

**Molekulargenetische Untersuchung des
Okulo-Aurikulo-Vertebralen Spektrums (OAVS)**

Inaugural-Dissertation

zur
Erlangung des Doktorgrades
Dr. rer. nat.
des Fachbereichs
Biologie und Geographie
an der
Universität Duisburg-Essen

vorgelegt von
Sven Fischer

aus Essen

April 2006

Die der vorliegenden Arbeit zugrunde liegenden Experimente wurden am Institut für Humangenetik am Universitätsklinikum Essen der Universität Duisburg-Essen durchgeführt.

1. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. B. Horsthemke

2. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. H. Esche

3. Gutachter: Prof. Dr. rer. nat. G. Scherer

Vorsitzender des Prüfungsausschusses: Prof. Dr. rer. nat. B. Opalka

Tag der mündlichen Prüfung: 16.08.2006

für julia

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in den unten aufgeführten Artikeln publiziert:

Fischer S, Lüdecke HJ, Wieczorek D, Böhringer S, Gillessen-Kaesbach G, Horsthemke B.

Histone acetylation dependent allelic expression imbalance of *BAPX1* in patients with the oculo-auriculo-vertebral spectrum

Hum Mol Genet. 2006 Feb 15;15(4):581-587.

Tasse C, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke HJ, Albrecht B, Horn D, Janecke A, Kling R, König R, Lorenz B, Majewski F, Maeyens E, Meinecke P, Mitulla B, Mohr C, Preischl M, Umstadt H, Kohlhase J, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D.

Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS): clinical evaluation and severity scoring of 53 patients and proposal for a new classification

Eur J Med Genet. 2005 Oct-Dec;48(4):397-411.

Teber OA, Gillessen-Kaesbach G, Fischer S, Böhringer S, Albrecht B, Albert A, Arslan-Kirchner M, Haan E, Hagedorn-Greiwe M, Hammans C, Henn W, Hinkel GK, König R, Kunstmann E, Kunze J, Neumann LM, Prott EC, Rauch A, Rott HD, Seidel H, Spranger S, Sprengel M, Zoll B, Lohmann DR, Wieczorek D.

Genotyping in 46 patients with tentative diagnosis of Treacher Collins syndrome revealed unexpected phenotypic variation

Eur J Hum Genet. 2004 Nov;12(11):879-890.

Tasse C, Majewski F, Böhringer S, Fischer S, Lüdecke HJ, Gillessen-Kaesbach G, Wieczorek D.

A family with autosomal dominant Oculo-Auriculo-Vertebral Spectrum (OAVS)

Clin Dysmorphol, in press

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis		I-III
Abbildungsverzeichnis		IV
Tabellenverzeichnis		V
Abkürzungsverzeichnis		VI
1.	Einleitung	1
<hr/>		
1.1	Das Okulo-Aurikulo-Vertebrale Spektrum (OAVS, OMIM %164210)	1
1.1.1	Mögliche allelische Fehlbildungssyndrome zum OAVS	4
1.1.1.1	<i>Treacher Collins-Syndrom (TCS, OMIM #154500)</i>	4
1.1.1.2	<i>Branchio-Oto-Renale Dysplasie (BOR, OMIM #113650)</i>	5
1.1.1.3	<i>Townes-Brocks-Syndrom (TBS, OMIM #107480)</i>	5
1.2	Embryonalentwicklung des Gesichts	6
1.3	Das Kandidatengen <i>BAPX1</i>	9
1.3.1	<i>bagpipe</i> -Homologe im Krallenfrosch und im Zebrafisch	10
1.3.2	<i>bagpipe</i> -Homologe im Huhn und in der Maus	11
1.3.2.1	<i>Die Expression von Nkx3.2/Bapx1</i>	11
1.3.2.2	<i>Das genetische Netzwerk von Nkx3.2/Bapx1</i>	12
1.3.2.3	<i>Die Funktion von Nkx3.2/Bapx1</i>	13
1.4	Transkriptionsregulation über DNA-Methylierung und Histonmodifikation	15
1.4.1	DNA-Methylierung	15
1.4.2	Histonacetylierung/deacetylierung	16
2.	Zielsetzung	17
<hr/>		
3.	Material und Methoden	18
<hr/>		
3.1	Arbeiten mit DNA und RNA	18
3.1.1	DNA-Präparation aus Leukozyten und kultivierten primären Fibroblasten	18
3.1.2	RNA-Präparation aus Blut und Mundschleimhaut	19
3.1.3	RNA-Präparation aus kultivierten primären Fibroblasten	20
3.1.4	DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR)	21
3.1.5	Qualitative Expressionsanalyse	22
3.1.6	Aufreinigung von PCR- und RT-PCR-Produkten	23
3.1.6.1	<i>Aufreinigung mittels „MultiScreen₉₆ PCR Plate“</i>	23
3.1.6.2	<i>Aufreinigung mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“</i>	23
3.1.7	Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösung	24

3.1.8	Gelelektrophorese	24
3.1.8.1	<i>Gelelektrophorese mit MetaPhor Agarose (Cambrex)</i>	25
3.1.9	Sequenzierung von DNA	25
3.1.10	Quantitative Analyse des allelischen Transkriptverhältnisses	26
3.1.11	Aufreinigung von Sequenzierungsreaktions- und SNaPshot-Produkten	26
3.1.12	Quantitative Expressionsanalyse	27
3.1.13	Bisulfit-Behandlung von genomischer DNA	28
3.1.14	Ligation	29
3.2	Arbeiten mit Bakterien	30
3.2.1	Herstellung kompetenter Bakterien	30
3.2.2	Transformation kompetenter Bakterien	31
3.2.3	Plasmid-Präparation (MINI Pröp)	32
3.3	Arbeiten mit kultivierten primären Fibroblasten	32
3.3.1	Kultivieren von primären Fibroblasten	32
3.3.1.1	<i>Ansetzen einer primären Fibroblastenkultur</i>	32
3.3.1.2	<i>Passagieren von kultivierten primären Fibroblasten</i>	33
3.3.1.3	<i>Ernte von kultivierten primären Fibroblasten für DNA und RNA Präparation</i>	33
3.3.1.4	<i>Einfrieren und Lagerung von kultivierten primären Fibroblasten</i>	33
3.3.1.5	<i>Auftauen von kultivierten primären Fibroblasten</i>	34
3.3.2	Inhibitor Experimente mit kultivierten primären Fibroblasten	34
4.	Ergebnisse	36
4.1	Mutationsanalyse in Genen möglicher allelischer Krankheitsbilder	36
4.1.1	Mutationsanalyse im <i>TCOF1</i> -Gen	36
4.1.2	Mutationsanalyse im <i>EYA1</i> -Gen	38
4.2	Mutationsanalyse in Kandidatengenen auf Chromosom 4p15	39
4.2.1	Mutationsanalyse im <i>RAB28</i> -Gen	39
4.2.2	Mutationsanalyse im <i>BAPX1</i> -Gen	40
4.3	Expressionsanalyse des <i>BAPX1</i> -Gens	42
4.3.1	Qualitative Expressionsanalyse des <i>BAPX1</i> -Gens	42
4.3.2	Quantitative Expressionsanalyse des <i>BAPX1</i> -Gens	46
4.3.2.1	<i>Quantitative Analyse des Transkriptverhältnisses</i>	46
4.3.2.2	<i>Quantitative Analyse der Transkriptmenge</i>	50
4.4	Promotor-Analysen des <i>BAPX1</i> -Gens	52
4.4.1	Mutationsanalyse im Promotor des <i>BAPX1</i> -Gens	52
4.4.2	Methylierungsuntersuchung der 5'-CpG-Insel des <i>BAPX1</i> -Gens	54

4.5	Untersuchung epigenetischer Transkriptionsregulation	57
5.	Diskussion	59
5.1	Kandidatengene möglicher allelischer Fehlbildungssyndrome	59
5.2	Positionelle und funktionelle Kandidatengene	59
5.2.1	Das <i>RAB28</i> -Gen	59
5.2.2	Das <i>BAPX1</i> -Gen	60
5.3	Expressionsanalyse von <i>BAPX1</i>	63
5.3.1	Untersuchung des allelischen Transkriptverhältnisses	63
5.3.2	Segregationsanalyse des verschobenen Transkriptverhältnisses	65
5.3.3	Analyse der Transkriptmenge von <i>BAPX1</i>	66
5.3.4	Untersuchungen mit Inhibitoren epigenetischer Transkriptionsregulatoren	67
5.4	Ausblick, allgemeine Diskussion und Fazit	70
6.	Zusammenfassung	75
Referenzen		76
Anhang		85

Abbildungsverzeichnis

1.	Einleitung	1
	Abbildung 1.1	6
	Abbildung 1.2	7
	Abbildung 1.3	12
4.	Ergebnisse	36
	Abbildung 4.1	41
	Abbildung 4.2	42
	Abbildung 4.3	43
	Abbildung 4.4	44
	Abbildung 4.5	45
	Abbildung 4.6	47
	Abbildung 4.7	48
	Abbildung 4.8	48
	Abbildung 4.9	51
	Abbildung 4.10	53
	Abbildung 4.11	54
	Abbildung 4.12	55
	Abbildung 4.13	56
	Abbildung 4.14	57
5.	Diskussion	59
	Abbildung 5.1	61

