSE VOM 03.12.2009.....	24
TABELLE 4 PRIMERSEQUENZEN UND ERGEBNISSE VOM 07.12.2009.....	24
TABELLE 5 PRIMERSEQUENZEN UND ERGEBNISSE VOM 12.01.2010.....	25
TABELLE 6 ZUSAMMENSETZUNG DES ANSATZES VOM 12.01.2010.....	26
TABELLE 7 PRIMERSEQUENZEN UND ERGEBNISSE VOM 01.02.2010.....	27
TABELLE 8 ZUSAMMENSETZUNG DES ANSATZES VOM 01.02.2010.....	27
TABELLE 9 PRIMERSEQUENZEN UND ERGEBNISSE VOM 04.02.2010.....	28
TABELLE 10 ZUSAMMENSETZUNG DES ANSATZES VOM 04.02.1010.....	29
TABELLE 11 PRIMERSEQUENZEN UND ERGEBNISSE VOM 11.02.2010.....	30
TABELLE 12 ZUSAMMENSETZUNG DES ANSATZES VOM 11.02.2010.....	30
TABELLE 13 PRIMERSEQUENZEN UND ERGEBNIS VOM 28.04.2010.....	31
TABELLE 14 ZUSAMMENSETZUNG DES ANSATZES VOM 28.04.2010.....	32

# Zusammenfassung

## Einleitung

Etwa 3% aller Neugeborenen sind von genetischen Erkrankungen betroffen, 1/3 der Patienten in Kinderkrankenhäusern leiden an den Auswirkungen derselben. Das macht die modernen Untersuchungsmethoden der Humangenetik zu einem der bedeutendsten Instrumente für prä- und postnatale Diagnostik.<sup>1</sup> Häufig sind submikroskopische, genetische Mikrodeletionen und Mikroduplikationen für syndromale, subsyndromale oder nicht-syndromale Erkrankungen ursächlich zur Verantwortung zu ziehen. Diese genetischen Veränderungen stehen oft im Zusammenhang mit Fehlbildungen oder mentaler Retardierung, können aber auch gänzlich ohne phänotypische Auswirkungen bleiben. Daher ist der Versuch der Herstellung einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation insbesondere bei neu aufgetretenen Veränderungen von großer Bedeutung.

## Zielsetzung

Durch hochmoderne genetische Analyseverfahren soll eine detaillierte Eingrenzung der zuvor durch Array-CGH detektierten Duplikationsregion eines ausgewählten Patienten mit therapieresistenter Epilepsie sowie ausgeprägter psychomotorischer Retardierung auf einzelne duplizierte Gene erfolgen, um eine Korrelation mit dem Phänotyp zu ermöglichen.

## Methodik und Vorgehensweise

Eine Duplikation von etwa 455 kb Größe im Subtelomerbereich des kurzen Armes von Chromosom 4 (Chromosomenbande 4p16.3) wird mittels hochauflösender Real Time PCR Analysen weiter eingegrenzt. Anschließend werden unter Zuhilfenahme von Online Datenbanken eine kleinere Kandidatenregion bzw. einzelne Kandidatengene ausfindig gemacht und beschrieben sowie deren mögliche Auswirkungen auf das Krankheitsbild des Patienten erläutert.

## Ergebnisse

Die zuvor durch Array-CGH abgesteckte Region umfasst mindestens 10 Gene. Weitere liegen in den an die Minimalregion der Array-CGH angrenzenden Unsicherheitsregionen. Durch die genauere Untersuchung dieser Unsicherheitsregionen konnten sämtliche duplizierten Gene ausfindig gemacht werden und daraus ein Kandidatengen bestimmt werden, das am ehesten mit dem Phänotypen des Patienten korreliert. Die genauen Ausmaße der Beteiligung der Gene in der am 5'-Ende gelegenen Unsicherheitsregion waren aufgrund der unklaren Ergebnisse im Rahmen der Real Time PCR Analyse nicht möglich.

---

<sup>1</sup> vgl. Buselmaier W., Biologie für Mediziner, 11. Auflage 2009, S. 221

# **Abstract**

## **Introduction**

Approximately 3% of all newborn babies have genetic diseases. About one third of patients in children's hospitals suffer from the impact of such diseases.<sup>2</sup> As a result, modern methods of human genetics are amongst the most important instruments for pre- and postnatal diagnostics. Often submicroscopic, genetic microdeletions and microduplications are responsible for syndromal, subsyndromal and non-syndromal diseases. These genetic variations are frequently connected to malformations or mental retardations, but can also remain without any phenotypic implications. As a result, it is important to attempt a phenotype-genotype-correlation, especially for new variations.

## **Aim**

Aim of this thesis is to identify individual modified genes within a duplication region – previously detected through Array CGH – of a selected patient suffering from therapyresistent epilepsy as well as severe psychomotoric retardation and moderate dysmorphies by applying modern genetic analysis to allow a correlation with the phenotype.

## **Methods and process**

A duplication of the subtelomeric region of the short arm of chromosome 4 (chromosome band 4p16.3) of about 445 kb in size is to be further narrowed down using high resolution analysis via Real Time PCR. Subsequently, a smaller candidate region or individual candidate gene is to be identified and described with reference to online databases taking also into account potential impacts on the clinical picture of the patient.

## **Results**

The region identified through Array-CGH consists of at least 10 genes. Further genes lie within the region of uncertainty, bordering on the minimal region based on the Array-CGH results. By analysing this region of uncertainty all duplicated genes could be found and a candidate gene was identified that correlated most closely with the patient's phenotype. The exact relevance of the genes lying at the region of uncertainty at the 5'-end, however, was not possible due to unclear results from the Real Time PCR analysis.

---

<sup>2</sup> vgl. Buselmaier W., Biologie für Mediziner, 11. Auflage 2009, S. 221

# 1 Einleitung

## 1.1 Ausgangssituation

Chromosomenaberrationen sind sehr häufig Ursache von Entwicklungsretardierungen im Kindesalter. Etwa 3% aller Neugeborenen weltweit sind davon betroffen.<sup>3</sup> Das macht die Diagnostik von genetischen Mutationen sowohl prä- als auch postnatal zu einem bedeutenden Untersuchungsfeld.

Die vorliegende Arbeit setzt sich mit dieser Themenstellung anhand eines empirischen Beispiels auseinander. Die Eltern eines sechsjährigen Knabens mit seit der Geburt bestehender, therapieresistenter Epilepsie sowie ausgeprägter psychomotorischer Retardierung bei moderaten Dysmorphien wandten sich bei erneutem Kinderwunsch an das Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz.

Im Rahmen der humangenetischen Routinediagnostik wurde im 44k-Oligonukleotid-Array eine Duplikation von etwa 455 kb Größe im Subtelomerbereich des kurzen Arms von Chromosom 4 beschrieben. Diese Veränderung ließ jedoch aufgrund der kleinen Größe und der geringen Auflösung des verwendeten Arrays noch keinen detaillierten Rückschluss auf alle an der Duplikation beteiligte Gene zu. Aufgrund der Array-CGH Daten konnte die Duplikation auf eine Minimalregion sicher eingegrenzt werden (**chr4:424.726-880.473**). Die die Minimalregion umgebenden Unsicherheitsregionen (5': **chr4:404.726-424.726** sowie 3': **chr4:880.473-946.473**) müssen jedoch weiter analysiert werden, um die genauen Ausmaße der Duplikation zu bestimmen.

---

<sup>3</sup> vgl. Buselmaier W., Biologie für Mediziner, 11. Auflage 2009, S. 221

## **1.2 Zielsetzung**

Ziel der Arbeit ist es anhand der bekannten Array-CGH Daten mit Hilfe von Real Time PCR Analysen eine exakte Definition der zu Grunde liegenden genetischen Ursachen zu schaffen. Dadurch soll eine Eingrenzung aller von der Duplikation betroffenen Gene ermöglicht werden, insbesondere auch um festzustellen ob die Gene in den Unsicherheitsregionen zur Gänze oder nur zum Teil dupliziert sind.

Weiters soll eine Einschätzung der den Symptomen des Knabens zu Grunde liegenden Mechanismen erfolgen sowie die Zusammenhänge zwischen der Duplikation der Gene und der Symptome des Patienten diskutiert werden.

## **2 Material und Methoden**

Im Rahmen der genetischen Routinediagnostik kommen eine Reihe von analytischen Verfahren zur Anwendung. Diese Methoden und deren Durchführung werden im Folgenden näher erläutert.

### **2.1 GAG Karyogramme**

#### **2.1.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe**

Für das Anfertigen eines Karyogrammes werden teilungsfähige Zellen benötigt, zum Beispiel, Lymphozyten, Knochenmarkszellen, Fibroblasten oder Fruchtwasserzellen. Zur Mitosestimulation kann bei nicht proliferierenden Zellen ein Pflanzennectin (Phytohämagglutinin) hinzugefügt werden. Zur Arretierung der Zellen in der Metaphase benötigt man weiters den Zusatz von Colchicin (Spindelgift), zur Fixation außerdem ein Eisessig-Methanol-Gemisch.<sup>4</sup>

#### **2.1.2 Anwendungsgebiete**

Das Karyogramm ist schon seit Mitte des 20. Jahrhunderts eine beliebte Möglichkeit zur Darstellung der Chromosomen eines Individuums. Dazu werden die zuvor behandelten Zellen aufgebrochen, um die Chromosomen freizusetzen, die dann unter einem Mikroskop fotografiert werden sowie zur Auswertung nach morphologischen Gesichtspunkten, wie Größe, Zentromerlage oder Bandenmuster geordnet werden.<sup>5</sup>

#### **2.1.3 Ablauf/ Durchführung**

Die proliferationsfähigen Zellen, meist EDTA Blut, werden in ein Kulturmedium pipetiert, wo sie durch die Zugabe von Phytohämagglutinin bei 37°C zur Mitose angeregt werden. Um später eine optimale Bandenauflösung zu erhalten, wird versucht, sie in der Metaphase der Mitose oder noch besser in der Prometaphase zu arretieren.

---

<sup>4</sup> vgl. Knippers R., Molekulare Genetik, 9. Auflage 2006, S. 173 ff

<sup>5</sup> siehe oben

Dies gelingt nach 70-stündiger Kulturdauer durch die Zugabe von Colchicin, dem Spindelgift der Herbstzeitlosen, das den Zellzyklus arretiert und eine Tubulinorganisation weitgehend verhindert. Nun wird die Kultur zentrifugiert, um die Erythrozyten von den Lymphozyten zu trennen. Durch das Hinzufügen von hypotoner Kochsalzlösung schwellen die Zellen an, rote Blutkörperchen allerdings platzen und werden abgesaugt. Die Lymphozyten werden anschließend mit einer Fixierungslösung aus Eisessig und Methanol auf einen Objektträger aufgebracht. Unter 1000-facher Vergrößerung werden die Chromosomen nach Auswahl einer geeigneten Färbemethode unter dem Mikroskop fotografiert und anschließend ausgeschnitten und sortiert.<sup>6</sup> Dieser Prozess findet in modernen Laboren meist digital gestützt statt.

#### **2.1.4 Auswertung**

Die Chromosomen, die in der Metaphase vorliegen, können nun zum Vergleich ihrem homologen Partner zugeordnet werden. Dies ermöglicht die Detektion numerischer sowie grob struktureller Chromosomenveränderungen. Eine deutlich sensitivere Methode der molekularen Genetik stellt die FISH Methode (siehe 2.2) dar.

## **2.2 Fluoreszenz in situ Hybridisierung mittels FISH-Methode**

Mit der Fluoreszenz in situ Hybridisierung ist es möglich die Anzahl, die Lage und die Aktivität ausgewählter Gene zu bestimmen. Hierfür werden mit Fluorchrom markierte Sonden in die Meta- oder Interphase eingebracht und hybridisieren dort mit homologen chromosomalen Sequenzen. Die FISH kann Veränderungen bis zu einer Auflösung von 100kb detektieren, während selbst hochauflösende Karyogramme schon bei einer Auflösung bis zu 5Mb (5000kb) an ihre Grenzen stoßen. Mittlerweile wurden weitere Methoden basierend auf FISH entwickelt, so zum Beispiel, die 24 Farben-Karyotypisierung, Multiplex-FISH oder Spectral-Karyotypisierung (SKY).<sup>7</sup>

---

<sup>6</sup> vgl. Hirsch-Kauffmann M., Schweiger M., Michal-Ruth S., Biologie und molekulare Medizin, 7. Auflage 2009, S. 174

<sup>7</sup> vgl. Nieschlag et al., Andrologie, Grundlagen und Kliniken der reproduktiven Gesundheit des Mannes, 3. Auflage 2009; S. 127

### **2.2.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe**

Die Untersuchung kann, zum Beispiel, an heparinisiertem Blut oder Knochenmarkaspirat vorgenommen werden. Von großer Bedeutung ist die exakte Kenntnis der zu untersuchenden Region. Durch Zuhilfenahme der Daten des Humanen Genomprojektes können mittlerweile beliebige Sonden für alle Regionen entworfen werden. Weiters sind der einzubringende Farbstoff (FITC=grün, TRITC=rot, Aminomethylkumarin=blau) sowie ein Fluoreszenzmikroskop Voraussetzung für eine FISH.

### **2.2.2 Anwendungsgebiete**

Die FISH wird vor allem zur Analyse numerischer oder struktureller Chromosomenaberrationen benötigt. Je nach Auswahl der Sonden, können mittels FISH verschiedene Fragestellungen beantwortet werden. So können beginnend beim Nachweis eines ganzen Chromosomenarms auch einzelne Chromosomenbanden oder einzelne Gene dargestellt werden.

### **2.2.3 Ablauf/ Durchführung**

Die mit Fluorchromen gekennzeichneten Gensonden werden in die Zellkerne der auf Glasplättchen fixierten Zellen eingebracht. Dort hybridisieren die speziell für die zu untersuchende Region des Chromosoms entworfenen Sonden nach Denaturierung an ihre komplementäre DNA Sequenzen und markieren sie so.

### **2.2.4 Auswertung**

Je nach Menge der im Fluoreszenzmikroskop nachgewiesenen Fluoreszenzsignale kann nun auf die Menge der vorhandenen DNA geschlossen werden. Durch die Verwendung unterschiedlich markierter Sonden können mehrere Regionen gleichzeitig untersucht werden (Multiplex-Fish).

Die FISH kann Veränderungen bis zu einer Auflösung von etwa 100kb detektieren. Im Fall des Patienten 12002 wurde mit Hilfe der wcp-Sonden (whole chromosome painting) 18 und 5 im Multiplex-FISH die väterliche reziproke Translokation zwischen den Chromosomen 8 und 15 auch beim Sohn bestätigt, eine Mitbeteiligung anderer Chromosomen an dieser Translokation jedoch ausgeschlossen.