Tabellenverzeichnis

4.	Ergebnisse	36
	Tabelle 4.1	37
	Tabelle 4.2	38
	Tabelle 4.3	39
	Tabelle 4.4	40
	Tabelle 4.5	46
	Tabelle 4.6	47

Abkürzungsverzeichnis

%	Prozent (Hundertstel)	RNA	"ribonucleic acid" (Ribonukleinsäure)
®	amtlich registriertes Markenzeichen	rpm	"rounds per minute" (Umdrehung pro Minute)
°C	Grad Celsius	RT	Raumtemperatur
µg	Mikrogramm	RT	reverse Transkription
µl	Mikroliter	RT	"real time" (Echtzeit)
5-Aza-dC	5-Aza-2-desoxycytidin	s	Sekunde
BOR	Branchio-Oto-Renale Dysplasie	SDS	Sodiumdodecylsulfat
bp	Basenpaar	SNP	"single nucleotide polymorphism" (Einzelbasenaustausch)
cDNA	„complementary DNA“ (komplementäre DNA)	t	Translokation
cm ²	Quadratzentimeter	TAE	Tris-Acetat-EDTA
CpG	CG-Basenpaar	TBE	Tris-Borat-EDTA
dATP	2-Desoxyadenosin-5-triphosphat	TBS	Townes-Brocks-Syndrom
dCTP	2-Desoxycytidin-5-triphosphat	TCS	Treacher Collins-Syndrom
del	Deletion	TM	"trademark" (unregistriertes Markenzeichen)
dGTP	2-Desoxyguanosin-5-triphosphat	TSA	Trichostatin A
DKFZ	deutsches Krebsforschungszentrum	U	"unit" (Einheit)
DMF	Dimethylformamid	UTR	Untranslatierte Region
DMSO	Dimethylsulfoxid	v	"volume" (Volumen)
DNA	"deoxyribonucleic acid" (Desoxyribonukleinsäure)	var	Variation
DNMT	DNA-Methyltransferase	w	"weight" (Gewicht)
dNTP	2-Desoxynukleosid-5-triphosphat	W	Watt
dTTP	2-Desoxythymidin-5-triphosphat	wt	Wildtyp
dup	Duplikation	X-Gal	5-Bromo-4-Chloro-3-Indoxyl-β- D-Galaktopyranosid
EDTA	"ethylene diamine tetraacetic acid" (Ethylendiamintetraessigsäure)	λ	Lambda (Symbol der Wellenlänge)
ESE	"exonic splice enhancer" (exonischer Spleißverstärker)		
<i>et al.</i>	"et alteri" / "et alterae" (und weitere m / w)		
g	Gramm		Für die Bedeutung der abgekürzten Gennamen siehe unter http://www.gene.ucl.ac.uk/nomenclature/
g	"gravitation" (Erdbeschleunigung)		
h	"hora" (Stunde)		Für die Abkürzungen von Nukleotiden und Aminosäuren siehe unter diesen Stichworten z.B. unter http://de.wikipedia.org/wiki/Hauptseite
HAT	Histonacetyltransferase		
HDAC	Histondeacetylase		
inHg	"inch hydrargyrum" (inch Quecksilbersäule)		
kb	Kilobase		
M	Molar (Mol pro Liter)		
min	Minute		
ml	Milliliter		
mRNA	"messenger RNA" (Boten-RNA)		
nm	Nanometer		
NMD	„nonsense-mediated mRNA decay“ (Unsinn-vermittelter mRNA-Abbau)		
OAVS	Okulo-Aurikulo-Vertebrales Spektrum		
OMIM	"online mendelian inheritance in man"		
p	"petit" (kurzer Arm)		
P	Patient		
p	"probability" (Wahrscheinlichkeit)		
PBS	"phosphate buffered saline" (Phosphat gepufferte Kochsalzlösung)		
PCR	"polymerase chain reaction" (Polymerasekettenreaktion)		
pH	"potentia Hydrogenii" (Kraft des Wasserstoffs)		
q	"queue" (langer Arm)		

1. Einleitung

1.1 Das Okulo-Aurikulo-Vertebrale Spektrum (OAVS, OMIM %164210)

Das Okulo-Aurikulo-Vertebrale Spektrum (OAVS), unter dem das Goldenhar-Syndrom und die hemifaziale Mikrosomie zusammengefasst werden, ist ein heterogenes, klinisch sehr variables Krankheitsbild, dessen genetische Ursachen noch nicht geklärt sind.

Die hemifaziale Mikrosomie ist charakterisiert durch Entwicklungsstörungen der Ohren, des Mundes und des Unterkiefers (Gorlin *et al.*, 1963). Die Fehlbildungen betreffen in der Regel die Derivate des ersten und zweiten Schlundbogens. Etwa 400 bisher beschriebene Fälle von OAVS zeigen, dass das klinische Spektrum von einer sehr milden Ausprägung, gekennzeichnet durch das isolierte Vorliegen einer Mikrotie, bis hin zu einer schweren Form reicht, die charakterisiert ist durch Anotie, Makrostomie und Hypoplasie des Unterkiefers (Bennun *et al.*, 1985; Llano-Rivas *et al.*, 1999). Als Variante hiervon wurde ursprünglich das Goldenhar-Syndrom abgegrenzt, das durch das zusätzliche Vorkommen von Wirbelkörperanomalien und epibulbären Tumoren definiert wurde (Goldenhar, 1952).

Gorlin fasste die ursprünglich als getrennte Entitäten beschriebene hemifaziale Mikrosomie und das Goldenhar-Syndrom unter dem Oberbegriff Okulo-Aurikulo-Vertebrales Spektrum (OAVS) zusammen (Gorlin, 1991). Die Inzidenz bei Lebendgeborenen wird mit 1/5.600 angegeben (Gorlin, 2001). Das Verhältnis männlich zu weiblich beträgt 3:2 (Rollnick *et al.*, 1987).

Die Vielzahl der in der Literatur nicht einheitlich verwendeten Begriffe für die unterschiedlich ausgeprägten Manifestationen von OAVS kennzeichnen das breite Spektrum dieser Entwicklungsstörung. So sind als synonym verwendete Begriffe Okulo-Aurikulo-Vertebrale Dysplasie, "first and second branchial arch syndrome", laterale faziale Dysplasie, unilaterale kraniofaziale Mikrosomie und die otomandibuläre Dysostose zu nennen (Cohen *et al.*, 1989). Eine Festlegung der minimalen Diagnosekriterien und ein Bewertungssystem für die klinischen Manifestationen beim OAVS sowie eine Klassifizierung der Patienten entsprechend ihrer klinischen Zeichen wurden von Tasse *et al.* vorgeschlagen (Tasse *et al.*, 2005).

Typische klinische Zeichen des Okulo-Aurikulo-Vertebrales Spektrums sind eine faziale Asymmetrie bei 65% der Patienten (Smahel, 1986). Eine bilaterale Betroffenheit des Gesichts zeigen 10-33% der Patienten (Grabb, 1965). Ein Drittel der Patienten hat eine Gesichtsspalte (Gorlin, 2001). Augenanomalien sind ebenfalls typisch für das OAVS. Mikrophthalmie, Anophthalmie und epibulbäre Tumoren sind häufig beschriebene Auffälligkeiten bei Patienten mit OAVS (Mansour *et al.*, 1985). Bei den epibulbären Tumoren

handelt es sich bei 50% um unilaterale epibulbäre Dermoide, bei 25% um bilaterale Dermoide und bei 25% um Lipodermoide, die häufiger bilateral als unilateral vorkommen (Baum & Feingold, 1973). Unilaterale Kolobome des Oberlids werden ebenfalls beschrieben (Rollnick *et al.*, 1987). Bei etwa 65% der Patienten finden sich Ohranomalien, die von mild dysplastischen Ohren bis hin zur Anotie reichen können (Rollnick & Kaye, 1983). Bei über 50% der Patienten finden sich Hörstörungen, wobei Schalleitungsstörungen häufiger sind als Schallempfindungsstörungen (Bassila & Goldberg, 1989). Präaurikuläre Anhängsel sind häufig und können unilateral oder bilateral vorkommen. Wirbelkörperanomalien findet man bei ca. 22% der Patienten mit OAVS (Llano-Rivas *et al.*, 1999).

Weitere Fehlbildungen, die beim OAVS auftreten, sind Hydrozephalus, Lipome, Dermoidzysten, Teratome, Arachnoidalzysten, Holoprosenzephalie sowie innere Fehlbildungen (pulmonale Hypoplasien, tracheo-oesophageale Fisteln, Nierenagenesien, Hydronephrosen, Doppelanlagen der Ureteren, Herzfehler) (Morrison *et al.*, 1992). Radiale Defekte im Rahmen von verkürzten Unterarmen und hypoplastischen bzw. triphalangealen Daumen wurden ebenfalls beim Goldenhar-Syndrom beschrieben (Moeschler & Clarren, 1982).

Bezüglich der Ätiologie/Pathogenese werden verschiedene Hypothesen diskutiert (Setzer *et al.*, 1981). Die häufig einseitig auftretenden Veränderungen deuten auf eine Fehlentwicklung in der Embryogenese hin, die durch externe Einflüsse auf einzelne Bereiche der Wachstumszonen entstanden sein könnten. Poswillo zeigte in einem Tiermodell, dass eine frühe Disruption von Blutgefäßen mit Hämatomformation *in utero* zu einer Destruktion von verschiedenen Geweben der Ohren- und Gesichtsregion führte (Poswillo, 1973). Als weitere Ursache wird eine Überreife der Eizellen zum Zeitpunkt der Befruchtung diskutiert ("Overripeness Ovopathy", Jongbloet, 1987). OAVS erfüllt die von Jongbloet aufgestellten Kriterien, nach denen eine Krankheit durch die Befruchtung überreifer Eizellen hervorgerufen werden könnte. Diese umfassen sporadisches Auftreten der Krankheit, Diskordanz bei monozygoten Zwillingen, multiple Anomalien, unspezifische Chromosomenanomalien, Fertilitätsstörungen der Mutter, Risikoschwangerschaft und Komplikationen während der Schwangerschaft, der Geburt und dem frühkindlichen Leben. Opitz hingegen stellte die Hypothese auf, dass der Unterkiefer, das Jochbein und die Mittelohrstrukturen ein "developmental field" darstellen. Im Falle einer abnormen Entwicklung einer dieser Strukturen, werden auch die anderen Strukturen in Mitleidenschaft gezogen und zeigen ebenfalls einen Entwicklungsdefekt (Opitz, 1982).

OAVS wurde auch bei Kindern von Müttern mit Diabetes mellitus (Ewart-Toland *et al.*, 2000; Grix, 1982) und nach Einnahme von Thalidomid (Miehlke & Partsch, 1963; Rosenal, 1965), Primidon (Gustavson & Chen, 1985) oder Retinolsäure (Lammer *et al.*, 1985; Mounoud *et al.*, 1975) in der Schwangerschaft beobachtet.

Bei den meisten Zwillingsbeobachtungen im Zusammenhang mit OAVS handelt es sich um diskordante monozygote Zwillinge (Boles *et al.*, 1987; Burck, 1983; Ryan *et al.*, 1988). Nur zwei der 14 beschriebenen monozygoten Zwillingspaare sind konkordant für die hemifaziale Mikrosomie (Schweckendiek *et al.*, 1976; ter Haar, 1972). Diese Beobachtungen sind insofern interessant, als dass sie eine einfache, mendelnde Vererbung ausschließen. Jedoch wurden auch familiäre Fälle berichtet, die einem autosomal dominanten (Araneta *et al.*, 1997; Regenbogen *et al.*, 1982; Rollnick & Kaye, 1983; Stoll *et al.*, 1998; Summitt, 1969) wie auch einem autosomal rezessiven Erbgang folgen (Krause, 1970). Der Anteil an familiären Fällen wird mit 10% angenommen (Tasse *et al.*, 2005).

Chromosomenanomalien wurden ebenfalls in Verbindung mit OAVS beobachtet. Greenberg *et al.* fanden bei vier von 11 untersuchten Patienten mit OAVS eine Chromosomenanomalie (Trisomie 18, Ring-Chromosom 21, del(22)(q13.31) und Monosomie 6q) (Greenberg *et al.*, 1988). Weitere beschriebene Chromosomenanomalien sind unter anderem dup(7q), Trisomie 7 Mosaik, dup(8q), Trisomie 9 Mosaik, perizentrische Inversion 9, Trisomie 18, rec(18), del(18q), 46,XX „gonadal dysgenesis“, 47,XXX, 49,XXXXY und 47,XXY (Stanojevic *et al.*, 2000). Viele der genannten Chromosomenanomalien sind wahrscheinlich nicht als ursächlich für OAVS, sondern als zufällige Assoziation anzusehen. Es gibt aber auch Hinweise auf rekurrente Chromosomenanomalien. So wurden vier Fälle mit einer Deletion des kurzen Arms von Chromosom 5 beschrieben (Choong *et al.*, 2003; Josifova *et al.*, 2004; Neu *et al.*, 1982). Des Weiteren werden verschiedene Veränderungen von Chromosom 22q im Zusammenhang mit OAVS berichtet (Derbent *et al.*, 2003; Hathout *et al.*, 1998; Kobrynski *et al.*, 1993; Pridjian *et al.*, 1995). Diese Auffälligkeiten könnten einen Hinweis auf eine chromosomale Region geben und so dazu beitragen, mögliche Kandidatengene für das OAVS zu identifizieren.

Bei einer Patientin mit multiplen kartilaginären Exostosen und OAVS wurde eine anscheinend balancierte Translokation t(4;8)(p15.3;q24.1) diagnostiziert (Graham *et al.*, 1994). Es konnte gezeigt werden, dass der Chromosom 8-Bruchpunkt das *EXT1*-Gen im Intron 5 zerreißt (Ahn *et al.*, 1995; Lüdecke *et al.*, 1995). Dieser Befund erklärt das Auftreten der Exostosen. Die Analyse des Chromosom 4-Bruchpunktes ergab zwei Kandidatengene (*RAB28* & *BAPX1*) für das OAVS. *RAB28* wird durch die Translokation im Intron 3 zerrissen, *BAPX1* liegt etwa 76kb proximal zum Chromosom 4-Bruchpunkt (Fischer *et al.*, 2006).

Kelberman *et al.* identifizierten in einer Familie mit hemifazialer Mikrosomie über „linkage“-Analysen eine Region auf Chromosom 14q32, in der das humane *GSC* lokalisiert ist. Aufgrund des Expressionsmusters von *gsc* und des Phänotyps von *gsc* „knock-out“-Mäusen (Rivera-Perez *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1995) haben Kelberman *et al.* *GSC* als Kandidatengen für die hemifaziale Mikrosomie publiziert (Kelberman *et al.*, 2001).

Einen weiteren Hinweis auf eine genetische Ursache für OAVS bietet die „*Hfm*“-Maus. Naora

et al. beschreiben eine transgene Maus mit hemifazialer Mikrosomie, die den Phänotyp autosomal dominant vererbt. Die „*Hfm*“-Maus wurde durch die Integration eines „MBP-Minigens“ in das murine Chromosom 10, Region B1-3, die dem humanen Chromosom 6q16.3-q21 entspricht, generiert (Naora *et al.*, 1994).

Zusammenfassend kann man festhalten, dass es sich beim OAVS um ein klinisch sehr variables Krankheitsbild handelt. Die Ätiologie scheint nicht einheitlich zu sein, so dass man in Betracht ziehen muss, dass auch die Pathogenese heterogen und/oder multifaktoriell sein kann.

1.1.1 Mögliche allelische Fehlbildungssyndrome zum OAVS

Ein Teil der Patienten mit OAVS zeigt einen überlappenden Phänotyp mit weiteren angeborenen Fehlbildungserkrankungen, wie z.B. mit dem Treacher Collins-Syndrom (TCS), mit der Branchio-Oto-Renalen Dysplasie (BOR) und mit dem Townes-Brocks-Syndrom (TBS). Aufgrund der klinischen Überlappungen besteht die Vermutung, dass es sich bei OAVS und TCS, BOR bzw. TBS um allelische Fehlbildungssyndrome handeln könnte. Zu Beginn der Doktorarbeit waren keine Mutationen in den Genen, die für diese Krankheitsbilder verantwortlich sind, bei Patienten mit OAVS beschrieben worden.

Der Vollständigkeit halber seien hier auch das Lambert Syndrom (OMIM 245550) (Cohen & Schanen, 2000; Lambert *et al.*, 1982), das Delleman Syndrom (OMIM 164180) (Delleman & Oorthuys, 1981; McCandless & Robin, 1998), die CHARGE-Assoziation (OMIM #214800) (Tellier *et al.*, 1998; Van Meter & Weaver, 1996) und die VATER-Assoziation (OMIM #279650) (Cohen *et al.*, 1989) als mögliche allelische Fehlbildungssyndrome genannt.

1.1.1.1 Treacher Collins-Syndrom (TCS, OMIM #154500)

Beim Treacher Collins-Syndrom (TCS) handelt es sich um ein autosomal dominantes Krankheitsbild mit symmetrischen Dysmorphien des Gesichts, die charakterisiert sind durch Hypoplasien von Schädelknochen, insbesondere Jochbein und Unterkiefer, antimongoloide Lidachsenstellung, Kolobome des lateralen Anteils des Unterlids, Gaumenspalten und Ohranomalien, diese häufig in Kombination mit Atresien des äußeren Gehörgangs. Aufgrund von überlappenden klinischen Zeichen werden TCS und OAVS als mögliche allelische Fehlbildungssyndrome angesehen (Dixon, 1996). Das für das TCS verantwortliche Gen, *TCOF1*, bestehend aus 27 Exons, wurde 1996 identifiziert und kloniert (Treacher Collins Collaborative Group, 1996). Mittlerweile wurden über 150 Mutationen bei Patienten mit TCS

in diesem Gen beschrieben.

1.1.1.2 Branchio-Oto-Renale Dysplasie (BOR, OMIM #113650)

Die Branchio-Oto-Renale Dysplasie ist ein genetisch heterogenes Krankheitsbild, charakterisiert durch branchiogene Zysten, dysplastische Ohren mit präaurikulären Fisteln und renalen Anomalien. In der Literatur wurden mehrere Patienten mit einem überlappenden Phänotyp von OAVS mit BOR beschrieben (Cohen *et al.*, 1989; Sensi *et al.*, 1996). Abdelhak *et al.* identifizierten das humane Ortholog des *Drosophila eyes absent*-Gens, *EYA1*, als ein ursächliches Gen für BOR (Abdelhak *et al.*, 1997a). Das Gen besteht aus 17 Exons und erstreckt sich über eine Länge von ca. 160kb.

1.1.1.3 Townes-Brocks-Syndrom (TBS, OMIM #107480)

Das Townes-Brocks-Syndrom (TBS) ist ein autosomal dominantes Fehlbildungssyndrom, charakterisiert durch Ohrfehlbildungen mit Schwerhörigkeit, Analatresie und Daumenfehlbildungen (triphalangeale Daumen). Häufig werden auch Nierenfehlbildungen mit Funktionsstörungen und Herzfehler beobachtet (Townes & Brocks, 1972). Einige Patienten weisen überlappende klinische Zeichen von OAVS mit TBS auf (Gabrielli *et al.*, 1993; Johnson *et al.*, 1996). Bei einem dieser Patienten wurde eine Mutation im *SALL1*-Gen identifiziert (Gabrielli *et al.*, 1993; Kohlhase *et al.*, 1999). Inzwischen sind 35 Mutationen im *SALL1*-Gen beschrieben, die als ursächlich für das TBS angesehen werden (Botzenhart *et al.*, 2005).