## 2.3 Polymerase Kettenreaktion

Bei der Polymerase Kettenreaktion (PCR) handelt es sich um eine relativ „junge“ und in ihrem Ablauf simple Methode der Vervielfältigung bestimmter DNA Sequenzen. Für die Entwicklung dieser Methode erhielt Entdecker Kary Mullis 1993 den Nobelpreis für Chemie.<sup>8</sup> Seither ist es anhand dieser Methode möglich, durch synthetische Herstellung von Oligonukleotidprimer, eine durch ebendiese definierte DNA-Sequenz beliebig oft zu kopieren.<sup>9</sup> Ziel der PCR ist es also einen definierten Bereich eines heterogenen DNA-Pools (meist gesamtgenomische DNA) gezielt zu vermehren.

### 2.3.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe

Die Polymerase Kettenreaktion ist ein vergleichbar einfaches und günstiges Instrument zur Vervielfachung eines definierten DNA Bereiches. Ein großer Vorteil ist die Tatsache, dass als Ausgangsmaterial nur geringste Mengen an DNA benötigt werden.

Eine der Hauptvoraussetzungen und damit auch ein großer Nachteil dieser Methode ist, dass zur Durchführung einer PCR die exakten DNA Sequenzen der zu analysierenden Region bekannt sein müssen.

Wesentliche Bestandteile eines PCR-Reaktionsansatzes sind die **Matrize (RNA/cDNA)**, der **Puffer**, spezifische **Oligonukleotidprimer**, **Desoxynukleotidtriphosphate** (dATP, dCTP, cGTP und dTTP) als DNA Bausteine sowie die **Taq-Polymerase** (*Thermus aquaticus*: hitzestabiles Bakterium), die durch ihre Thermostabilität eine 30-40-fache Wiederholung der Zyklen ermöglicht.

Ebenso zu beachten ist die richtige Konzentration der Salze/ Ionen in der Reaktion, da nur mithilfe der richtigen Pufferung durch **Mg<sup>2+</sup>-Ionen** eine ausreichend hohe Spezifität erreicht werden kann. Diese beeinflusst nicht nur die Enzymaktivität der Polymerase, sondern hat unter anderem auch Einfluss auf das Primerannealing, die Produktspezifität und die Fehlerrate der Polymerase.

---

<sup>8</sup> vgl. Desmond N., Gentechnische Methoden, 2. Auflage 2002, S. 135f.

<sup>9</sup> vgl. Alberts B., Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 2. Auflage 2001, S. 355f.

Als Matrize kann entweder **genomische DNA** oder eine durch reverse Transkriptase aus RNA hergestellte **cDNA** (diese Verfahren nennt man dann Reverse Transkriptions-PCR) verwendet werden.<sup>10</sup>

Polymerasen haben ein Aktivitätsmaximum bei einem pH-Wert über 8. Ein kommerziell erhältlicher **Standardpuffer** beinhaltet 500 mM Kaliumchlorid sowie 100 mM Tris bei einem pH-Wert von 8,3.

Ist die zu untersuchende Sequenz definiert, werden einzelsträngige **Oligonukleotidprimer** designed, die den jeweils zu analysierenden Bereich eingrenzen. Diese sind optimalerweise 18-25 (20-30)<sup>11</sup> Nukleotide lang und komplementär zu den Zielsträngen der zu amplifizierenden Region. Aufgrund der stärkeren Bindung der GC-Basenpaare im Vergleich zu den AT-Basenpaare und der teils komplexen Strukturen von Regionen, die besonders GC- oder AT-reich sind, wird weiters ein maximaler GC-Gehalt von 40-60% angestrebt. Außerdem sollte auf eine geringe Schmelztemperaturdifferenz zwischen den Primern geachtet werden.<sup>12</sup>

Beim **Primerdesign** sind unter anderem folgende Regeln zu befolgen:

- Primer sollten eine durchschnittliche Länge von 18-30 Basen, bei der Amplifikation längerer Fragmente (>2,5kb) 25-35 Basen haben.
- Das AT/GC-Verhältnis sollte zwischen 40 – 60 % liegen.
- Primer sollten keine „ungewöhnlichen“ Basenabfolgen wie Poly-A oder lange G/C-Bereiche aufweisen, um Fehlhybridisierungen (Mispriming) und Leserasterverschiebungen (Frameshifts) zu vermeiden.
- Die Schmelztemperatur sollte zwischen 58°C und 64°C betragen, um ausreichend hohe Annealingtemperaturen zu erlauben.
- Die Primer sollten in ihrer Schmelztemperatur möglichst übereinstimmen.
- Um eine hohe Spezifität der Sequenz für das gesuchte Amplikon zu erreichen und Artefakte zu vermeiden, sollten Wiederholungen überprüft werden.  
(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

---

<sup>10</sup> vgl. Buselmaier W., Biologie für Mediziner, 10 Auflage 2007, S. 332f.

<sup>11</sup> vgl. Desmond N., Gentechnische Methoden, 2. Auflage 2002, S. 126

<sup>12</sup> vgl. Buselmaier W., Biologie für Mediziner, 10 Auflage 2007, S. 332f.

### 2.3.2 Anwendungsgebiete

Die Anwendungsgebiete der PCR sind vielseitig und reichen von Klonierung über Diagnostik bis zur Forensik. So ist sie wesentlicher Bestandteil moderner molekulargenetischer Untersuchungen.<sup>13</sup>

### 2.3.3 Ablauf/ Durchführung

Der hergestellte Ansatz wird in einen Thermocycler gestellt. Dieser besteht aus einem Metallblock, der nun vollautomatisch seine Temperatur regelt. Es werden üblicherweise zwischen 25-45 Zyklen durchgeführt.

Ein Zyklus der PCR besteht aus drei Schritten:

1. Die **Hitzedenaturierung** der DNA

Dabei wird bei einer Temperatur von 93-95°C in 2-5 Minuten die DNA in Einzelstränge aufgeschmolzen.

2. Die **Anlagerung (Annealing)** der Primer

Bei einer Temperatur von 56-68°C lagern sich die Oligonukleotidprimer an ihre Zielsequenzen an.

3. Die **Verlängerung (Extension, Elongation)** der angelagerten Primer durch DNA-Neusynthese

Bei ungefähr 74°C entfaltet die in der PCR verwendete Taq-DNA-Polymerase ihre optimale Aktivität. Sie synthetisiert, ausgehend von den 3'-Enden der Primer, den komplementären DNA-Strang und stellt somit die Doppelsträngigkeit des DNA Segments wieder her.

Nach Abschluss des ersten Zyklus wird der Ablauf ab Punkt 1 wiederholt. Nach 30 Zyklen erhält man so theoretisch  $5,4 \times 10^9$  Stränge. Die Zyklusdauer von nur wenigen Minuten macht die PCR zu einer effizienten Form der DNA-Vervielfältigung.

---

<sup>13</sup> vgl. Desmond N., Gentechnische Methoden, 2. Auflage 2002, S. 135

### **2.3.4 Auswertung**

Die Detektion und Auftrennung der Amplifikate nach Größe erfolgt anschließend über eine Gelelektrophorese mit Ethidiumbromidfärbung (Details siehe 2.4.2).

## **2.4 Agarosegelelektrophorese**

Die Elektrophorese ist ein Verfahren, welches sich die Wanderung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld zu Nutze macht. Das Agarosegel besteht aus Agarose, einem Polysaccharid, das aus Algen hergestellt wird. Mittels Erhitzen und Abkühlen kommt es zur Vernetzung der Moleküle, was wie eine Art Sieb wirkt und die im elektrischen Feld je nach ihrer Ladung wandernden Moleküle größenabhängig unterschiedlich stark abbremst. Die überwiegend negativ geladene DNA wandert also durch die Gelmatrix hindurch Richtung positiv geladenem Pol.

Der Vollständigkeit halber sei hier noch die Polyacrylamidgelelektrophorese erwähnt, die vor allem bei Proteinuntersuchungen verwendet wird, in meiner Arbeit aber nicht zum Einsatz kommt. Im Rahmen dieser können Proteine, die an DNA-Moleküle gebunden haben, aufgrund ihrer deutlich eingeschränkten Beweglichkeit detektiert und ihre Geschwindigkeit gemessen werden. Man nennt dieses Phänomen dann Gelshift oder Gelretention.<sup>14</sup>

### **2.4.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe**

Für die Gelelektrophorese wird unter anderem 1,2%-ige Agarose, TBE (90 mM Tris-Borat, pH 8,3; 5mM EDTA) oder TAE Puffer benötigt, Ethidiumbromid zum Anfärben der Proben sowie Bromphenolblau als Loadingpuffer.

### **2.4.2 Anwendungsgebiete**

Zur Auftrennung von DNA (zum Beispiel PCR-Produkte) kommt, wie in dieser Arbeit, die Agarosegelelektrophorese zur Verwendung. Sie erlaubt eine Trennung von DNA-Fragmenten mit einer Größe von 70bp bis 50kb.

---

<sup>14</sup> vlg. Brown, T., Moderne Genetik, 2. Auflage 1999. S 430

Die Polyacrylamidgele finden vor allem im Bereich von DNA-Sequenzierungen und der Proteinanalysen Verwendung, da dort eine höhere Trennschärfe benötigt wird.

### **2.4.3 Ablauf/ Durchführung**

Im Rahmen der Gelelektrophorese macht man sich die Tatsache zu Nutze, dass die DNA, da sie eine Säure ist, im Wasser ionisiert und aufgrund der Phosphatreste eine vorwiegend negative Ladung annimmt. Wird nun ein elektrisches Feld angelegt (Spannung von 50mV; Stromstärke von 30mA), wandern die negativ geladenen DNA-Fragmente durch die elektrisch neutrale Gelmatrix zum positiv geladenen Pol, der Anode. Das Agarosegel wird je nach Größe der zu trennenden Nukleinsäurefragmente in unterschiedlicher Konzentration hergestellt. Je höher die Agarosekonzentration des Gels desto kleiner die Größe der Poren. Um ein Gel mit einem Agarosegehalt von 1% herzustellen, wird 0,8 g Agarose zu 80 ml TAE-oder TBE-Puffer gegeben. Dieses Pulver-Wasser-Gemisch wird zuerst erhitzt, anschließend auf ca. 50 °C abgekühlt, mit ca. 130 µl Ethidiumbromid ergänzt und dann in eine Form gegossen, wobei Platzhalter für das Auftragen der Nukleinsäureproben eingesetzt werden.

Nach ca. 30 Minuten ist das Gel erstarrt, die Kämme werden vorsichtig entfernt und in die Pufferlösung (TBE, TAE) getaucht. Zur Erleichterung des Auftragens der Nukleinsäurefragmente in die dafür vorgesehenen Auftragstaschen wird Bromphenolblau als Loadingpuffer beigemischt. Ethidiumbromid bindet sich während des Laufes an die DNA und macht die Darstellung derselben unter UV-Licht möglich. Das Verfahren wird bei Raumtemperatur durchgeführt und dauert etwa 1 Stunde.<sup>15</sup>

### **2.4.4 Auswertung**

Die mit Ethidiumbromid "gefärbten" DNA Fragmente leuchten nun unter UV Licht auf und können fotografiert werden. Die jeweiligen Proben laufen je nach Größe durch das Gel. Um eine Größenbestimmung vorzunehmen, benötigt man sogenannte Molekülmassenstandards, die eine vergleichende Größeneinschätzung der unbekanntem Fragmente möglich machen. Diese werden neben den restlichen Proben auf das Gel aufgetragen.

---

<sup>15</sup> vgl. Knippers R., Molekulare Genetik, 9. Auflage 2006, S. 23

## **2.5 Array-CGH (Comparative Genomic Hybridization)**

Die Array-CGH-Methode ist eine Kombination aus vergleichender genomischer Hybridisierung und der Array-Technologie und schließt so die diagnostische Lücke zwischen der konventionellen Chromosomenuntersuchung, der FISH-Diagnostik und den molekulargenetischen Untersuchungen. Hierbei wird das Verhältnis der Menge an gemessenen Fluoreszenzsignalen zwischen der Patienten- und einer Referenz-DNA bestimmt.<sup>16</sup> Dadurch können DNA Kopienanzahlabweichungen über das gesamte Genom entdeckt werden. Erwähnt sei an dieser Stelle zum einen die Methode des BAC-Arrays sowie das Oligonukleotid-Array auf welche später genauer eingegangen wird.

### **2.5.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe**

Die Untersuchung wird an DNA aus Blutproben, pränatal auch aus Chorionzottenmaterial oder Fruchtwasser durchgeführt. Es wird außerdem ein Raster von immobilisierten DNA-Fragmenten benötigt, (Array-, Matrix oder DNA-Chip genannt) auf welche die DNA-Probe des zu untersuchenden Patienten gegenüber einer Referenz-DNA vergleichend hybridisiert werden kann. Diese Chips unterscheiden sich je nach Art der gewählten Array-CGH Methode. So sind, zum Beispiel, die sich auf dem Chip befindlichen DNA-Stücke beim Oligonukleotid-Array deutlich kleiner als beim BAC-CGH. Dies ermöglicht eine höhere Auflösung.

### **2.5.2 Anwendungsgebiete**

Die Array-CGH wird vor allem bei Patienten mit unklarem Dysmorphie- und/oder Retardierungssyndrom oder Verdacht auf submikroskopische Veränderungen und unbalanzierten Genotyp sowie in der Tumorzytogenetik angewendet.

### **2.5.3 Ablauf/ Durchführung**

Im Rahmen der Diagnostik des Patienten 12002 wurde ein 44k-Oligonukleotid-Array durchgeführt. Die zu untersuchende DNA wird mit fluoreszierenden Molekülen markiert (z.B. in grün), zusammen mit einer Referenz-DNA (z.B. in rot markiert) auf den Chip aufgetragen.

---

<sup>16</sup> vgl. <http://genetik.charite.de/institut/>

Die beiden markierten DNAs hybridisieren dort kompetitiv mit den komplementären Sequenzen. Meist sind die Oberflächen der Chips chemisch behandelt, um die Bindung der komplementären Sequenzen zu erleichtern. Das Hybridisierungsverhältnis der beiden DNAs steht in direktem Zusammenhang mit der jeweiligen Fluoreszenzintensität und ist somit ein Indikator für die Menge des zur Verfügung stehenden DNA-Materials. Nach dem Abwaschen des ungebundenen DNA Materials kann die Intensität und Wellenlänge des ausgesendeten Fluoreszenzsignals an jeder Position des Chips gemessen und analysiert werden und daraus das Verhältnis der Patienten-DNA zur Referenz-DNA bestimmt werden.

#### **2.5.4 Auswertung**

Anschließend kann die Verschiebung des Farbverhältnisses automatisch analysiert und so submikroskopische DNA Veränderungen detektiert werden. Da nicht jede Kopienzahlveränderung im Genom auch ein verändertes phänotypisches Erscheinungsbild nach sich zieht, muss das erzielte Ergebnis mit den Datenbanken verglichen werden, um die Relevanz des Ergebnisses abwägen zu können (zum Beispiel, auf der Website <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez>). Bei bisher nicht beschriebenen Veränderungen ist es notwendig die betroffenen Gene im Detail anzusehen, um eine Abschätzung der jeweiligen phänotypischen Auswirkungen durchzuführen.