1.2 Embryonalentwicklung des Gesichts

Nach der Entwicklung der dreiblättrigen Keimscheibe beginnt sich das Mesoderm in laterales Seitenplattenmesoderm, intermediäres Mesoderm und paraxiales Mesoderm zu differenzieren. Das in zwei Säulen lateral zum Neuralrohr angelegte paraxiale Mesoderm teilt sich, kranial beginnend, in paarweise angeordnete Somiten (Ursegmente). Jedes Ursegment teilt sich darauf in einen ventromedialen Teil, das Sklerotom, und in einen dorsolateralen Teil, das Dermomyotom.

Nach der Entwicklung der ersten 16 Ursegmente beginnt auf der ventralen Seite, kaudal zum Stomodeum (Urmund), die Bildung der Schlundbögen. Ursprünglich bestehen die Bögen aus Blöcken von mesenchymalem Gewebe, die durch tiefe Furchen, die Schlundfurchen, voneinander getrennt sind. Gleichzeitig mit der Entwicklung der Bögen und Furchen entsteht eine Reihe von Aussackungen, die Schlundtaschen.

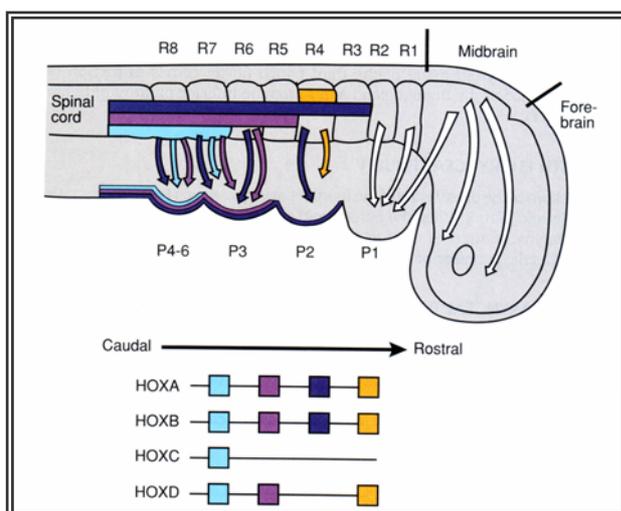


Abbildung 1.1: Einwanderung der Neuralleistenzellen in die Schlundbögen und *HOX*-Expression in den Rhombomeren. Die *HOX*-Gene werden in überlappenden Mustern exprimiert. Dieses Expressionsmuster spezifiziert die Derivate der Rhombomeren und bestimmt deren Wanderung in die einzelnen Schlundbögen (aus Langman's Medical Embryology).

Der mesenchymale Kern der Schlundbögen ist von ektodermalem Gewebe (nach außen) und endodermalem Gewebe (nach innen) umschlossen. Das Mesenchym stammt vom paraxialen Mesoderm und vom lateralen Seitenplattenmesoderm. Aus diesem entsteht die Muskulatur des Gesichts, die vom jeweiligen Schlundbogennerv innerviert wird und von der jeweiligen Schlundbogenarterie versorgt wird. Zudem besteht jeder Schlundbogen aus einer beträchtlichen Anzahl Neuralleistenzellen, die Material für die Skelettelemente des Gesichts beisteuern. Des Weiteren haben die Neuralleistenzellen eine wichtige Aufgabe bei der Determinierung der Schlundbögen. Sie wandern zu unterschiedlichen Mengen aus dem Mesenzephalon und den acht Segmenten des Rhombenzephalon (Rhombomere) in die Schlundbögen ein (Abbildung 1.1). Die Neuralleistenzellen zeigen eine starke Expression der so genannten *HOX*-Gene, die eine essenzielle Rolle bei der Musterbildung spielen

(McGinnis & Krumlauf, 1992). Entsprechend ihres Ursprungs weisen die Neuralleistenzellen ein bestimmtes Expressionsmuster der *HOX*-Genfamilie auf, das sie in die einzelnen Schlundbögen hineintragen, und so die weitere Entwicklung des Bogens determinieren. Der „*HOX* Code“ der einzelnen Schlundbögen aktiviert im Folgenden Gene, die die Entwicklung der Derivate der entsprechenden Bögen regulieren. Die Ausnahme bildet der erste Schlundbogen, in den Neuralleistenzellen der Rhombomere R1 und R2 sowie des Mittelhirns einwandern, die keine *HOX*-Genaktivität zeigen.

Aus dem ersten Schlundbogen gehen der Oberkieferwulst (dorsaler Teil des ersten Schlundbogens) und der Unterkieferwulst (ventraler Teil des ersten Schlundbogens) hervor. Die Knorpelspange des ersten Schlundbogens (Meckel-Knorpel) liegt in der Anlage des Unterkiefers und bildet sich im Laufe der Entwicklung zurück bis auf zwei kleine Abschnitte am dorsalen Ende, aus denen sich Hammer und Amboss entwickeln (Abbildung 1.2). Aus dem Mesenchym des Oberkieferwulstes entstehen der Zwischenkiefer (das spätere Kiefergelenk), der Oberkiefer, das Jochbein und ein Teil des Schläfenbeins. Aus dem Unterkieferwulst entsteht der Unterkiefer. Aus dem Knorpel des zweiten Schlundbogens (Reichert-Knorpel) entsteht der Steigbügel, ein weiterer Teil des Schläfenbeins sowie aus seinem ventralen Teil das kleine Horn und der kraniale Abschnitt des Zungenbeins. Der Knorpel des dritten Schlundbogens bildet den kaudalen Teil und das große Horn des Zungenbeins. Die knorpeligen Anteile des vierten und sechsten Schlundbogens verschmelzen zum Schild-, Ring- und Aryknorpel des Kehlkopfs.

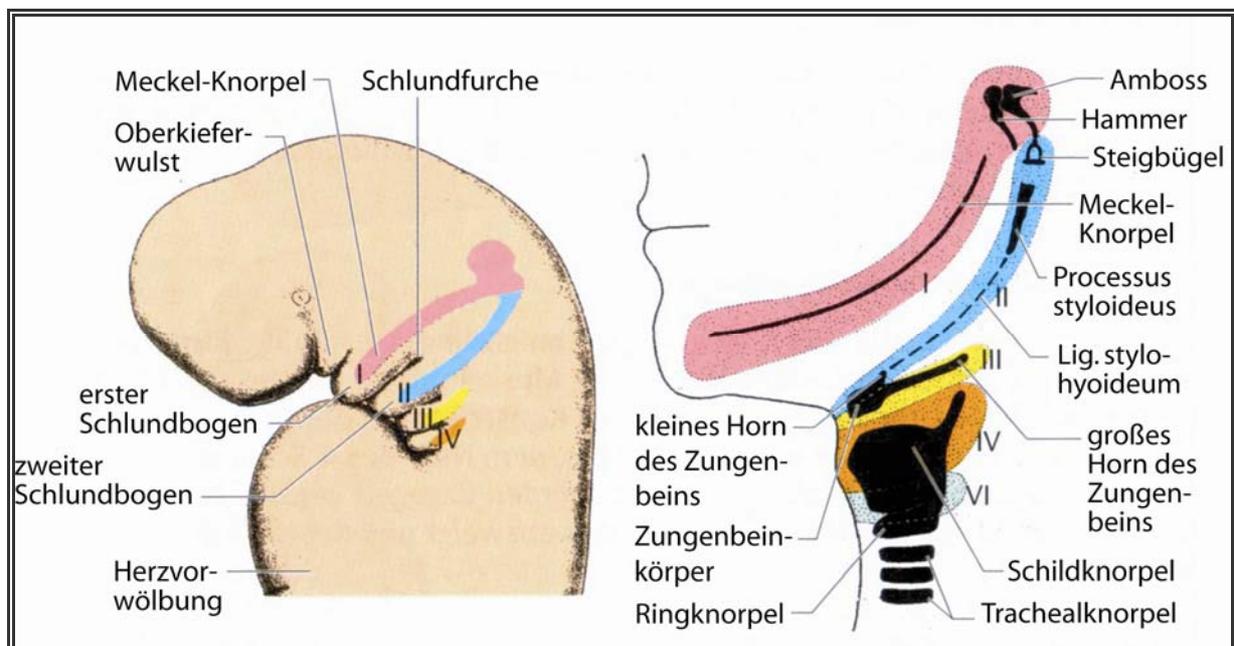


Abbildung 1.2: Die Entwicklung der Schlundbögen I-IV und ihre Derivate (nach Langman's Medical Embryology).

Die Schlundtaschen, aus denen eine Reihe wichtiger Organe entstehen, sind mit endodermalem Gewebe ausgekleidet. Die erste Schlundtasche bildet ein Divertikel, das mit dem Epithel der ersten Schlundfurche, dem späteren äußeren Gehörgang, in Verbindung tritt. Der distale Abschnitt der Ausbuchtung erweitert sich zur Anlage der Paukenhöhle, die endodermale Auskleidung der Paukenhöhle beteiligt sich später an der Bildung des Trommelfells. Das Epithel der zweiten Schlundtasche proliferiert und bildet Knospen, aus denen im weiteren Verlauf die Anlage der Gaumenmandel entsteht. Die dorsale Ausstülpung der dritten Schlundtasche wandelt sich in der 5. Entwicklungswoche zur unteren Nebenschilddrüse, während sich aus der ventralen Ausstülpung die Thymusanlage entwickelt. Beide Organe wandern dann in kaudaler und medialer Richtung in ihre endgültige Lage im Thorax. Aus dem Epithel der dorsalen Ausstülpung der vierten Schlundtasche bilden sich die oberen Epithelkörperchen, die sich an die nach kaudal wandernde Schilddrüse anheften und auf der dorsalen Oberfläche der Drüse zum Liegen kommen. Aus der fünften Schlundtasche entsteht der Ultimobranchialkörper, der später in die Schilddrüse einbezogen wird. Aus ihm entstehen die parafollikulären Zellen der Schilddrüse.

Von den vier angelegten Schlundfurchen trägt nur die erste zu definitiven Organanlagen bei. Ihr dorsaler Abschnitt wächst auf die erste Schlundtasche zu und bildet den äußeren Gehörgang. Die starke Proliferation des Mesoderms des zweiten Schlundbogens führt dazu, dass dieser sich nach kaudal ausdehnt und den dritten und vierten Schlundbogen überlappt. Schließlich verschmilzt der zweite Schlundbogen mit dem Herzwulst, wobei die zweite, dritte und vierte Schlundfurche zugedeckt werden und ihre Verbindung zur Oberfläche verlieren.

1.3 Das Kandidatengen *BAPX1*

Viele in der Embryonalentwicklung aktive Transkriptionsfaktoren werden von Genen kodiert, die zur Klasse der Homeoboxgene gehören. Mehrere hundert solcher Homeoboxgene sind bisher identifiziert worden. Eine große Mehrheit von ihnen ist in die Bildung axialer Muster (McGinnis & Krumlauf, 1992), die Etablierung von Segmentpolaritäten (Ingham & Martinez Arias, 1992) oder die Bestimmung von Gewebe- bzw. Zellidentitäten (Higashijima *et al.*, 1992; Jones & McGinnis, 1993) involviert. *BAPX1* gehört zur Familie der NK-Homeoboxgene. Vier NK-Homeoboxgene (*NK1*, *NK2/vnd* [ventral nervous system defective], *NK3/bap* [bagpipe], *NK4/tin* [tinman]) wurden ursprünglich bei *Drosophila* identifiziert und in zwei Klassen (NK-1 [*NK1*] und NK-2 [*NK2/vnd*, *NK3/bap*, *NK4/tin*]) unterteilt (Harvey, 1996; Kim & Nirenberg, 1989). *NK3/bap* und *NK4/tin* sind mit vier weiteren Homeoboxgenen im „93D/E cluster“ organisiert, dem zweitgrößten Homeoboxkomplex in *Drosophila* (Jagla *et al.*, 2001). Die *NK3*-Familie der Vertebraten umfasst derzeit elf Gene, die entsprechend ihrer Sequenzen in den konservierten Domänen in drei Gruppen unterteilt werden (*Nkx3.1*, *Nkx3.2/Bapx1*, *Nkx3.3*) (Lettice *et al.*, 2001). Alle Gene besitzen zwei konservierte Domänen, die Homeodomäne und die N-terminale TN-Domäne. Die *Nkx3.2/Bapx1*-Subfamilie definiert sich des Weiteren durch die C-terminalen Domänen NK2-SD und Bap (Lettice *et al.*, 2001; Tribioli & Lufkin, 1997).

Das humane *BAPX1* liegt auf Chromosom 4p15 und erstreckt sich über etwa 3,8kb genomische Sequenz. Es enthält eine etwa 280bp große 5'-UTR und eine etwa 1,1kb große 3'-UTR. Der Protein-kodierende Bereich besteht aus zwei Exons mit insgesamt einer Länge von 999bp (Exon 1 466bp, Exon 2 533bp), die durch ein etwa 1,4kb großes Intron voneinander getrennt sind. Die Exons liegen in zwei getrennten CpG-reichen Regionen (5'-CpG-Insel und 3'-CpG-Insel (siehe Abbildung 4.12)). Das humane und murine Protein haben die gleiche Größe (333 Aminosäuren) und zeigen eine Sequenzidentität von insgesamt 85%. In der TN-Domäne liegt die Identität bei 94% und in der Homeodomäne, der NK2-SD- und Bap-Domäne sogar bei 100%. Die Homeodomäne von *Drosophila* stimmt noch zu 87% mit der humanen überein. Es kann also davon ausgegangen werden, dass *Nkx3.2/Bapx1* und *BAPX1* echte Homologe des *Drosophila bagpipe*-Gens sind (Tribioli *et al.*, 1997; Yoshiura & Murray, 1997).

1.3.1 *bagpipe*-Homologe im Krallenfrosch und im Zebrafisch

Im Krallenfrosch sind drei *bagpipe* verwandte Gene bekannt (*Xbap*, *zax*, *koza*). *Xbap* (*Xbap*) wird im *Xenopus* Embryo im posterioren Kopfdarm exprimiert. Darüber hinaus wird *Xbap* in hohem Maße in den sich entwickelnden kraniofazialen Strukturen exprimiert (Newman *et al.*, 1997). *Zampogna* (*zax*) zeigt eine vergleichbare Expression wie *Xbap*, jedoch keine Expression in kraniofazialen Strukturen (Newman & Krieg, 1999). Die Expression von *koza* ist auf die Bereiche der Zementdrüse, des Herzens und der Ursegmente beschränkt (Newman & Krieg, 2002).

Im Zebrafisch ist vor allem die Rolle von *bapx1* bei der Bildung des Kiefergelenks untersucht worden. Hier wird *bapx1* in einem Bereich des späteren Kiefergelenks exprimiert, und es wird angenommen, dass diese Expression ein intermediäres Gelenk markiert. Die restriktive Expression in diesem Bereich wird durch einige Faktoren erreicht. So konnte im Zebrafisch *edn1* als Aktivator und *hand2* (das humane *dHAND*) als Repressor von *bapx1* identifiziert werden (Miller *et al.*, 2003). Die Expression von *bapx1* selbst bewirkt im sich entwickelnden Kiefergelenk die Aktivierung von *chordin* und *gdf5*, weiteren Faktoren, die für die Bildung des Kiefergelenks essenziell sind.

In einer weiteren Arbeit wurde gezeigt, dass die Expression von *bapx1* im Zebrafisch von der Histonacetyltransferase (HAT) *moz* (das humane MOZ („monocytic leukemia zinc finger“)) beeinflusst wird. *Moz* ist hier für die Aufrechterhaltung der Expression der Gene *hox1-4* verantwortlich. In *moz*-Mutanten markiert die Expression von *bapx1* nicht das sich entwickelnde Kiefergelenk im ersten Kiemenbogen, sondern zeigt eine ektopische Expression im zweiten Kiemenbogen, was auf die fehlerhafte Expression von *hoxa2* zurückzuführen ist. Dies führt zu einer homeotischen Transformation des zweiten Kiemenbogens, der Strukturen ausbildet, die spezifisch für den ersten Bogen sind (Miller *et al.*, 2004). Außerdem geht die Expression von *gooseoid* (*gsc*) im zweiten Kiemenbogen verloren, was den Schluss zulässt, dass *gsc* als Repressor von *bapx1* agiert (Miller *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2004). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass *bapx1* Informationen über seine Expression bezüglich der dorsoventralen Achse (*edn1*, *hand2*) und der anteriorposterioren Achse (*moz*, *hox2*) integriert und so seine restriktive Expression im Bereich des Kiefergelenks erreicht wird (Miller *et al.*, 2004).

1.3.2 *bagpipe*-Homologe im Huhn und in der Maus

1.3.2.1 Die Expression von Nkx3.2/Bapx1

Die Expression von *Nkx3.2/Bapx1* beginnt im Stadium E8.0 im Kopfmesoderm, nachdem sich drei bis fünf Ursegmente gebildet haben. In den Ursegmenten ist die Expression auf den sklerotomalen Teil beschränkt, aus dem das axiale Skelett hervorgeht und zeigt einen rostrokaudalen Gradienten. Im lateralen Seitenplattenmesoderm wird *Nkx3.2/Bapx1* im Bereich des sich entwickelnden Darmendoderms exprimiert, aus dem sich das Darmepithel entwickelt. Ab E9.5 wird eine weitere Expressionsdomäne im inferioren Teil des ersten Schlundbogens erkennbar, die sich bis E10.5 auf Strukturen des kraniofazialen Skeletts ausweitet. Ab E12.5 ist eine *Nkx3.2/Bapx1*-Expression auch in Knorpelkondensationen der Gliedmaßen nachzuweisen. Die Expression im Kopfmesoderm beschränkt sich nun auf die Knorpelkondensationen der Schädelknochen. Die Expression im Darmmesoderm geht auf die Anlagen von Magen, Pankreas und Nieren zurück und die Expression im ersten Schlundbogen konzentriert sich auf einen Bereich um den Meckel-Knorpel. Bis E16.5 bleibt die Expression in den Strukturen bestehen, erscheint jedoch quantitativ reduziert. Wie schon in den Ursegmenten zeigt *Nkx3.2/Bapx1* auch im axialen Skelett einen rostrokaudalen Gradienten, wobei die Expression in den sich entwickelnden Wirbelkörpern stärker ist als in den Zwischenwirbelscheiben (Akazawa *et al.*, 2000; Lettice *et al.*, 2001; Tribioli *et al.*, 1997). Wie auch beim Zebrafisch wurde bei der Maus insbesondere die *Nkx3.2/Bapx1*-Expression im ersten Schlundbogen untersucht. In der homologen Region zum Kiefergelenk des Zebrafisches konnte ebenfalls die Expression von *Nkx3.2/Bapx1* bei der Maus nachgewiesen werden. Hier entspricht die Region dem sich entwickelnden Mittelohr, dem Hammer und Amboss (Svensson & Haas, 2005; Tucker *et al.*, 2004). Interessanterweise wird in zwei Arbeiten die asymmetrische Expression von *Nkx3.2/Bapx1* beschrieben (Rodriguez Esteban *et al.*, 1999; Schneider *et al.*, 1999). Im Huhn wird die Expression von *Nkx3.2/Bapx1* im linken lateralen Seitenplattenmesoderm in den Stadien 10-11 detektiert (Rodriguez Esteban *et al.*, 1999). In der Maus hingegen wird im Stadium E8.5 eine vornehmliche Expression von *Nkx3.2/Bapx1* im rechten lateralen Seitenplattenmesoderm gefunden (Schneider *et al.*, 1999). Mittels Missexpression von Genen aus dem „rechts-links“-Signalweg (*Shh*, *Lefty* und *Nodal*) konnte für *Nkx3.2/Bapx1* ein mit *Pitx2* überlappendes Expressionsmuster gezeigt werden, so dass *Nkx3.2/Bapx1* als ein weiteres Ziel des „rechts-links“-Signalwegs charakterisiert werden konnte (Rodriguez Esteban *et al.*, 1999). Ein Modell für diesen Signalweg ist in Abbildung 1.3 dargestellt.