## **2.6 Real Time PCR**

Das Verfahren der Real Time PCR, oder auch quantitative Echtzeit-PCR genannt, basiert auf der herkömmlichen Polymerase Kettenreaktion kombiniert mit einem optischen Detektionsverfahren zum Messen der während der Reaktion sich verändernden Fluoreszenz. Dadurch ermöglicht die Real Time PCR nicht nur die Vervielfältigung von DNA Material sondern auch die Quantifizierung der gewonnenen DNA Endprodukte in Echtzeit über den gesamten Verlauf der Reaktion. Dies gelingt häufig anhand der Messung der Intensität eines fluoreszierenden Farbstoffs, der sich präferenziell in die Furchen der doppelsträngigen DNA einlagert und mit Licht angeregt werden kann. Die ermittelte exponentielle Phase der Reaktion wird zur Auswertung herangezogen, da zu diesem Zeitpunkt die besten Versuchsbedingungen vorherrschen.

### **2.6.1 Voraussetzungen/ Werkstoffe**

Die Vorbereitung sowie die Werkstoffe der Real Time PCR ähneln zu einem großen Teil der herkömmlichen PCR (Details siehe 2.1). An dieser Stelle möchte ich speziell auf die verschiedenen Methoden zur Quantifizierung der DNA eingehen, unter anderem auch auf interkalierende Farbstoffe, FRET-Sonden oder LUX-Primer.

Die in dieser Arbeit zum Einsatz kommende Methode mit interkalierenden Farbstoffen macht sich die fluoreszierende Eigenschaft von Farbstoffen zu Nutze, die durch Einlagerung derselben in die Furchen der doppelsträngigen DNA entsteht. Der früher verwendete Vertreter dieser Gruppe, Ethidiumbromid, wird heute durch asymmetrische Cyanin-Farbstoffe wie, zum Beispiel, SYBR Green I oder BEBO abgelöst. SYBR Green I hat für sich kaum fluoreszierende Eigenschaften, entwickelt diese aber sobald es an die DNA Doppelstränge gebunden hat. Die Tatsache, dass SYBR Green I sehr preisgünstig ist, eine hohe Signalstärke und eine vielseitige Verwendbarkeit aufweist, sind große Vorteile des Farbstoffes. Ein Nachteil ist, dass es nicht ausschließlich an das zu analysierende PCR Produkt bindet sondern auch an unspezifische Nebenprodukte. Deshalb muss anschließend an die PCR Reaktion eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt werden.

Dabei wird die Temperatur langsam von etwa 40°C auf 95°C gesteigert, was zur Folge hat, dass die DNA Doppelstränge denaturieren und eine Abnahme der Fluoreszenz gemessen werden kann.

Da die spezifischen PCR Produkte einen deutlich höheren Schmelzpunkt besitzen als die unspezifischen Nebenprodukte, können diese nun anhand der Schmelzpunkte identifiziert werden, wodurch Primerpaare, die einen auffallenden Gehalt an Nebenprodukten produzieren, von der weiteren Auswertung ausgeschlossen werden.

Eine weitere Methode ist auch die Verwendung von FRET-Sonden:

Das Prinzip des „fluorescence resonance energy transfer“ beruht auf dem System, dass ein eingebrachter Donor (Reporter) mit Licht angeregt wird und ein sich in unmittelbarer Nähe befindlicher Quencher (oder Akzeptor) das wiederum vom Donor ausgehende Signal aufnimmt. Je größer die Entfernung zwischen Donor und Quencher desto größer ist die Signalstärke des Fluoreszenzsignals des Donors bzw. desto geringer die Signalstärke des Quenchers.

Das TaqMan<sup>®</sup>-Prinzip ist die älteste Methode im Zusammenhang mit FRET-Sonden. Dabei sitzen der Reporterfarbstoff und der Quencherfarbstoff am selben Oligonukleotid. Dieses kann nun durch eine bestimmte Wellenlänge zur Fluoreszenz angeregt werden. Durch die unmittelbare Nähe von Quencher und Reporter zueinander wird die Fluoreszenz jedoch durch einen Fluoreszenz-Energietransfer (FET) unterdrückt.

Zuerst hybridisiert die Sonde mit den Primern auf den Matrizenstrang, wird dort aber von der Taq-Polymerase wieder verdrängt und zerschnitten. Der zuvor herrschende FET wird so unterbrochen. Es kommt damit je nach Menge des DNA Materials zu einer Steigerung des Fluoreszenzsignals des Reporters. Nicht gebundene Sonden bleiben jedoch unberührt.

Eine Weiterentwicklung daraus stellt die molecular-beacons-Methode dar, bei der eine Minimierung des Abstands zwischen Reporter und Quencher eine Minimierung der Lichtemission zum Ziel hat. Auch die Methode mit Verwendung von „hybridization probes“ soll hier Erwähnung finden.<sup>17</sup>

---

<sup>17</sup> vgl. Kubista, M. et al; Review: The Polymerase chain reaction, Elsevier-Molecular aspect of medicine 27 2006, 95–125

## 2.6.2 Anwendungsgebiete

Die Real Time PCR löst zwei Problemstellungen auf einmal. Zum einen die Vervielfältigung einer bestimmten, vom Ausführenden beliebig definierbaren DNA Sequenz durch dafür eigens designte Primer (Details siehe 2.1.1) sowie zum andern eine Analyse der Menge an existierenden DNA Material durch die ständige Fluoreszenzmessung. Das macht die Real Time PCR zum idealen Instrument zur Untersuchung genetischer Fragestellungen nach dem relativen DNA Gehalt bei genomischen Deletionen oder Duplikationen.

## 2.6.3 Ablauf/ Durchführung

Voraussetzung für die Analyse ist die genaue Kenntnis des zu untersuchenden Chromosomenabschnittes (Sequenz, Größe, Lage). Dafür werden Oligonukleotidprimer designt deren Sequenzen den zu untersuchenden Abschnitt beidseits umschließen (siehe 2.1.1). Die Herstellung des Reaktionsansatzes erfolgt nach genauen Vorgaben.

Laut Laborprotokoll (siehe Anhang) beinhaltet ein 20 µl Ansatz folgendes:

- 10 µl SYBR Green I
- 1 µl Primer bei einer Konzentration von 10 µM
- X µl DNA (50 ng)
- Y µl H<sub>2</sub>O (auf 20 µl auffüllen)

Die DNA wird vor Verwendung wiederum auf ihre Konzentration vermessen. Dafür wird die Proben-DNA parallel mit der Kontroll-DNA bei 95°C für 5-10 Minuten im Thermomixer hitzedenaturiert und anschließend für 15-30 Minuten bei Raumtemperatur abgekühlt. Der in unserem Fall verwendete „Nanodrop<sup>®</sup> 1000“, ein UV-Vis Spektralphotometer, wird kalibriert und misst dann die genaue Konzentration der aufgetragenen Probe. Nur so kann der Reaktionsansatz genau berechnet werden.

Es wird dann üblicherweise ein Mastermix hergestellt, der die berechneten Ingredienzien beinhaltet, die Primer aber ausspart, die man zum Schluss direkt auf die Platte pipettieren kann. Da jeder Primer nicht nur gegen sich selbst sondern auch gegen die Referenz-DNA kontrolliert wird, werden für den Mastermix insgesamt 4 Proben pro Primer berechnet (2x Patient, 2x Referenz).

Befindet sich nun der Mastermix auf der beschrifteten PCR-Platte (19  $\mu\text{l}$  pro well), werden die Primer hinzugefügt (1  $\mu\text{l}$ ), die Platte mit einer Folie verschlossen, um das Verdampfen der Flüssigkeit zu vermeiden und anschließend in das PCR-System (7500 Fast Real Time System) gelegt. Dieses besteht zum einen aus einem Thermocycler, zum anderen aus einem Detektionsmodul zur Fluoreszenzmessung. Die Zyklen werden nun vollautomatisiert durchgeführt und die Ergebnisse anschließend über die ABI Prism 7500 Software ausgewertet.

Der Ablauf wurde für die vorliegenden Analysen in folgende Schritte unterteilt:

- **10 Minuten bei 95°C**, gefolgt von
- **45 Zyklen: 15 Sekunden bei 95°C / 45 Sekunden 60°C**, anschließend bei 1% Heizleistung in
- **langsamen Schritten von 60°C auf 95°C steigern.**

Dieser langsame, schrittweise Temperaturanstieg ist wesentlich für eine aussagekräftige Schmelzkurvenanalyse.

#### 2.6.4 Auswertung

Anhand der entstandenen sigmoiden Kurve, die die Intensität der detektierten Fluoreszenzsignale beschreibt, kann also im direkten Vergleich zu einer standardisierten Probe der Rückschluss auf die Menge des DNA Ausgangsmaterial gezogen werden.

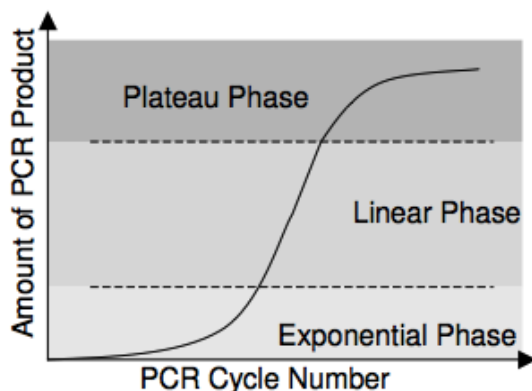


Abbildung 1 Auswertungskurve des Fluoreszenzsignals<sup>18</sup>

<sup>18</sup> vgl. [www.biomedcentral.com/1471-2105/7/85](http://www.biomedcentral.com/1471-2105/7/85)

Um den Beginn der exponentiellen Phase zu bestimmen, wird in den folgenden Untersuchungen der Ct-Wert bzw. der Cp-Wert errechnet. Der Ct-Wert (Cycle Treshold) sowie der Cp-Wert (Crossing Point) beschreiben den Moment des Verfahrens an dem die Fluoreszenzsignale erstmals deutlich ansteigen. Die Kurve bleibt je nach Menge des Ausgangsmaterials bis zu 30 Zyklen exponentiell und flacht anschließend aufgrund des Substratverbrauchs wieder ab, wodurch eine sigmoide Kurve entsteht. Die sich daraus ergebenden Ct-Werte (Cycle Threshold) dienen anschließend als Input für verschiedene Algorithmen, welche eine Quantifizierung des Testmaterials gegenüber der Kontrolle ermöglichen. Eine häufig verwendete Methode zur analytischen Verwendung des Ct-Wertes ist die  $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode. Dabei wird eine Tabellenkalkulation angewandt, die es, wie unten beschrieben, ermöglicht den  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Wert zu berechnen. <sup>19</sup>

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct Patient} - \text{Ct Referenz}$$

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct Patient} - \Delta\text{Ct Referenz}$$

$$\mathbf{Ratio} = 2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$$

Für den  $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ -Wert als relativer Quantifizierungsmaßstab wurde folgende Einteilung getroffen.

$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} < 0,7$	kritisch im Sinne einer <b>potenziellen Deletion</b>
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 0,7-0,8$	Graubereich
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 0,8-1,2$	<b>Normbereich</b> ; nicht dupliziert oder deletiert
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} = 1,2-1,3$	Graubereich
$2^{-\Delta\Delta\text{Ct}} > 1,3$	kritisch im Sinne einer <b>potenziellen Duplikation</b>

**Tabelle 1 Ct-Wert als Quantifizierungsmaßstab**

<sup>19</sup> vgl. Schwarzbraun T. et al; Characterization of a de novo complex chromosome rearrangement involving chromosomes 2 and 12, associated with mental retardation and impaired speech development. Cytogenetic Genome Research 2006; 115:84-89

### **2.6.5 Real Time PCR und herkömmliche PCR im Vergleich**

Der große Vorteil der Real Time PCR ist die Echtzeit-Messung. Während die herkömmliche quantitative PCR eine Auswertung erst nach Ablauf der Zyklen und unter Einbeziehung einer gelelektrophoretischen Auftrennung der DNA Fragmente ermöglicht, gelingt es mit der Real Time PCR Methode die lineare Phase zu ermitteln und damit eine Analyse des Fluoreszenzsignals unter optimalen Versuchsbedingungen zu schaffen. Dies ist eine weitaus spezifischere Methode zur Quantifizierung der verwendeten DNA Fragmente.

## **3 Empirisches Beispiel - Patient 12002**

### **3.1 Patient 12002**

#### **Klinische Diagnose: Therapieresistente Epilepsie sowie ausgeprägte psychomotorische Retardierung bei moderaten Dysmorphien**

Der Patient 12002 war zum Zeitpunkt des Erstkontakts mit dem Institut für Humangenetik der Medizinischen Universität Graz 6 Jahre alt.

#### **Anamnese**

Die Schwangerschaft verlief komplikationslos. Während der Geburt kam es zu einem Geburtsstillstand weshalb eine Notfallsectio durchgeführt werden musste. Post partum war das Gewicht, die Größe sowie der Kopfumfang des Neugeborenen unauffällig. Das erste Symptom war ein von den Eltern beschriebener „starrer Blick“ im Alter von 5 Monaten. Einen Monat später kamen „Muskelzuckungen“ sowie „krampfartige Anfälle“ hinzu.

Im Alter von 7 Monaten wurde schließlich eine EEG Untersuchung durchgeführt, welche die für das WEST-Syndrom typischen Hypsarrhythmien im Zusammenhang mit BNS-Anfällen zeigte. In der Folge traten eine Reihe weiterer Auffälligkeiten in der Entwicklung des Patienten auf. Im Alter von 10 Monaten erlernte er das Sitzen, mit 18 Monaten konnte er ohne Hilfe gehen. Deutlich auffällig erwies sich auch die Sprachentwicklung. So war dem Patienten zwar das Lautieren möglich, die Fähigkeit zur aktiven Sprachentwicklung bestand jedoch nicht. Das Hörvermögen blieb weitgehend unangetastet. Im Rahmen der umfangreichen apparativen Diagnostik, der Stoffwechselfdiagnostik sowie der bildgebenden Verfahren war im MRT eine Hirnfehlbildung auffällig. Sonst war kein pathologischer Befund erhebbbar.

Im Alter von 4 Jahren wurde im Rahmen einer klinischen Untersuchung ein ataktisches Gangbild bei genereller, leichter Muskelhypotonie diagnostiziert. Zu diesem Zeitpunkt berichteten die Eltern über 1-5 Anfälle pro Nacht.

Die für das WEST-Syndrom typische Therapieresistenz zeigte sich auch bei unserem Patienten.

Nach einer Vielzahl von Therapieversuchen erreichte man schließlich eine Verbesserung der Anfallshäufigkeit und -ausprägung durch die Gabe von Taloxa® 600mg/5ml, 2x2ml tgl. (Wirkstoff: Felbamat).