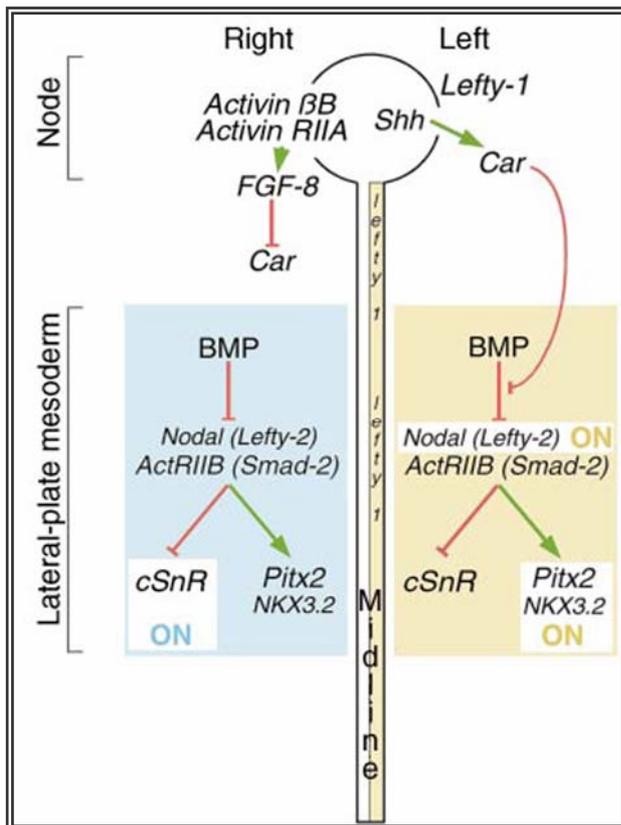


Abbildung 1.3: „Rechts-links“-Signalweg (nach Rodriguez Esteban *et al.*, 1999). *Car* vermittelt die *Shh*-abhängige Expression von Genen, die für das linke laterale Seitenplattenmesoderm spezifisch sind, indem es *Nodal* über die Inhibierung von BMP aktiviert. *Nodal* wiederum aktiviert im Weiteren *Pitx2* und *Nkx3.2/Bapx1*, zwei wichtige Mediatoren der „rechts-links“-Information. Im rechten lateralen Seitenplattenmesoderm wird die Expression von *Car* durch *FGF-8* reprimiert und so die Inhibierung von *Nodal* über BMP aufrechterhalten.

1.3.2.2 Das genetische Netzwerk von *Nkx3.2/Bapx1*

Erste Anzeichen für die Expression des Transkriptionsrepressors *Nkx3.2/Bapx1* finden sich bereits im frühen embryonalen Mesoderm (Tribioli *et al.*, 1997). Hier zeigt *Nkx3.2/Bapx1* ein überlappendes Expressionsmuster mit *Pax1*, einem bekannten Zielgen von *Sonic hedgehog* (*Shh*) (Fan & Tessier-Lavigne, 1994; Johnson *et al.*, 1994), was die Vermutung zulässt, dass auch *Nkx3.2/Bapx1* von *Shh* aktiviert wird (Murtaugh *et al.*, 1999). Tatsächlich konnte in Zellkulturexperimenten gezeigt werden, dass die initiale Expression von *Nkx3.2/Bapx1* von *Shh* im Zusammenspiel mit BMPs („bone morphogenetic proteins“) abhängig ist. Die BMPs sorgen im Weiteren dafür, dass die Expression von *Nkx3.2/Bapx1* erhalten bleibt (Murtaugh *et al.*, 2001). *Pax1/Pax9* und *Meox1/Meox2* konnten in Untersuchungen von Mausmutanten als Transkriptionsaktivatoren von *Nkx3.2/Bapx1* identifiziert werden (Rodrigo *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2004). Da die Expression von *Nkx3.2/Bapx1* in *Pax1/Pax9*- sowie in *Meox1/Meox2*-Mausmutanten beeinträchtigt wird bzw. verloren geht (Rodrigo *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2004), die Expression von *Pax1/Pax9* und *Meox1/Meox2* in *Nkx3.2/Bapx1*-Mausmutanten jedoch unverändert bleibt (Akazawa *et al.*, 2000; Lettice *et al.*, 1999; Tribioli & Lufkin, 1999), liegt der Schluss nahe, dass *Nkx3.2/Bapx1* „downstream“ der vier Transkriptionsfaktoren agiert. Für *Pax1/Pax9* und *Meox1* konnte außerdem eine direkte

Interaktion mit Promotorsequenzen von *Nkx3.2/Bapx1* gezeigt werden (Rodrigo *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2004). Die Expression von *Nkx3.2/Bapx1* bewirkt im Weiteren die Expression von *Sox9*. Für diese Aktivierung wird eine autoregulatorische Schleife angenommen, in der *Nkx3.2/Bapx1* durch eine BMP abhängige Inhibierung eines Repressors von *Sox9* dessen Expression bewirkt. *Sox9* selbst kann dann wiederum *Nkx3.2/Bapx1* aktivieren, um seine eigene Expression zu verstärken (Zeng *et al.*, 2002). *Sox9* wiederum aktiviert knorpelspezifische Gene wie *type II collagen* und *aggrecan* in Abhängigkeit von *L-Sox5* und *Sox6* (Lefebvre *et al.*, 1997; Lefebvre *et al.*, 1998; Ng *et al.*, 1997; Sekiya *et al.*, 2000). Für *Runx2* konnte das erste Mal eine Interaktion von *Nkx3.2/Bapx1* mit einer Sequenz im Promotor eines Zielgens gezeigt werden. Die Interaktion führt zur Repression von *Runx2*, was in dem entsprechenden Gewebe zur Chondrogenese führt. Die Expression von *Runx2* hingegen führt durch Aktivierung weiterer knochenspezifischer Gene zur Osteogenese (Lengner *et al.*, 2005).

Eine modulierende Steuerung von *Nkx3.2/Bapx1* wurde 2003 von Kim & Lassar beschrieben. Die reprimierende Funktion von *Nkx3.2/Bapx1* wird modifiziert durch die BMP abhängige Assoziation von Smad1/Smad4 mit *Nkx3.2/Bapx1*. Diese Interaktion wiederum stabilisiert einen Komplex von *Nkx3.2/Bapx1* mit dem Histondeacetylase 1 (HDAC1)/Sin3A Korepressorkomplex (Kim & Lassar, 2003).

1.3.2.3 Die Funktion von *Nkx3.2/Bapx1*

Die Funktion von *Nkx3.2/Bapx1* wurde in „knock-out“-Experimenten mit Mäusen untersucht. In einer ersten Arbeit wurde das *Nkx3.2/Bapx1*-Gen durch homologe Rekombination teilweise entfernt (Lettice *et al.*, 1999). Homozygote „knock-out“-Mäuse zeigen eine Asplenie durch den Verlust der Expression von *Hox11*. Fehlbildungen des axialen Skeletts sind vor allem im ventromedialen Bereich zu finden. Den zervikalen Wirbelkörpern fehlt der ventromediale Teil vollständig, wobei die Fehlbildungen weiter kaudal abnehmen. Des Weiteren sind zwei Knochen des Chondrokranium, der basiokzipitale und der basisphenoide Knochen, betroffen. Beide Knochen sind unterentwickelt, jedoch aus unterschiedlichen Gründen. Der basiokzipitale Knochen ist aufgrund verminderter Einwanderung von sklerotomalen Zellen aus den Ursegmenten verkleinert, der basisphenoide Knochen aufgrund fehlender Entwicklung des zephalen, parachordalen Mesoderms (Lettice *et al.*, 1999). In zwei weiteren Arbeiten wurde *Nkx3.2/Bapx1* durch homologe Rekombination vollständig entfernt (Akazawa *et al.*, 2000; Tribioli & Lufkin, 1999). Der Phänotyp dieser „knock-out“-Mäuse zeigt eine schwerere Ausprägung. Homozygote „knock-out“-Mäuse sterben perinatal und zeigen eine Asplenie. Die Wirbelkörper zeigen den Verlust des

ventromedialen Teils und der Ossifikationszentren. Die Zwischenwirbelscheiben zeigen nur eine 0,2-fache Dicke. Auch die Fehlbildungen des Chondrokranium sind stärker ausgeprägt. Neben Dysmorphien des basiokzipitalen und des basisphenoiden Knochens, zeigt auch der exokzipitale Knochen Veränderungen, der supraokzipitale Knochen fehlt vollständig (Tribioli & Lufkin, 1999). Eine weitere Verstärkung des *Nkx3.2/Bapx1*^{-/-}-Phänotyps konnte durch einen doppelten „knock-out“ von *Nkx3.2/Bapx1* und dem zu *tinman* homologen *Nkx3.1* erreicht werden. In diesen Mäusen gehen sklerotomale Zellen fast gänzlich verloren. So konnte eine überschneidene Funktion und ein synergistischer Effekt der verwandten *Nkx3*-Gene gezeigt werden (Herbrand *et al.*, 2002).