### **3.2 Das Krankheitsbild**

Beim WEST-Syndrom (syn. Propulsiv-Petit-mal, BNS Syndrom) handelt es sich um eine typischerweise im Alter zwischen 3-12 Monaten auftretende Erkrankung, die sich vor allem durch geistige Retardierung sowie axial betonte, tonische Spasmen auszeichnet, die sogenannten BNS-Anfälle: BNS steht für Blitz-, Nick- und Salaam-Anfälle.<sup>20</sup> Diese sind durch „blitzartig“ einschließende Myoklonien gekennzeichnet, wobei Beugesynergien vor Streckesynergien überwiegen. Weiters treten schnelle Beugungen im Bereich der Nacken- und Rumpfmuskulatur auf, welche eine Nickbewegung verursachen. Die Bezeichnung Salaam-Anfälle rührt von ruderartigen Bewegungen der Arme her, welche vor der Brust zusammengeführt werden und so das Bild des arabischen Friedensgrüßes „Salaam“ ergeben. Pathognomonisch im EEG sind Hypsarrhythmien, eine hochamplitudige Deltaaktivität mit multifokalen spikes und sharp waves.<sup>21</sup> Die Prognose der Erkrankung ist im Allgemeinen eher ungünstig, da ein Übergang ins Lennox-Gastaut-Syndrom häufig ist<sup>22</sup>.

### **3.3 Der vorausgegangene gendiagnostische Verlauf**

Bei bestehendem Kinderwunsch wurde eine detaillierte genetische Diagnostik durchgeführt. Hierfür wurde als Untersuchungsmaterial EDTA Blut von Eltern und Kind gewonnen.

Anamnestisch waren keine Auffälligkeiten in der Familie der Mutter zu erheben, väterlicherseits soll der Großvater des Patienten eine Schwester mit Entwicklungsverzögerung und Hörbehinderung gehabt haben, welche auch phänotypisch auffällig erschien. Ein Fragiles X-Syndrom wurde diagnostisch ausgeschlossen.

---

<sup>20</sup> vgl. Hufschmidt, A., Neurologie compact, 5. Auflage 2009; CD-Rom, Kapitel Epilepsien

<sup>21</sup> vgl. ebendort

<sup>22</sup> vgl. Grehl, H., Checkliste Neurologie, 4. Auflage 2008; S.538

Das Standard GAG-Karyogramm ergab sowohl beim Vater als auch beim Patienten eine offensichtlich balancierte Translokation 46,XY,t(8;15)(q22;q13). Weitere Analysen mittels Multiplex-FISH und den Sonden wcp 8 und 15 bestätigten, dass beim Vater keine weiteren Chromosomen betroffen sind. Im Rahmen einer 44k-Oligonukleotid-Array-CGH Analyse bei 100kb Auflösung bestätigte sich, dass die Translokation sowohl beim Vater als auch beim Patienten selbst balanciert ist.

Zusätzlich getestet wurde der Großvater väterlicherseits, der bei 20 GAG gebänderten Mitosen einen durchwegs normalen männlichen Chromosomensatz 46,XY ohne Hinweis auf numerische oder lichtmikroskopisch erkennbare, strukturelle Chromosomenaberrationen aufwies. Ob die balancierte Translokation des Vaters [46,XY,t(8;15)(q22;q13)] nun beim Vater spontan aufgetreten oder über seine Mutter vererbt wurde, konnte leider nicht geklärt werden, da keine Blutprobe der Großmutter väterlicherseits vorlag.

Entscheidend war nun das Ergebnis der 44k-Oligonukleotid-Array-CGH hinsichtlich des Patienten, welche eine Duplikation von mindestens 455 kb Größe im Subtelomerbereich des kurzen Arms von Chromosom 4 ergab. Im Detail befindet sich diese Duplikation im Bereich des **chr4:424.726-880.473**. Diese Mutation wurde zwar bei dem Patienten bestätigt, nicht jedoch bei seinen Eltern, was auf eine *de novo* Mutation schließen lässt.

Am Institut für Humangenetik wurde auch ein Zusammenhang mit der „Wolf Hirschhorn candidate critical region“ (WHSCR) diskutiert. Diese umfasst einen 165kb großen Bereich (Chromosomenbande 4p16.3) und steht in direktem Zusammenhang mit dem Wolf Hirschhorn Syndrom (1:50.000 Geburten), welches durch eine Deletion des kurzen Arms des 4. Chromosoms verursacht wird. Die Symptome des Wolf Hirschhorn Syndroms umfassen unter anderem schwere geistige und körperliche Retardierung sowie Krampfanfälle.<sup>23</sup> Die Kandidatengene WHSC 1 und WHSC2 befinden sich jedoch nicht direkt in der duplizierten Region.

Da die oben beschriebene balancierte Translokation [46,XY,t(8;15)(q22;q13)] bei Vater und Patient bestätigt wurde, der Vater aber keine Symptome zeigt, ist davon auszugehen, dass die umschriebene Duplikation auf Chromosom 4 (4p16.3) möglicherweise für die Symptome des Patienten ursächlich ist.

---

<sup>23</sup> vgl. Chen, Harold., Atlas auf genetic diagnosis and counseling, 1. Auflage 2006; S.1047

## 4 Real Time PCR bei Patient 12002

Anhand der vorausgegangenen genetischen Routinediagnostik, welche von den Mitarbeitern des Humangenetischen Institutes der Medizinischen Universität Graz durchgeführt wurde, konnte beim Patienten eine Duplikation innerhalb der oben erwähnten Region **chr4:424.726-880.473** als Ursache für das Krankheitsbild des Patienten angenommen werden.

In diesem 455kb großen Bereich befinden sich laut UCSC<sup>®</sup> Datenbank mindestens 10 Gene, von denen jedoch einige nur teilweise in der sicher duplizierten Region liegen. Das Ergebnis der Array-CGH lässt wegen der geringen Größe der Duplikation sowie der geringen Auflösung des Arrays jedoch keinen Rückschluss auf den exakten Übergang von der duplizierten in die nicht duplizierte Region zu.

In den folgenden 8 Real Time PCR-Durchgängen werden die **Unsicherheitsregionen** am 5'-Ende (**chr4:404.726-424.726**) sowie am 3'-Ende (**chr4:880.473-946.473**), welche die sicher duplizierte Region flankieren untersucht, um die genauen Ausmaße der Duplikationen zu bestimmen:

**In der 5'-Unsicherheitsregion (chr4:404.726-424.726) befinden sich folgende Gene:**

- ABCA111P (Position: chr4:409.224-457.998)
- ZNF721 (Position: chr4:423.779-483.442)

**Die Unsicherheitsregion am 3'-Ende (chr4:880.473-946.473) beinhaltet folgende Gene:**

- GAK (Position: chr4:833.065-916.174)
- TMEM175 (Position: chr4:916.262-942.443)
- DGKQ (Position: chr4:942.675-957.344)

Ziel des folgenden Abschnitts ist die Klärung der Beteiligung dieser Gene an der bereits feststehenden Duplikationsregion.

## 4.1 Durchgänge 1-3

Im Rahmen der ersten drei Durchgänge der PCR kam es durch zu hohes Hintergrundrauschen zu nicht auswertbaren Ergebnissen. Aufgrund der Divergenz der Ergebnisse wurden die Durchgänge 1-3 nicht zur weiteren Analyse herangezogen. Stattdessen wurden weitere Durchgängen mit veränderten Primerpositionen sowie einer neuen Charge des Reagens (SYBR Green I) durchgeführt. So gelang es in den weiteren Analysen die Baseline zu senken und damit verwertbare Ergebnisse zu erzielen.

### 4.1.1 Durchgang 1

#### Primerdesign

1. Durchgang	Sequenzen		Ort	Duplikation?
3'_1a	ttggttattctggggtctcg	gctccaagtgaaaccaatg	chr4:412.409-412.600	ja
3'_1b	tgcaactaccaagcagtg	aggggctgttctaatctggag	chr4:416.968-417.162	nein
5'_1c	ggaaactggagtgagcaagc	tccagaaacgttgcttttcc	chr4:887.588-887.777	nein
5'_1d	cacctcaaccgaacacacac	gagaagatcctcgcgattg	chr4:893.179-893.398	nein

Tabelle 2 Primersequenzen und Ergebnisse vom 17.11.2009

#### Ergebnisse

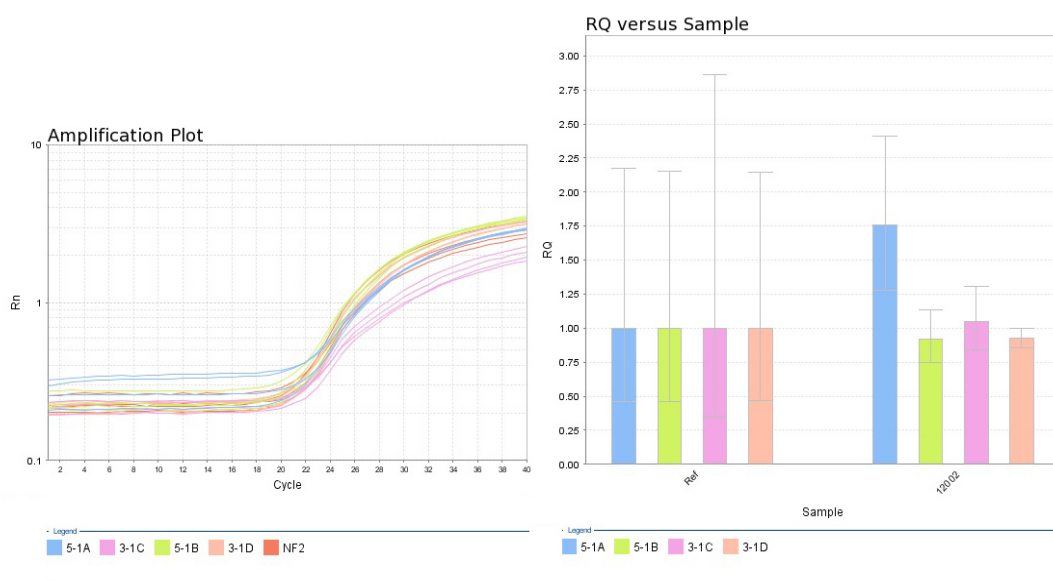


Abbildung 2 Amplification Plot vom 17.11.2009

## 4.1.2 Durchgang 2

### Primerdesign

2. Durchgang		Ort	Duplikation?	
5'_1	gccacattacaccttctgg	aggctttctcctttcgttcc	chr4:882.708-882.949	nein
5'_2	ggaaggagaaggggtgaaag	tttctgttgcctcctgaac	chr4:884.628-884.826	nein
3'_1	ggggatccctagcttttgc	tttcccaggttgacttgc	chr4:419.476-419.677	nein
3'_2	accagaattgattggcatgg	tgggcacaaggaaattatgg	chr4:422.991-423.224	nein

Tabelle 3 Primersequenzen und Ergebnisse vom 03.12.2009

### Ergebnisse

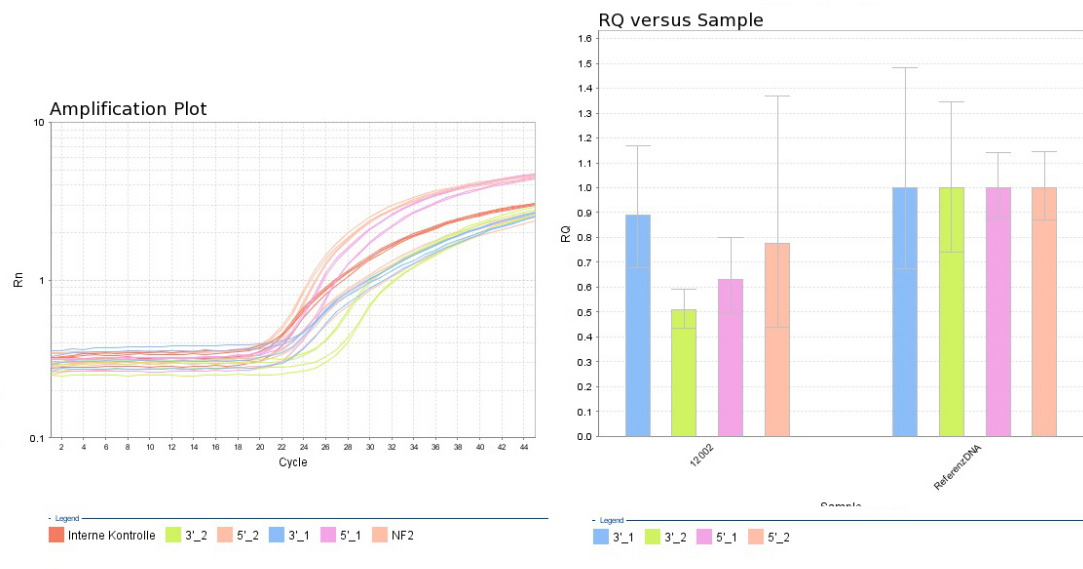


Abbildung 3 Amplification Plot vom 03.12.2010

## 4.1.3 Durchgang 3

### Primerdesign

3. Durchgang/ gleiche Primer		Ort	Duplikation?	
5'_1	gccacattacaccttctgg	aggctttctcctttcgttcc	chr4:882.708-882.949	nein
5'_2	ggaaggagaaggggtgaaag	tttctgttgcctcctgaac	chr4:884.628-884.826	nein
3'_1	ggggatccctagcttttgc	tttcccaggttgacttgc	chr4:419.476-419.677	nein
3'_2	accagaattgattggcatgg	tgggcacaaggaaattatgg	chr4:422.991-423.224	nein

Tabelle 4 Primersequenzen und Ergebnisse vom 07.12.2009

## Ergebnisse

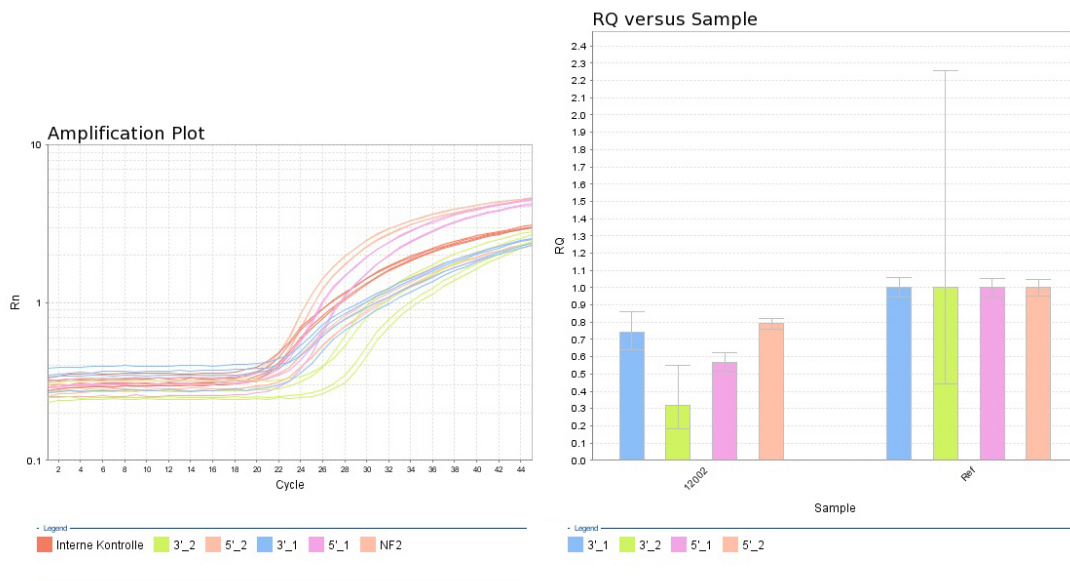


Abbildung 4 Amplification Plot vom 07.12.2009

## 4.2 Durchgang 4

Durch die Änderung der Primerpositionen und der Umstellung des fluoreszierenden Farbstoffes auf eine neue Charge von SYBR Green I konnten ab Durchgang 4 interpretierbare Ergebnisse erzielt werden. Es kann davon ausgegangen werden, dass die bei Durchgang 1-3 verwendete Charge möglicherweise zu falschen Ergebnissen geführt hat. Ab Durchgang 6 wurde zusätzlich eine weitere interne Kontrolle hinzugefügt, mit der die Ergebnisse erneut auf ihre Richtigkeit überprüft werden konnten.