1.4 Transkriptionsregulation über DNA-Methylierung und Histonmodifikation

Die Expression eines Gens wird über *cis*-regulative (Promotor, „enhancer“, Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren) und *trans*-regulative Elemente (Transkriptionsfaktoren, die an *cis*-regulative Elemente binden) gesteuert. Wichtige Faktoren hierbei sind die DNA-Methylierung, die eine Bindung von Transkriptionsfaktoren an spezifische Erkennungssequenzen ermöglicht, und die Histonmodifikation, die über eine Veränderung der Chromatinstruktur Einfluss auf die Expression von Genen ausübt. Diese Mechanismen der Transkriptionsregulation agieren nicht getrennt und unabhängig voneinander, sondern zeigen eine enge Verknüpfung und Interaktion (Fuks, 2005).

1.4.1 DNA-Methylierung

Die Nukleotide der DNA enthalten die vier Basen Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin. Eine Modifikation der letzten Base führt zu einem weiteren Nukleotid, dem 5-Methyldeoxycytidin (5-mC). Die Methylierung des Cytosins wird von spezifischen DNA-Methyltransferasen (DNMTs) katalysiert. In Eukaryonten konnten 1977 durch Inhibierung der DNMTs erste Hinweise darauf gesammelt werden, dass das 5-mC an der Regulation zahlreicher Gene beteiligt ist (Constantinides *et al.*, 1977). In späteren Studien konnte gezeigt werden, dass die Methylierung von Cytosinen in CpG-Dinukleotiden innerhalb von Promotoren zur Inaktivierung der entsprechenden Gene führt (Langner *et al.*, 1984; Sutter & Doerfler, 1980; Vardimon *et al.*, 1980). Heute ist bekannt, dass die DNA-Methylierung auch bei weiteren essenziellen genetischen Funktionen, wie der Inaktivierung eines X-Chromosoms, der differenziellen Inaktivierung von Genen während der Embryonalentwicklung, beim „genetic imprinting“, d.h. bei der Inaktivierung von Genen auf einem der beiden elterlichen Chromosomen, sowie bei Veränderungen der Genaktivität in zahlreichen Tumorerkrankungen eine Rolle spielt.

Die Methylgruppe am Cytosin wird während oder nach der DNA-Replikation durch DNA-Methyltransferasen in die CpG-Dinukleotide eingeführt, wobei S-Adenosylmethionin als Methylgruppendonor dient. Man unterscheidet grundsätzlich zwischen zwei Arten der DNA-Methylierung. (1) Nach Befruchtung einer Eizelle kommt es zu einem aktiven Auslöschen der paternalen und zu einem passiven Auslöschen der maternalen DNA-Methylierung. Anschließend kommt es zu einer genomweiten *de novo*-Methylierung. Diese Art der Methylierung wird unter anderem von den DNA-Methyltransferasen DNMT3A und DNMT3B durchgeführt. (2) Während der semikonservativen Replikation muss der neu entstehende DNA-Strang die gleiche Methylierung erhalten wie der elterliche Strang. Die hierfür benötigte,

erhaltende DNA-Methylierung („maintenance methylation“) wird vornehmlich von der DNA-Methyltransferase DNMT1 bewerkstelligt.

In den meisten bisher beschriebenen Fällen wird die Transkriptionsregulation durch DNA-Methylierung über die Bindung von Korepressoren, die spezifisch an methylierte CpG-Dinukleotide binden („methyl-CpG-binding protein“ (MeCP)), vermittelt. Diese Korepressoren rekrutieren so beispielsweise Histondeacetylasen (HDACs) zu den entsprechenden Genen, die dann über die Modifikation des Chromatins stillgelegt werden (Ng & Bird, 1999).

1.4.2 Histonacetylierung/deacetylierung

Die DNA liegt in der Zelle nicht frei vor, sondern ist mit Proteinen, den Histonen, assoziiert. Ein Histonkomplex besteht aus acht Untereinheiten ($H3_2, H4_2, (H2A/H2B)_2$), um den 147bp DNA in knapp zwei Schleifen herumgewunden sind. Ein Histon besteht aus einem globulären carboxyterminalen Teil, der die Histon-Histon-Interaktion vermittelt und mit der DNA interagiert, und einem aminoterminalen linearen Teil, der Ziel zahlreicher Modifikationen ist. Er besteht aus 20-35 überwiegend basischen Aminosäuren, die posttranslational modifiziert werden. Diese Modifikationen umfassen die Acetylierung und Methylierung von Lysinen und Argininen, die Phosphorylierung von Serinen und Threoninen, sowie die Ubiquitinierung und Sumoylierung von Lysinen.

Bei der Histonacetylierung/deacetylierung, die bislang am intensivsten untersucht wurde, konnte für zahlreiche Fälle gezeigt werden, dass die Histonacetylierung mit transkriptioneller Aktivität assoziiert ist, wohingegen die Histondeacetylierung mit transkriptioneller Repression einhergeht. Inzwischen ist die Acetylierung von mindestens 20 verschiedenen Lysinen und Argininen in den einzelnen linearen Histonbereichen bekannt (Peterson & Laniel, 2004). Es wird heute angenommen, dass die Acetylierung der Histone die Struktur der DNA in eine höhere Ordnung verhindert und das Chromatin somit transkriptionell aktiv bleibt. Die Acetylierung von Histonen wird von Histonacetyltransferasen (HATs), die Entfernung der Acetylierung (Deacetylierung) von Histondeacetylasen (HDACs) bewerkstelligt. Prinzipiell kann man zwei verschiedene Arten der Histonacetylierung/deacetylierung unterscheiden. (1) Die globale Histonacetylierung/deacetylierung, z.B. in Telomer- bzw. Subtelomer-Regionen der Chromosomen, die allerdings auch in kodierenden Regionen gefunden wird. (2) Die gezielte Histonacetylierung/deacetylierung, über die die Transkription von Gengruppen, aber auch einzelner Gene, wie beispielsweise für das *Interferon β* -Gen beschrieben, reguliert wird (Kurdistani & Grunstein, 2003).

2. Zielsetzung

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen Gendefekt für das Okulo-Aurikulo-Vertebrale Spektrum zu identifizieren. Die Auswahl der Kandidatengene erfolgte nach zwei verschiedenen Gesichtspunkten.

In dem ersten Teilprojekt sollten zwei Gene untersucht werden, die bei klinisch ähnlichen Fehlbildungssyndromen betroffen sind. Hierfür sollte bei Patienten mit OAVS und einem überlappenden Phänotyp zum Treacher Collins-Syndrom (TCS) eine Mutationsanalyse im *TCOF1*-Gen durchgeführt werden. Des Weiteren sollten Patienten mit OAVS und einem überlappenden Phänotyp zur Branchio-Oto-Renalen Dysplasie (BOR) auf Mutationen im *EYA1*-Gen untersucht werden.

In dem zweiten Teil sollten, ausgehend von einer Translokation $t(4;8)(p15.3;q24.1)$ bei einer Patientin mit OAVS, zwei Gene auf Chromosom 4p15 (*RAB28* und *BAPX1*) bei Patienten mit OAVS auf Mutationen untersucht werden. *RAB28* wird durch die Translokation zerrissen und war somit ein gutes positionelles Kandidatengen. *BAPX1* liegt 76kb proximal zum Translokationsbruchpunkt und war aufgrund seiner bereits beschriebenen Funktion ein sehr gutes funktionelles Kandidatengen für OAVS.

3. Material & Methoden

3.1 Arbeiten mit DNA und RNA

3.1.1 DNA-Präparation aus Leukozyten und kultivierten primären Fibroblasten

0,5M EDTA-Lösung	186,1g 20,0g ad 1l	Na ₂ EDTA • 2H ₂ O (Merck) NaOH (Merck) H ₂ O (Merck) auf pH 8,0 mit 10M NaOH (Merck)
NaCl/EDTA-Puffer	75ml 240ml ad 500ml	5M NaCl (292,2g/l H ₂ O (Merck/Merck)) 0,5M EDTA-Lösung H ₂ O (Merck) Puffer autoklavieren

Für die Mutationsanalyse von Patienten mit OAVS wurde DNA aus Leukozyten aus peripherem Venenblut präpariert.

Für die Normierung auf ein äquimolares Allelverhältnis der RNA-Werte, die für die quantitative Analyse des allelischen Transkriptverhältnisses von *BAPX1* mittels „quantitative-primer-extension“-Analysen (SNaPshot-Analysen, siehe 3.1.10) erhalten wurden, diente DNA, die aus kultivierten primären Fibroblasten präpariert wurde.

Für beide Anwendungen wurde das „Flexigene DNA Blood Test Kit“ (Qiagen) verwendet.

Kurzprotokoll (DNA aus Leukozyten)

- 1ml Blut mit 2,5ml FG1 Buffer versetzen (14ml Röhre (Sarstedt))
- 10min inkubieren (Roller Mixer SRT2, Stuart Scientific)
- zentrifugieren (5min, 3.500rpm (Avanti™ J-20 XP, JS-5.3, Beckman Coulter))
- Überstand verwerfen
- Pellet mit 500µl FG2 Buffer + 5µl Proteinase K (Roche) resuspendieren
- in 1,5ml Reagiergefäß (Sarstedt) überführen
- in Heizblock inkubieren (65°C, 10min, 850rpm)
- mit 500µl Isopropanol versetzen, invertieren
- zentrifugieren (2min, 14.000rpm (miniSpin plus, Eppendorf))
- Überstand verwerfen
- mit 500µl 70% (v/v) Ethanol waschen
- zentrifugieren (2min, 14.000rpm)
- Überstand verwerfen → DNA trocknen (RT, 1h)
- Pellet in 200µl FG3 Buffer aufnehmen, im Heizblock inkubieren (65°C, 1h, 850rpm)
- über Nacht auf dem Roller Mixer lösen lassen

Kurzprotokoll (DNA aus kultivierten primären Fibroblasten (siehe auch Punkt 3.3.1.3))

- Suspension zentrifugieren (1min , 5000rpm, (miniSpin plus, Eppendorf))
- Überstand verwerfen
- mit 500µl NaCl/EDTA-Puffer waschen, zentrifugieren (1min, 5000rpm)
- Überstand verwerfen
- Pellet in 1ml FG1 Buffer resuspendieren, 10min inkubieren (s.o.)
- zentrifugieren (2min, 14.500rpm), Überstand verwerfen
- Pellet mit 500µl FG2 Buffer + 5µl Proteinase K resuspendieren
- weiter wie Kurzprotokoll (DNA aus Leukozyten) (s.o.)