## Primerdesign

4. Durchgang			Ort	Duplikation?
5'_1	cctaactgacaccaccag	tcgctgatggactaaagcag	chr4:417.703-417.805	ja
5'_2	acccatgaactgcatccac	tcaagattcaaatctgcagtg	chr4:421.512-421.616	ja
3'_1	catccatgtggaacgaaagg	ccgaaagatctgtggttgc	chr4:882.921-883.015	ja
3'_2	gtgaaaactgggccacaaac	gtgtgttggttcgttgag	chr4:886.536-886.631	ja

Tabelle 5 Primersequenzen und Ergebnisse vom 12.01.2010

## Zusammensetzung des Ansatzes

### Pro 20µl Ansatz:

- 10 µl SYBR Green
- 1 µl Primer (Konzentration: 10 µM)
- X µl DNA (so genau wie möglich 50 ng)
- Y µl H<sub>2</sub>O (auf 20 µl auffüllen)

### Primer Ansatz:

8 µl H<sub>2</sub>O  
 1 µl forward Primer  
 1 µl reverse Primer

### Mastermix für 14 Ansätze:

Referenz-DNA bei einer Konzentration von: 390,6 ng/ µl

Patientin-DNA bei einer Konzentration von: 157,1 ng/ µl

	<i>Referenz</i>	<i>Patient</i>
<b>SYBR Green</b>	140,00 µl	140,00 µl
<b>DNA</b>	1,79 µl	4,46 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	124,21 µl	121,54 µl

Tabelle 6 Zusammensetzung des Ansatzes vom 12.01.2010

## Ergebnisse

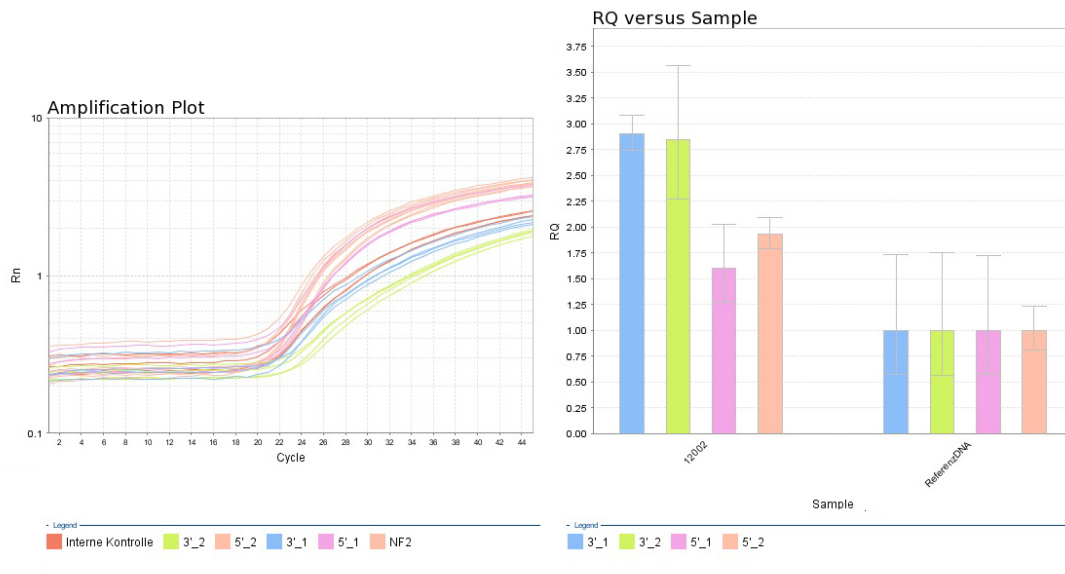


Abbildung 5 Amplification Plot vom 12.01.2010

### 4.3 Durchgang 5

#### Primerdesign

5. Durchgang		Ort	Duplikation ?	
5'_1	tgttgaagaggtgtttaccg	gacttgctcacaacagaagagc	chr4:421.178-421.272	ja
5'_2	ttcaaatggctctgcaacag	tttcccaggttgactgc	chr4:419.575-419.677	nein
5'_3	cctaactgcacaccaccag	tcgctgatggactaaagcag	chr4:417.703-417.805	ja
5'_4	ggctcactgatactttcatctg	gcatcacactcctggttc	chr4:415.273-415.368	ja
5'_5	aatgtccaccagagcctgc	tggcataagcagcatcagtg	chr4:411.213-411.317	ja
		tggcttctcagcagcactc		
3'_1	ttgtgaagccccacattacacc		chr4:882.701-882.797	ja
3'_2	gctcacagacacgattcttc	ttgaagtgtgatgggtcgtg	chr4:884.230-884.326	ja
3'_3	tggagaagcctcacaacgctc	gctaagtgtcgctgtgctg	chr4:886.486-886.588	ja
3'_4	aacatcttcagaaccgtgctg	gcctccatgtgagttcattc	chr4:888.495-888.596	ja
3'_5	atcctgggaacacactggac	tttgcgaggggtaaatcttg	chr4:891.802-891.905	ja

Tabelle 7 Primersequenzen und Ergebnisse vom 01.02.2010

#### Zusammensetzung des Ansatzes

##### Pro 20µl Ansatz:

- 10 µl SYBR Green
- 1 µl Primer (Konzentration: 10 µM)
- X µl DNA (so genau wie möglich 50 ng)
- Y µl H<sub>2</sub>O (auf 20 µl auffüllen)

##### Primer Ansatz:

8 µl H<sub>2</sub>O

1 µl forward Primer

1 µl reverse Primer

##### Mastermix für 27 Ansätze:

Referenz-DNA bei einer Konzentration von: 390,6 ng/ µl

Patientin-DNA bei einer Konzentration von: 136,5 ng/ µl

	Referenz	Patient
<b>SYBR Green</b>	270,00 µl	270,00 µl
<b>DANN</b>	3,46 µl	8,59 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	239,54 µl	234,41 µl

Tabelle 8 Zusammensetzung des Ansatzes vom 01.02.2010

## Ergebnisse

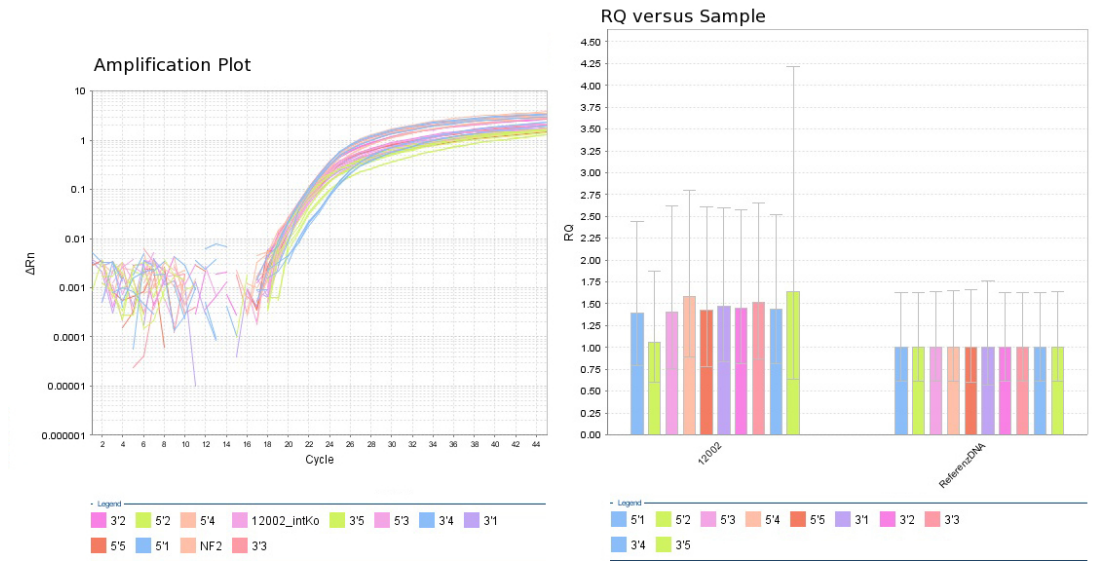


Abbildung 6 Amplification Plot vom 01.02.2010

## 4.4 Durchgang 6

### Primerdesign

6. Durchgang gleiche Primer; zusätzlich weitere Interne Kontrolle		Ort	Duplikation?	
5'_1	tgttgaagaggtgtttaccg	gacttgctcacaacagaagagc	chr4:421.178-421.272	ja
5'_2	tcaaatggtcctgcaacag	tttcccaggttgacttgc	chr4:419.575-419.677	nein
5'_3	cctaactgcacaccaccag	tcgctgatggactaaagcag	chr4:417.703-417.805	ja
5'_4	ggctcactggatactttcatctg	gcatcacacttctgtgtcc	chr4:415.273-415.368	ja
5'_5	aatgtccaccagagcctgtc	tggcataagcagcatcagtg	chr4:411.213-411.317	ja
3'_1	tttgaagcccaattacacc	tggttctcagcagcactc	chr4:882.701-882.797	ja
3'_2	gctcacagacacggattcttc	ttgaagtgtgatgggtcgtg	chr4:884.230-884.326	ja
3'_3	tggagaagcctcacaacgctc	gctaagtgtcgctgtgctg	chr4:886.486-886.588	ja
3'_4	aagatcttcagaaccgtgtcg	gctccatgtgagtttcattc	chr4:888.495-888.596	ja
3'_5	atcctgggaacacactggac	tttgcgagggtaaatcttg	chr4:891.802-891.905	ja

Tabelle 9 Primersequenzen und Ergebnisse vom 04.02.2010

## Zusammensetzung des Ansatzes

### Pro 20µl Ansatz:

- 10 µl SYBR Green
- 1 µl Primer (Konzentration: 10 µM)
- X µl DNA (so genau wie möglich 50 ng)
- Y µl H<sub>2</sub>O (auf 20 µl auffüllen)

Primer Ansatz:

8 µl H<sub>2</sub>O

1 µl forward Primer

1 µl reverse Primer

Mastermix für 30 Ansätze:

Referenz-DNA bei einer Konzentration von: 390,6 ng/ µl

Patientin-DNA bei einer Konzentration von: 136,5 ng/ µl

	<i>Referenz</i>	<i>Patient</i>
<b>SYBR Green</b>	300,00 µl	300,00 µl
<b>DANN</b>	3,84 µl	9,55 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	166,16 µl	260,45µl

Tabelle 10 Zusammensetzung des Ansatzes vom 04.02.1010

## Ergebnisse

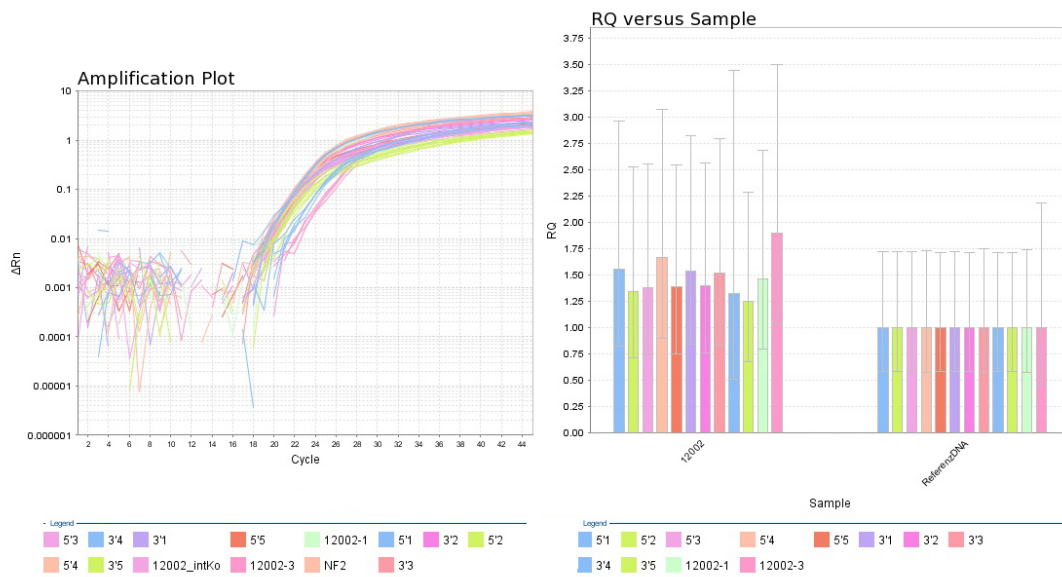


Abbildung 7 Amplifikation Plot vom 04.02.2010.

## 4.5 Durchgang 7

### Primerdesign

<i>7. Durchgang</i>		<i>Ort</i>	<i>Duplikation?</i>	
5'_1	tgtttgaagaggtgtttaccg	gacttgctcacaacagaagagc	chr4:421.178-421.272	ja
5'_2	tcaaatggctcctgcaacag	tttccagggttgacttgc	chr4:419.575-419.677	ja
5'_3	cctaactgacaccaccag	tcgctgatggactaaagcag	chr4:417.703-417.805	ja
5'_4	ggctcactggatacttcatctg	gcatcacacttctggttcc	chr4:415.273-415.368	ja
5'_5	aatgtccaccagagcctgctc	tggcataagcagcatcagtg	chr4:411.213-411.317	n.v*.
3'_1	ttgtgaagcccacattacacc	tggcttctcagcagcactc	chr4:882.701-882.797	ja
3'_2	gctcacagacacggattcttc	ttgaagtgtgatgggtcgtg	chr4:884.230-884.326	ja
3'_3	tggagaagcctcacaacgctc	gctaagtgtcgctgtgctg	chr4:886.486-886.588	ja
3'_4	aagatcttcagaaccgtgtcg	gcctcatgtgagtttcattc	chr4:888.495-888.596	ja
3'_5	atcctgggaacacactggac	tttgcgaggggtaaatcttg	chr4:891.802-891.905	ja

Tabelle 11 Primersequenzen und Ergebnisse vom 11.02.2010

\*Dieses Ergebnis war aufgrund einer zu hohen Standardabweichung nicht verwertbar.

### Zusammensetzung des Ansatzes

#### Pro 20µl Ansatz:

- 10 µl SYBR Green
- 1 µl Primer (Konzentration: 10 µM)
- X µl DNA (so genau wie möglich 50 ng)
- Y µl H<sub>2</sub>O (auf 20 µl auffüllen)

#### Primer Ansatz:

8 µl H<sub>2</sub>O

1 µl forward Primer

1 µl reverse Primer

#### Mastermix für 25 Ansätze:

Referenz-DNA bei einer Konzentration von: 390,6 ng/ µl

Patientin-DNA bei einer Konzentration von: 136,5 ng/ µl

	<i>Referenz</i>	<i>Patient</i>
<b>SYBR Green</b>	250,00 µl	250,00 µl
<b>DANN</b>	3,20 µl	7,95 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	221,80 µl	217,09 µl

Tabelle 12 Zusammensetzung des Ansatzes vom 11.02.2010

## Ergebnisse

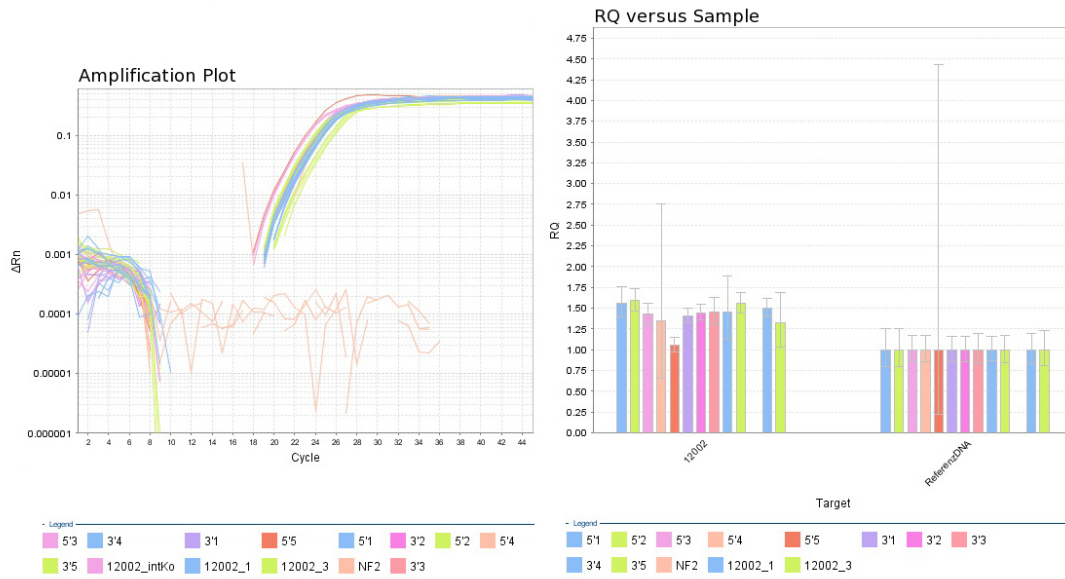


Abbildung 8 Amplifikation Plot vom 11.02.2010

## 4.6 Durchgang 8

### Primerdesign

8. Durchgang		Ort	Duplikation?	
3'_1	cgctgcagaacaaaactgg	gcacagaactgtgacatgg	chr4:905.528-905.629	nein
3'_2	cacacagtgcaggaaagc	ggacttctggacattctcc	chr4:914.176-914.276	nein
3'_3	aagatccgtgccattctctg	caaggggtggagagacagag	chr4:924.280-924.381	nein
3'_4	cactcagacctgccttctc	ggtgtatccagtcctgctc	chr4:941.472-941.568	nein
5'_1	ggccagaggcctgaaatc	tgatcacaactgcatttctcc	chr4:421.250-421.345	nein
5'_2	cttcaggctcttctggattg	ggtgtctggaatgaagtatgg	chr4:420.659-420.763	nein
5'_3	cccaaacacaacaactctgg	tcacgaacatttcccattg	chr4:418.787-418.887	nein

Tabelle 13 Primersequenzen und Ergebnis vom 28.04.2010

## Zusammensetzung des Ansatzes

### Pro 20µl Ansatz:

- 10 µl SYBR Green
- 1 µl Primer (Konzentration: 10 µM)
- X µl DNA (so genau wie möglich 50 ng)
- Y µl H<sub>2</sub>O (auf 20 µl auffüllen)

### Primer Ansatz:

- 8 µl H<sub>2</sub>O
- 1 µl forward Primer
- 1 µl reverse Primer

Mastermix für 20 Ansätze:

Referenz-DNA bei einer Konzentration von: 390,6 ng/ µl

Patientin-DNA bei einer Konzentration von: 136,5 ng/ µl

	<i>Referenz</i>	<i>Patient</i>
<b>SYBR Green</b>	200,00 µl	200,00 µl
<b>DANN</b>	2,56 µl	6,36 µl
<b>H<sub>2</sub>O</b>	177,44 µl	193,64 µl

Tabelle 14 Zusammensetzung des Ansatzes vom 28.04.2010

**Ergebnisse**

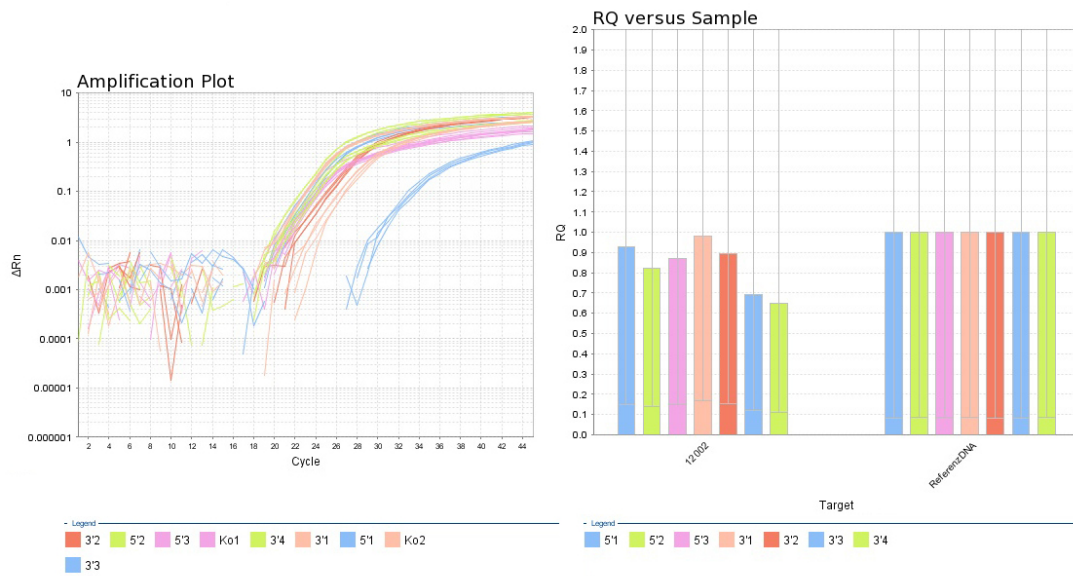


Abbildung 9 Amplification Plot vom 28.04.2010

## 5 Ergebnisse - Duplizierte Gene

Im folgenden Abschnitt werden die duplizierten Gene näher beschrieben sowie die Untersuchungsergebnisse der noch fraglich betroffenen Gene in den Unsicherheitsregionen diskutiert. Um die in Frage kommende Region zu analysieren, wird mittels UCSC<sup>®</sup> Suchmaske die Sequenz der sicher duplizierten Region eingegeben und auf RefSeq Genes (Reference Sequence Genes) durchsucht. In unserem Fall kam dabei der UCSC<sup>®</sup> Human Genome Browser in der Version des März 2006 Assembly (NCBI36/hg18) zum Einsatz.

Insgesamt wurden 8 Real Time PCR Durchgänge durchgeführt. Aufgrund einer zu hohen Baseline musste auf eine Auswertung der Durchgänge 1-3 verzichtet werden. Es gelang allerdings in den folgenden 5 Real Time PCR Durchgängen die duplizierte Region des Patienten 12002 genauer zu definieren.

In der 3'- Unsicherheitsregion konnte verifiziert werden, dass von der bestätigten Region ausgehend der letzte überprüfte duplizierte Primer die Region chr4:891.802-891.905 umschließt. Die nächste Region, bei der eine Duplikation laut Ergebnis nicht zu erwarten ist, liegt auf chr4:905.528-905.629.

Dies macht einen Übergang von einer Duplikation auf eine nicht duplizierte Region zwischen chr4: 891.905-905.528 äußerst wahrscheinlich und grenzt die ursprüngliche Unsicherheitsregion von etwa 66kb auf chr4:880.473-946.473 auf die folgende, etwa 14kb umfassende Region auf chr4:891.905-905.528 deutlich ein.

Die direkt anschließende Abbildung zeigt die ursprüngliche Unsicherheitsregion am 3'-Ende (chr4:880.473-946.473) Sie beinhaltet zumindest teilweise folgende RefSeq Gene:

- GAK (Position: chr4:833.065-916.174)
- TMEM175 (Position: chr4:916.262-942.443)
- DGKQ (Position: chr4:942.675-957.344)

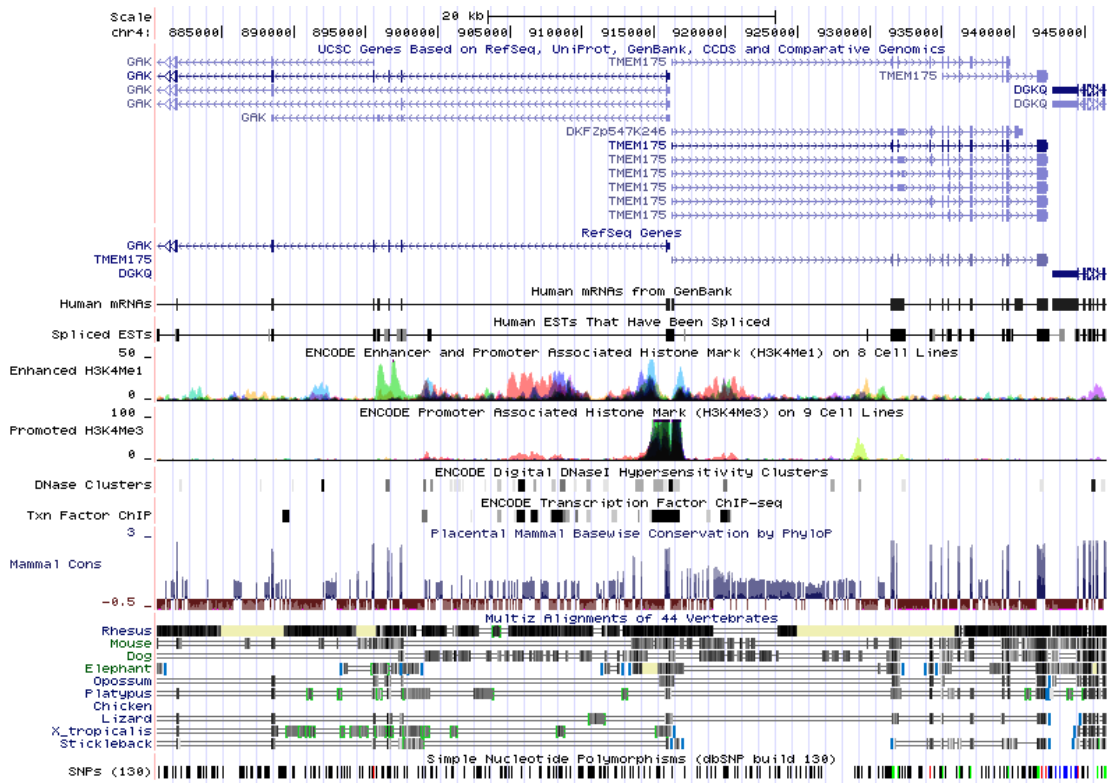


Abbildung 10 chr4:880.473-946.473

Durch die weitere Eingrenzung der verifizierten Duplikationsregion anhand der vorliegenden Real Time PCR Ergebnisse auf chr4:880.473-891.905, gelang es sowohl TMEM175 als auch DGKQ als duplizierte Gene auszuschließen. Außerdem konnte bewiesen werden, dass das GAK Gen mit der Region chr4:833.065-916.174 großteils, aber nicht zur Gänze, in der duplizierten Region liegt.

Die 3'-Unsicherheitsregion konnte so wie folgt neu definiert werden (chr4:891.905-905.528):

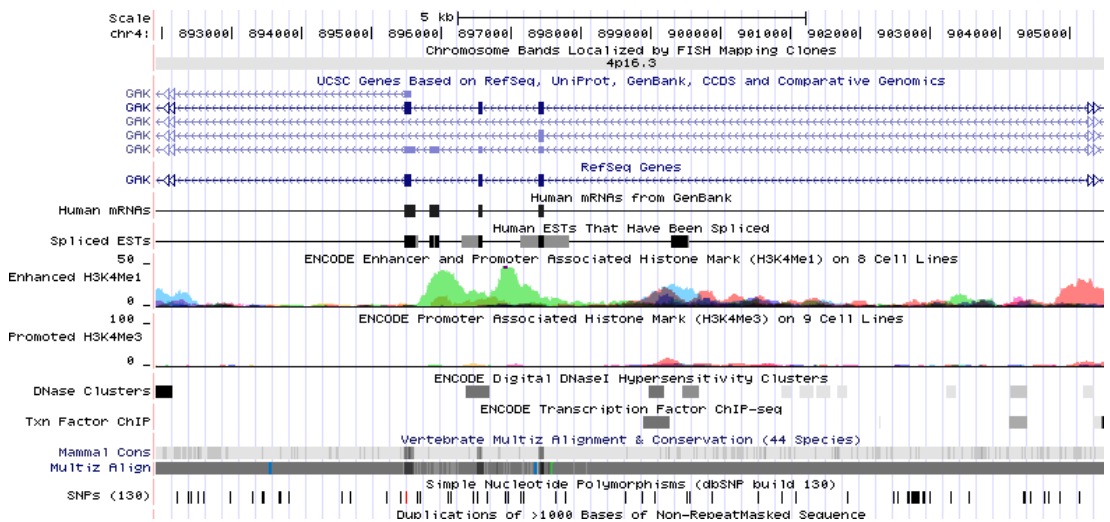


Abbildung 11 chr4:891.905-905.528

Die Ergebnisse das 5'-Ende betreffend waren in den unterschiedlichen Regionen durchaus divergent. Zum einen wäre es denkbar, dass sich hier falsch negative/ positive Werte zeigen, zum anderen ergibt die Ergebnisanalyse, dass auch eine Unterbrechung der duplizierten Regionen durch einzelne nicht duplizierte Abschnitte möglich wäre. Diese Ergebnisse sind durchaus ungewöhnlich und sprechen für eine große Komplexität des zu analysierenden Abschnitts.

Die genauere Ergebnisevaluation beschreibt eine Duplikation, die mit unserer durch den Array-CGH bestätigten Region verbunden, bis chr4:421.178 reicht. Durchgang 8 jedoch beschreibt eine Unterbrechung in der Region chr4:421.250-421.345 in gleicher Weise wie die ebenfalls nicht duplizierte Region chr4:418.787-420.763. Diese wiederum grenzt an eine scheinbar duplizierte Region, die mindestens bis chr4:411.213 reicht. Dabei fiel außerdem auf, dass die Region chr4:419.575-419.677 sowohl in Durchgang 5 als auch in Durchgang 6 negative Ergebnisse brachte. Dies konnte allerdings in Durchgang 7 nicht bestätigt werden. Es gibt keinen konkreten Hinweis für Fehler in diesen Durchgängen.

Ob diese Ergebnisse nun falsch negativ waren oder es sich um eine weitere mögliche Unterbrechung der Duplikation in dem oben definierten Bereich handelt, bleibt an dieser Stelle unklar. Aufgrund der in dieser Region vorkommenden intrachromosomalen segmentalen Duplikationen und Repeatsequenzen wurden keine weiteren Analysen durchgeführt.

Da derzeit keine ausreichenden Informationen zu unserer Unsicherheitsregion chr4:404.726-424.726 zur Verfügung stehen und auch die weitere Real Time Analyse keine verwertbaren Ergebnisse brachte, wurde auf die weiterführende Analyse dieser Region verzichtet. Eine eindeutig definierbare Grenze unserer Duplikation am 5'-Ende unserer zu analysierenden Region konnte also nicht gefunden werden. Die bereits bestehende Unsicherheitsregion chr4:404.726-424.726 bleibt so unverändert.



In der somit exakter definierten, minimal duplizierten Region des Patienten (chr4:424.726-891.905) sind laut OMIM<sup>®</sup> Datenbank also 10 bekannte Gene sicher dupliziert. Über 5 dieser Gene liegen in der OMIM<sup>®</sup> Datenbank Einträge vor, anhand derer eine weitere Einschränkung auf 1 Kandidatengen möglich war.

**Die teilweise bzw. zur Gänze duplizierten Gene sind:**

Über die dick unterlegten existiert ein Eintrag in der OMIM<sup>®</sup>-Datenbank.

- ABCA11P (Position: chr4:409.224-457.998)
- ZNF721 (Position: chr4:423.779-483.442)
- PIGG (Position: chr4:482.989-523.320)
- **PPDE6b (Position: chr4:609.363-654.681)**
- **ATP5I (Position: chr4:656.225-658.127)**
- **MYL5 (Position: chr4:661.711-665.817)**
- MFSD7 (Position: chr4:665.618-672.973) (bislang nur provisorisch auf UCSC<sup>®</sup> vermerkt)
- PCGF3 (Position: chr4:689.573-754.427)
- LOC100129917 (Position: chr4:763.937-765.636)
- **CPLX1 (Position: chr4:768.745-809.945)**
- **GAK ( Position: chr4:833.065-916.174)**

Sämtliche Informationen der folgenden Abschnitte stammen von den Datenbanken des National Center for Biotechnology Information (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) und geben einen Überblick über die bisher zur Verfügung stehenden Informationen.

## **5.1 ABCA11P**

**Lokalisation:** chr4:409.224-457.998

Über dieses Gen liegen derzeit noch wenige Informationen vor. ABCA11P steht für ATP-bindende Domäne, Subfamilie A, Vertreter 11 Pseudogen.

## **5.2 ZNF721**

**Lokalisation:** chr4:423.779-483.442

Bei diesem Gen handelt es sich um das sogenannte Zinkfinger-Protein 721. Die vorhandene Zinkfingerdomäne lässt auf eine Funktion als Transkriptionsfaktor schließen, allerdings sind derzeit keine weiteren Informationen verfügbar

## **5.3 PIGG- Phosphatidylinositol glycan anchor biosynthesis, class G**

**Lokalisation:** chr4:482.989-523.320

PIGG wird auch als GPI (ethanolamine phosphate transferase 2) bezeichnet und ist Teil der Biosynthese des Glycosylphosphatidylinositol-Ankers.

## **5.4 Phosphodiesterase 6b, cGMP spezifisch, ROD, beta; PDE6b**

**Lokalisation:** chr4:609.363-654.681

Die Phosphodiesterase besteht aus drei Untereinheiten (6 alpha, 6 beta und 6 gamma) und löst nach Aktivierung optische Signale in den Photorezeptoren aus. Bei diesem Gen handelt es sich um die beta Untereinheit. Durch die genaue Analyse der Gensequenz von Maus- und Human-PDE-6b, konnten bereits 1993 im humanen PDE-6B-Gen 22 Exons nachgewiesen werden.<sup>25</sup> Im Rahmen zahlreicher Studien an Mäusen wurde die Expression von PDE im Gehirn bewiesen. Homozygote Mutationen in diesem Gen sind verantwortlich für Retinitis Pigmentosa 40.<sup>26</sup>

---

<sup>25</sup> vgl. Khramtsov, N. V., Feshchenko, E. A., Suslova, V. A., Shmukler, B. E., Terpugov, B. E., Rakitina, T. V., Atabekova, N. V., Lipkin, V. M. The human rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit: structural studies of its cDNA and gene. FEBS Lett. 327: 275-278, 1993. [PubMed: 8394243]

<sup>26</sup> vgl. McLaughlin, M. E., Sandberg, M. A., Berson, E. L., Dryja, T. P. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. Nature Genet. 4: 130-134, 1993. [PubMed: 8394174]

## **5.5 ATP-Synthase, $H^+$ -transportierender, mitochondrialer $F_0$ Komplex, Untereinheit E; ATP 5I**

**Lokalisation:** chr4:656.225-658.127

Das ATP5I-Gen kodiert für die „e“ Untereinheit des mitochondrialen ATP-Synthase- $F_0$ -Komplex.<sup>27</sup> Die mitochondriale  $F_1F_0$ -ATP-Synthase erhält ihre Energie aus einem Protonengradienten im Rahmen der ATP Synthese. Es wurden 3 Proteinuntereinheiten e, f und g festgelegt, die mit der  $F_1F_0$  Untereinheit zusammenspielen.<sup>28</sup>

## **5.6 Myosin, Leichtketten 5 abhängig; MYL5**

**Lokalisation:** Position: chr4:661.711-665.817

Dieses Gen kodiert für ein neues Myosin Leichtketten Isoprotein, eine regulatorische Einheit des MLC2 Typs. Eine Expression von MYL5 wurde auch auf der Retina von Erwachsenen, im Kleinhirn, in den Basalganglien und im fetalen Skelettmuskel nachgewiesen.

## **5.7 PCGF3**

**Lokalisation:** chr4:689.573-754.427

Das PCGF3 Gen enthält als Motiv eine RING Finger Domäne vom Typ C3HC4. Dieses Motiv ist verantwortlich für Protein-Protein Interaktionen. Die genaue Funktion des Gens ist allerdings noch nicht vollständig erforscht.

---

<sup>27</sup> vgl. Elliott, T. S., Swartz, D. A., Paisley, E. A., Mangian, H. J., Vissek, W. J., Kaput, J. F1Fo(sic)-ATPase subunit e gene isolated in a screen for diet regulated genes. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 190: 167-174, 1993. [PubMed: 7678489]

<sup>28</sup> vgl. Swartz, D. A., Park, E. I., Vissek, W. J., Kaput, J. The e subunit gene of murine F(1)F(0)-ATP synthase: genomic sequence, chromosomal mapping, and diet regulation. *J. Biol. Chem.* 271: 20942-20948, 1996. [PubMed: 8702853]

## **5.8 LOC100129917**

Lokalisation: chr4:763.937-765.636

Hier handelt es sich um eine hypothetisch nicht kodierende RNA mit derzeit unbekannter Funktion.

## **5.9 Complexin 1; CPLX1**

**Lokalisation:** chr4:768.745-809.945

Bei Complexinen handelt es sich um präsynaptische Proteine, die für die Regulation der Neurotransmitterausschüttung verantwortlich sind. Im Zusammenhang mit einer gestörten Steuerung von Neurotransmittern finden sich schwere neurologische sowie psychiatrische Erkrankungen. So sind auch Erkrankungen wie Mb. Parkinson, Mb. Alzheimer, Schizophrenie, Depressionen und bipolare Störungen mit einem veränderten Spiegel von Complexin 1 in Verbindung zu bringen. Während der sehr komplexen Aufnahme- bzw. Exozytosevorgänge spielt CPLX1 (Synaphin) eine entscheidende Rolle. Es sind lösliche Proteine, die die Funktion des SNARE-Komplexes während der Membranfusion regulieren. Zu Beginn steht die Bildung eines Kernkomplexes (SNARE-Komplex) bestehend aus dem Plasmamembranprotein Syntaxin, dem Protein Synaptobrevin und SNAP 25 (synaptosomal associated protein). SNARE-Komplexe (soluble N-ethylmaleimide-sensitive-factor attachment receptor) spielen eine entscheidende Rolle während der Fusion biologischer Membranen, indem sie zu einer ATP-abhängigen Bindung von NSF führen. Synaptotagmin steuert anschließend die letzten Schritte der Membranfusion vermutlich über  $\text{Ca}^{2+}$ -kanal abhängige Interaktion mit Syntaxin.<sup>29</sup> Complexin bindet an Syntaxin im SNARE-Komplex und verursacht so die Oligomerisierung zu komplexeren Strukturen. Gleichzeitig beinhaltet Complexin ein Peptid, welches kompetitiv diese Oligomerisierung hemmt und steuert auf diese Art und Weise die Funktion der Membranfusion. In zahlreichen Studien wurde gezeigt, dass Mäuse ohne Complexin eine deutlich reduzierte Neurotransmitterausscheidung boten, dass jedoch selbige mit einer Deletion des CPLX2 Gens keinerlei phänotypische Veränderungen aufwiesen.

---

<sup>29</sup> vgl. McMahon, H. T., Missler, M., Li, C., Sudhof, T. C. Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. Cell 83: 111-119, 1995. [PubMed: 7553862]

Deletionen des CPLX1 jedoch verursachten eine schwere Ataxie, wiederkehrende Synkopen und Unfruchtbarkeit sowie den Tod der Mäuse innerhalb der ersten 2-4 Monate. Die Tatsache, dass Mäuse denen entweder CPLX1 oder CPLX2 fehlte 2 Monate überlebten, lässt vermuten, dass CPLX1 und CPLX2 teilweise redundant sind.<sup>30</sup> Die Deletion beider Isoformen führte zum Versterben der Mäuse innerhalb der ersten Stunden nach der Geburt.

Eine homozygote Deletion CPLX1  $-/-$  bei Mäusen verursacht schwerwiegende motorische Defizite, Fehler in Koordination und Gangart, eine Unfähigkeit zu gehen oder zu schwimmen, eine eingeschränkte Funktion im Rotarod Test, reduzierte muskuläre Kraft, Dystonie und Ruhetremor. Neben dem deutlich beeinträchtigten motorischen Phänotyp waren auch abnorme Verhaltensweisen auffällig. So waren auch emotionale Defizite und Aquaphobie aufgetreten. Aufgrund dieser Tatsache wird davon ausgegangen, dass CPLX 1 eine äußerst wichtige Funktion nicht nur für motorische Funktionen hat, sondern durch ihre Verteilung im Hirn auch an anderen komplexen Verhaltensweisen beteiligt ist. Man kam erneut zum Schluss, dass Cplx1-null Mäuse neben einer schweren motorischen Funktionseinschränkung auch in ihrem Sozialverhalten stark beeinträchtigt sind.<sup>31</sup>

## **5.10 Cyclin G assoziierte Kinase; GAK**

**Lokalisation:** chr4:833.065-916.174

Der Zellzyklus aller eukaryontischen Zellen wird durch Cyklin-abhängige Kinasen bestimmt, die ihrerseits von Cyklin und CDK-Inhibitoren durch ein komplexes System von Phosphorylierung/Dephosphorylierung von Seronin/Threonien oder Tyrosin gesteuert werden.

GAK ist ein Interaktionspartner von Cyclin G, das in engem Zusammenhang mit der Funktion des p53 Tumorsupressorgens steht. GAK ist in allen Körperzellen exprimiert, besonders stark allerdings in den Testes.<sup>32</sup>

---

<sup>30</sup> vgl. Reim, K., Mansour, M., Varoqueaux, F., McMahon, H. T., Sudhof, T. C., Brose, N., Rosenmund, C. Complexins regulate a late step in Ca<sup>2+</sup>-dependent neurotransmitter release. Cell 104: 71-81, 2001. [PubMed: 11163241]

<sup>31</sup> vgl. Glynn, D., Drew, C. J., Reim, K., Brose, N., Morton, A. J. Profound ataxia in complexin I knockout mice masks a complex phenotype that includes exploratory and habituation deficits. Hum. Molec. Genet. 14: 2369-2385, 2005. [PubMed: 16000319]

<sup>32</sup> vgl. Kimura, S. H., Tsuruga, H., Yabuta, N., Endo, Y., Nojima, H. Structure, expression, and chromosomal localization of human GAK. Genomics 44: 179-187, 1997. [PubMed: 9299234]

## **5.11 MFSD7**

**Lokalisation:** chr4:665.618-672.973

Die „Major Facilitator Superfamily domain containing 7“ (MFSD7) ist Teil einer Gruppe von Transportproteinen, die über Ionengradienten funktionieren. Die Analyse dieses Gens ist noch nicht abgeschlossen. So sind die Informationen darüber derzeit noch als provisorisch einzustufen.

## 6 Diskussion

Der untersuchte Patient 12002 wies eine therapieresistente Epilepsie sowie ausgeprägte psychomotorische Retardierung bei moderaten Dysmorphien auf. Ein Zusammenhang mit der balancierten Translokation 46,XY,t(8;15)(q22;q13), die sowohl beim Patienten als auch bei dessen Vater nachgewiesen wurde, ist aufgrund der Symptomfreiheit des Vaters eher unwahrscheinlich. Ein gestörtes Imprinting kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, durch welches am Chromosom 15 das Angelman- und das Prader-Willi-Syndrom ausgelöst werden könnte.

Eine durch die Array-CGH nachgewiesene und mittels Real Time PCR auf 487kb eingegrenzte Duplikationsregion auf Chromosom 4 (chr4:424.726-891.905), die nur der Patient, jedoch keiner der untersuchten Blutsverwandten aufwies, ist höchstwahrscheinlich die Ursache des schwerwiegenden Befundes des Patienten 12002.

Ziel der Arbeit war es, auf Basis einer detaillierteren Eingrenzung der Duplikationsregion die einzelnen, betroffenen Gene zu diskutieren sowie mögliche Kandidatengene zu identifizieren, um genaueren Aufschluss über die Ursachen der Erkrankung auf genetischer Ebene zu erhalten.

Die Real Time PCR weist als zentrale Methode dieser Arbeit eine Reihe von potenziellen Einschränkungen auf. Dazu zählen unter anderem das Auftreten von unspezifischen Primerprodukten, falsch negative oder positive Ergebnisse, sowie eine mögliche Kontamination der Proben. Letztere ist ein Beispiel von „human error“: „die menschliche Fehlerquelle“ wird u.a. auch von Mark A. Valasek and Joyce J. Repa<sup>33</sup> als zentrale Problematik bei der Anwendung von Real Time PCR angeführt. Da der menschliche Faktor naturgemäß nicht ausgeschlossen werden kann, gilt es, die Ergebnisse einer Real Time PCR Analyse stets kritisch zu hinterfragen. Dennoch ist sie mit ihrer hohen Sensitivität und Spezifität, ihrem relativ geringen Kostenaufwand und ihrer zeitnahen Anwendungsmöglichkeit ein wertvolles Instrument und zentrales Werkzeug in der genetischen Diagnostik.

---

<sup>33</sup> vgl. Mark A. Valasek and Joyce J. Repa, The power of real-time PCR, Advances in physiology education; April 2005

Anhand dieser Methode gelang es, die durch die Array-CGH noch unklaren Bereiche rund um die Minimalregion definitiv der duplizierten oder der nicht duplizierten Region zuzuordnen.

**Folgende Gene liegen gänzlich oder zumindest teilweise in der duplizierten Region:**

- *ABCA11P* (Position: chr4:409.224-457.998) teilweise dupliziert
- *ZNF721* (Position: chr4:423.779-483.442) teilweise dupliziert
- *PIGG* (Position: chr4:482.989-523.320)
- *PDE6b* (Position: chr4:609.363-654.681)
- *ATP5I* (Position: chr4:656.225-658.127)
- *MYL5* (Position: chr4:661711-665817)
- *MFSD7* (Position: chr4:665.618-672.973)
- *PCGF3* (Position: chr4:689.573-754.427)
- *LOC100129917* (Position: chr4:763.937-765.636)
- *CPLX1* (Position: chr4:768.745-809.945)
- *GAK* (Position: chr4:833.065-916.174) teilweise dupliziert

**Von der Duplikation nicht betroffen sind folgende Gene der 3'-Unsicherheitsregion:**

- *TMEM175* (Position: chr4:916.262-942.443)
- *DGKQ* (Position: chr4:942.675-957.344)

Die Beteiligung dieser Gene konnte durch die weitere Eingrenzung der Duplikation am 3'-Ende ausgeschlossen werden.

Eine Eingrenzung ist damit besonders im Hinblick auf das 3'-Ende der Duplikationsregion ausreichend gelungen. Am 5'-Ende war aufgrund der Komplexität durch in der Region vorhandene segmentale Duplikationen und Repeatsequenzen eine weitere Spezifizierung der Duplikationsregion mit der von uns gewählten Methode der Real Time PCR nicht möglich. Segmentale Duplikationen und Repeatsequenzen stehen im Zusammenhang mit einer erhöhten Wahrscheinlichkeit für ein nicht homologes crossing-over und so für die Entstehung von Duplikationen und könnten so am 5'-Ende auch der

Entstehungsmechanismus der beschriebenen Duplikation sein. Die beiden Gene in der 5' - Unsicherheitsregion reichen zumindest teilweise in die sicher duplizierte Minimalregion und sind somit auch durch die Duplikation betroffen.

Es ist davon auszugehen, dass die Duplikation eines oder mehrerer der zuvor erwähnten Gene Auswirkungen auf das Krankheitsbild des Patienten hat. Eine Duplikation führt in der Regel zu einer partiellen strukturellen Trisomie der sich in der Region befindlichen Gene. Je nachdem ob es sich um ein imprintiertes oder ein nichtimprintiertes Gen handelt, kann es so zu einer funktionellen Disomie oder Trisomie kommen. Beim Einbau der so duplizierten Genabschnitte unterscheidet man nun den Einbau als Tandem (gleiche Sequenz direkt hintereinander), invers-Tandem (gleiche Sequenz „Kopf an Kopf“) sowie den Einbau der Sequenz an einem anderen Ort am gleichen Chromosom oder einem anderem Chromosom was beides zur Unterbrechung von Genen in der „Einbauregion“ und damit zu einer Haploinsuffizienz führen kann. Diese Frage kann im Rahmen einer für die spezifische Region durchgeführte FISH Analyse beantwortet werden, welche aber nicht Teil dieser Arbeit war.

Eine Abschätzung der Genotyp-Phänotypen Korrelation ist nur bedingt möglich, da über einige der angeführten Gene derzeit noch zu wenige Informationen vorliegen. Über die bislang zumindest teilweise erforschten Gene können jedoch folgende Aussagen getroffen werden:

Homozygote Mutationen im PDE6b Gen (Position: chr4:609.363-654.681) stehen im Zusammenhang mit Retinitis Pigmentosa Typ 40. Das ATP5I Gen (Position: chr4:656.225-658.127) kodiert für einen Baustein der ATP-Synthase. Das MYL5 Gen (Position: chr4:661711-665817) kodiert für Myosin, welches in zahlreichen zellulären Abläufen eine zentrale Rolle spielt (z.B. bei Zytokinese und Sarkomerkontraktion).

Das vom CPLX1 Gen (Position: chr4:768.745-809.945) kodierte Complexin ist für die Regulation der Neurotransmitterausschüttung verantwortlich. Es ist ein wichtiger Teil komplexer Aufnahme- bzw. Exozytosevorgänge und steuert  $Ca^{2+}$ -abhängig die letzten Schritte der Membranfusion. Eine gestörte Funktion derselben wird mit dem Auftreten schwerer neurologischer sowie psychiatrischer Erkrankungen assoziiert (Mb. Parkinson, Mb. Alzheimer, Schizophrenie, Depressionen und bipolare Störungen).

So fand man heraus, dass die Expression von CPLX1 bei Patienten mit ebendiesen Erkrankungen signifikant verändert ist. Untersuchungen an Mäusen haben ergeben, dass eine komplette Deletion des Complexin 1 Gens schwere Ataxie, wiederkehrende Synkopen und Unfruchtbarkeit sowie den Tod der Mäuse innerhalb der ersten 2-4 Monate verursacht.<sup>34</sup> Es wird davon ausgegangen, dass Complexin 1 nicht nur für motorische Funktionen eine wichtige Rolle spielt, sondern durch seine Verteilung im Hirn auch an anderen komplexen Verhaltensweisen beteiligt ist. So scheint auch die soziale Interaktion deutlich beeinträchtigt, was im Tierversuch durch erhöhte Ängstlichkeit und gesteigerte Aggressivität zum Ausdruck kommt.<sup>35</sup> Veränderungen des CPLX1 Levels wurden auch bei einer Reihe anderer Erkrankungen beobachtet, unter anderem bei Wernicke Enzephalopathie, Alkoholismus und beim fetalen Alkoholsyndrom. Es konnte bislang allerdings nicht letztgültig geklärt werden, ob der veränderte CPXL1 Spiegel die Ursache oder eine Auswirkung dieser Krankheitsbilder ist.

Ein weiteres in der OMIM<sup>®</sup> Datenbank aufgeführtes Gen ist das GAK Gen (Position: chr4:833.065-916.174). Cyklin-abhängige Kinasen sind ein zentraler Faktor im Zellzyklus aller eukaryontischer Zellen. Der Interaktionspartner von GAK Cyclin G steht in engem Zusammenhang mit der Funktion des p53 Tumorsuppressorgens.

Unter den oben genannten Genen gibt es diverse potenzielle Überschneidungen mit dem Phänotyp des Patienten 12002. Auffällig schienen aber die zahlreichen Übereinstimmungen der Beschreibung des CPLX1 Gens mit dem Phänotypen des Patienten 12002. Eine Duplikation des CPLX1 Gens könnte mit einer Funktionsstörung der Neurotransmitterausschüttung einhergehen, welcher in der Pathophysiologie der Epilepsie eine tragende Funktion zukommt. Weitere Übereinstimmungen beziehen sich auf die motorische Beeinträchtigung des Patienten, hier sei besonders das ataktische Gangbild und hervorgehoben. Versuche an Mäusen beschrieben weiter eine muskuläre Hypotonie, deutliche Beeinträchtigung der Koordination, sowie ein auffälliges Sozialverhalten.

---

<sup>34</sup> vgl. Reim, K., Mansour, M., Varoqueaux, F., McMahon, H. T., Sudhof, T. C., Brose, N., Rosenmund, C. Complexins regulate a late step in Ca<sup>2+</sup>-dependent neurotransmitter release. *Cell* 104: 71-81, 2001. [PubMed: 11163241]

<sup>35</sup> vgl. Drew, C. J. G., Kyd, R. J., Morton, A. J. Complexin 1 knockout mice exhibit marked deficits in social behaviours but appear to be cognitively normal. *Hum. Molec. Genet.* 16: 2288-2305, 2007. [PubMed: 17652102]

Sowohl die beschränkte Koordinationsfähigkeit, als auch eine deutliche Einschränkung in der Ausübung eines normales Sozialverhaltens sind im Rahmen der Entwicklungsretardierung Teil des Krankheitsbildes des Patienten 12002.

Dies könnte das CPLX1 durchaus zu einem möglichen Kandidatengen machen. Eine eindeutige Zuordnung eines Gens zum Phänotypen des Patienten ist letztgültig jedoch nicht möglich, da auch andere, noch nicht gänzlich erforschte Gene eine wichtige Rolle in der Genotyp-Phänotyp-Korrelation spielen könnten.

## 7 Literaturverzeichnis

- ALBERTS B., 2001. Lehrbuch der Molekularen Zellbiologie, 2. Auflage Wiley-VCH
- BROWN, T.A., 1999. Moderne Genetik, 2. Auflage. Spektrum Akad. Verlag
- BUSELMAIER, Werner, 2007. Biologie für Mediziner, 10. Auflage. Springer Verlag
- BUSELMAIER, Werner, 2009. Biologie für Mediziner, 11. Auflage. Springer Verlag
- CHEN, Harold, 2006. Atlas auf genetic diagnosis and counseling, 1. Auflage. Humana Press
- DATENBANKEN DES NATIONAL CENTER FOR BIOTECHNOLOGY INFORMATION: (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) sowie der CHARITÉ UNIVERSITÄTSMEDIZIN BERLIN: <http://genetik.charite.de/institut/>,
- DESMOND S.T., Nicholl, 2002. Gentechnische Methoden, 2. Auflage. Spektrum Akad. Verlag
- Drew, C. J. G., Kyd, R. J., Morton, A. J., 2007. Complexin 1 knockout mice exhibit marked deficits in social behaviours but appear to be cognitively normal. Hum. Molec. Genet. 16: 2288-2305 [PubMed: 17652102]
- ELLIOTT, T. S., Swartz, D. A., Paisley, E. A., Mangian, H. J., Visek, W. J., Kaput, J., 1993. F1Fo(sic)-ATPase subunit e gene isolated in a screen for diet regulated genes. Biochem. Biophys. Res. Commun. 190: 167-174 [PubMed: 7678489]
- GLYNN, D., Drew, C. J., Reim, K., Brose, N., Morton, A. J., 2005. Profound ataxia in complexin I knockout mice masks a complex phenotype that includes exploratory and habituation deficits. Hum. Molec. Genet. 14: 2369-2385 [PubMed: 16000319]
- GREHL, H., 2008. Checkliste Neurologie, 4. Auflage Thieme Verlag
- HIRSCH-KAUFMANN, M., SCHWEIGER, M. und SCHWEIGER, M.-R., 2009. Biologie und molekulare Medizin für Mediziner und Naturwissenschaftler, 7. Auflage. Thieme Verlag
- HOF H., DÖRRIES R., 2009. Medizinische Mikrobiologie, 4. Auflage Thieme Verlag
- HUFSCHMIDT, A, 2009. Neurologie compact, 5. Auflage Thieme Verlag
- KHRAMTSOV, N. V., Feshchenko, E. A., Suslova, V. A., Shmukler, B. E., Terpugov, B. E., Rakitina, T. V., Atabekova, N. V., Lipkin, V. M., 1993. The human rod photoreceptor cGMP phosphodiesterase beta-subunit: structural studies of its cDNA and gene. FEBS Lett. 327: 275-278 [PubMed: 8394243]
- KIMURA, S. H., Tsuruga, H., Yabuta, N., Endo, Y., Nojima, H., 1997. Structure, expression, and chromosomal localization of human GAK. Genomics 44: 179-187 [PubMed: 9299234]
- KNIPPERS R., 2006. Molekulare Genetik, 9. Auflage Thieme Verlag
- MCLAUGHLIN, M. E., Sandberg, M. A., Berson, E. L., Dryja, T. P., 1993. Recessive mutations in the gene encoding the beta-subunit of rod phosphodiesterase in patients with retinitis pigmentosa. Nature Genet. 4: 130-134 [PubMed: 8394174]

MCMAHON, H. T., Missler, M., Li, C., Sudhof, T. C., 1995. Complexins: cytosolic proteins that regulate SNAP receptor function. *Cell* 83: 111-119 [PubMed: 7553862]

NIESCHLAG, BEHRE, NIESCHLAG, 2009. *Andrologie, Grundlagen und kliniken der reproduktiven Gesundheit des Mannes*, 3. Auflage. Springer Verlag

RINGO, John, 2006. *Genetik kompakt*, 1. Auflage. Spektrum Akad. Verlag

SCHÜTZENBERGER S, FLAMENT H et al., *Journal für Neurologie, Neurochirurgie und Psychiatrie*, 2002; 3 (2), 57-58

SCHWARZBRAUN T., Ullmann, R., Schubert, M., Ledinegg, M., Ofner, L., Windpassinger, C., Wagner, K., Kroisel, P.M., Petek, E.; 2006. Characterization of a de novo complex chromosome rearrangement (CCR) involving chromosomes 2 and 12, associated with mental retardation and impaired speech development, *Cytogenetic Genome Research*;115:84-89  
sowie der Medizinischen Hochschule Hannover: <http://www.mh-hannover.de/8436.html>

SWARTZ, D. A., Park, E. I., Visek, W. J., Kaput, J., 1996. The e subunit gene of murine F(1)F(0)-ATP synthase: genomic sequence, chromosomal mapping, and diet regulation. *J. Biol. Chem.* 271: 20942-20948 [PubMed: 8702853]

VALASEK M., REPA J.,2005. *Advances in physiology education* 29, The power of real-time PCR, 151-159

## 8 Anhang

### Real Time PCR Protokoll 7500

#### 1) DNA vermessen

Patienten-DNA vermessen und anschließend aliquot herausnehmen in Eppendorftube. (ausreichend um 50 ng/Reaktion einzusetzen), evtl. mit Wasser verdünnen auf eine Konzentration von ca. 50 ng/μl.

DNA bei 95°C für 15 min im Thermomixer hitzedenaturieren (DNA wird zerstückelt) und nochmals vermessen.

#### 2) Real Time PCR Ansatz mit SYBR Green

Pro Amplikon zwei Ansätze um Fehler auszugleichen. Jedes Amplikon muss mit einer Kontroll-DNA mitamplifiziert werden um Referenzwerte zu bekommen.

Pro 20μl Ansatz:

- 10 μl SYBR Green
- 1μl Primer (Konzentration: 10 μM)
- X μl DNA (so genau wie möglich 50 ng)
- Y μl H<sub>2</sub>O (auf 20 μl auffüllen)

Es ist sinnvoll mit jedem Patienten (und der Kontrolle) einen eigenen Mastermix anzurichten und die Primer dann dazuzupipettieren.

#### 3) Real Time PCR

- ABI Prism 7500 Software öffnen
- Template laden
- Dort dann die Belegung umstellen und unter „Speichern unter“ speichern.
- Start Run gehen