3.1.2 RNA-Präparation aus Blut und Mundschleimhaut

Zur Analyse der Expression des *BAPX1*-Gens wurde RNA aus Leukozyten und Mundschleimhaut präpariert. Die Präparation von RNA aus Leukozyten erfolgte mit dem „QIAamp RNA Blood Mini Kit“ (Qiagen), die Präparation von RNA aus Mundschleimhaut erfolgte mit dem „Invisorb Spin Cell RNA Mini Kit“ (Invitek).

Kurzprotokoll (RNA aus Leukozyten)

- 1ml Blut mit 5ml EL Buffer versetzen (15ml Probenröhrchen (greiner bio-one))
- inkubieren (auf Eis, 20min)
- zentrifugieren (4°C, 10min, 400g (Centrifuge 5804, 16A 4-44, Eppendorf))
- Überstand verwerfen
- Pellet in 2ml EL Buffer resuspendieren
- zentrifugieren (4°C, 10min, 400g)
- Überstand verwerfen
- Pellet in 300µl RLT Buffer + 3µl β-Mercaptoethanol (Sigma) resuspendieren (vortexen)
- Lysat auf QIAshredder Säule pipettieren
- zentrifugieren (2min, 20.000g (Centrifuge 5804, 16F 24-11, Eppendorf))
- Durchlauf mit 300µl 70% (v/v) Ethanol versetzen
- Lösung auf QIAamp Säule pipettieren, zentrifugieren (1min, 8.000g)
- DNase Behandlung
 - 350µl RW1 Buffer auf die Säule pipettieren, zentrifugieren (1min, 8.000g)
 - 70µl RDD Buffer + 10µl DNase (RNase free (Qiagen)) auf die Säule pipettieren
 - inkubieren (15min, RT)
 - zentrifugieren (1min, 8.000g)
 - 350µl RW1 Buffer auf die Säule pipettieren, zentrifugieren (1min, 8.000g)
- zweimal mit 500µl RPE Buffer waschen, zentrifugieren (1min, 8.000g)
- zum Trocknen zentrifugieren (3min, 20.000g)
- mit 40µl H₂O eluieren (1min, 8.000g)
- in 1,5ml Micro-Schraubröhre (Sarstedt) überführen

Kurzprotokoll (RNA aus Mundschleimhaut)

- mit Holzspatel 1. Mundschleimhautabstrich abnehmen, Abstrich werfen
- 2. Abstrich in 20ml NaCl/EDTA aufnehmen (50ml Probenröhrchen (greiner bio-one))
- zentrifugieren (5min, 1.500rpm (Centrifuge 5804, 16A 4-44, Eppendorf))
- Überstand werfen
- Pellet in 350µl Lysis Solution R resuspendieren
- Lysat auf DNA Binding Spin Filter pipettieren
- inkubieren (RT, 1min)
- zentrifugieren (2min, 12.000rpm (Centrifuge 5804, 16F 24-11, Eppendorf))
- Durchlauf mit 350µl 70% (v/v) Ethanol versetzen
- Lösung auf RNA Binding Spin Filter pipettieren
- inkubieren (RT, 1min), zentrifugieren (30s, 10.000rpm)
- mit 600µl Wash Buffer R1 waschen, zentrifugieren (30s, 10.000rpm)
- zweimal mit 500µl Wash Buffer R2 waschen, zentrifugieren (30s, 10.000rpm)
- zum Trocknen zentrifugieren (3min, 12.000rpm)
- mit 40µl Elution Buffer R eluieren, zentrifugieren (1min, 10.000rpm)
- in 1,5ml Micro-Schraubröhre (Sarstedt) überführen

3.1.3 RNA-Präparation aus kultivierten primären Fibroblasten

Für die Analyse des allelischen Transkriptverhältnisses von *BAPX1* mittels „quantitative-primer-extension“-Analysen (SNaPshot-Analysen) wurde RNA aus kultivierten primären Fibroblasten präpariert. Die Präparation der RNA erfolgte mit dem „QIAamp RNA Blood Mini Kit“ (Qiagen).

Kurzprotokoll

- Suspension zentrifugieren (3min, 300g, (Centrifuge 5804, 16F24-11, Eppendorf))
- Überstand werfen
- mit 500µl NaCl/EDTA-Puffer waschen, zentrifugieren (3min, 300g)
- Pellet in 300µl RLT Buffer + 3µl β-Mercaptoethanol (Sigma) resuspendieren (vortexen)
- Lysat auf QIAshredder Säule pipettieren
- zentrifugieren (2min, 20.000g)
- Durchlauf mit 300µl 70% (v/v) Ethanol versetzen
- Lösung auf QIAamp Säule pipettieren, zentrifugieren (1min, 8.000g)
- DNase Behandlung
 - 350µl RW1 Buffer auf die Säule pipettieren, zentrifugieren (1min, 8.000g)
 - 70µl RDD Buffer + 10µl DNase (RNAse free (Qiagen)) auf die Säule pipettieren
 - inkubieren (RT, 15min)
 - zentrifugieren (1min, 8.000g)
 - 350µl RW1 Buffer auf die Säule pipettieren, zentrifugieren (1min, 8.000g)
- zweimal mit 500µl RPE Buffer waschen, zentrifugieren (1min, 8.000g)
- zum Trocknen zentrifugieren (3min, 20.000g)
- mit 40µl H₂O eluieren (1min, 8.000g)
- in 1,5ml Micro-Schraubröhre (Sarstedt) überführen

3.1.4 DNA-Amplifikation mittels Polymerasekettenreaktion (PCR) (Mullis *et al.*, 1986)

10x dNTP Mix	20µl	100mM dGTP (peqLab)
	20µl	100mM dCTP (peqLab)
	20µl	100mM dATP (peqLab)
	20µl	100mM dTTP (peqLab)
	920µl	H ₂ O (Merck)
10x dNTP Mix (60% (v/v) 7-Deaza-dGTP)	12µl	10mM 7-Deaza-dGTP, Li-Salz (Roche)
	0,8µl	100mM dGTP (peqLab)
	2µl	100mM dCTP (peqLab)
	2µl	100mM dATP (peqLab)
	2µl	100mM dTTP (peqLab)
	31,2µl	H ₂ O (Merck)

Die PCR diente der Amplifikation spezifischer DNA-Abschnitte aus cDNA („complementary DNA“), sowie aus genomischer und Bisulfit-behandelter DNA. Ein 25µl PCR-Ansatz enthielt 50-400ng genomische DNA als Matrize, PCR-Puffer (Roche, Applied Biosystems), 400-1000nM spezifische 5'- und 3'-Oligonukleotide (Eurogentec oder Biomers, im folgenden Primer), 200-500µM dNTP-Mix und 2,5U AmpliTaq-Polymerase (Roche, Applied Biosystems).

Für die PCR GC-reicher Sequenzen wurde den Ansätzen zusätzlich, in Anlehnung an das Protokoll von Pergolizzi *et al.* (Pergolizzi *et al.*, 1992), 0,5M Betain (Fluka) zugegeben und ein modifizierter dNTP-Mix verwendet, der 60% (v/v) 7-Deaza-dGTP enthält. Alternativ dazu wurde das „Advantage-GC 2 PCR Kit“ (BD Biosciences) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Für die genaue Darstellung der PCR-Ansätze, PCR-Programme und Primer Sequenzen **siehe Anhang.**

3.1.5 Qualitative Expressionsanalyse

Zur Expressionsanalyse von *BAPX1* wurde RNA mittels reverser Transkription in cDNA übersetzt und anschließend ein Teil des interessierenden Gens mittels PCR aus der cDNA amplifiziert. Für die reverse Transkription wurden folgende Ansätze pipettiert.

RT Ansätze	Probe	- RT	- RNA
RNA	2000ng	2000ng	-
MgCl ₂ Solution (25mM)*	4µl	4µl	4µl
10x PCR Buffer II*	2µl	2µl	2µl
dGTP (10mM)*	2µl	2µl	2µl
dATP (10mM)*	2µl	2µl	2µl
dTTP (10mM)*	2µl	2µl	2µl
dCTP (10mM)*	2µl	2µl	2µl
RNase Inhibitor (5U/µl)*	1µl	1µl	1µl
Random Hexamers (50µM)*	1µl	1µl	1µl
Reverse Transcriptase (RT) (50U/µl)*	1µl	-	1µl
H ₂ O (Merck)	ad 20µl	ad 20µl	ad 20µl

*(Applied Biosystems)

Die reverse Transkription erfolgte in drei Schritten (21°C für 10min, 42°C für 15min, 95°C für 5min) in einem Thermal Cycler (GeneAmp PCR System 2700 (Applied Biosystems)).

Die anschließende PCR erfolgte ohne Aufreinigung mit je 10µl des Transkriptionsansatzes.

Der PCR-Ansatz und das PCR-Programm waren wie folgt.

RT-PCR-Ansätze		RT-PCR-Programm	
Transkriptionsansatz	10µl	96°C	5min
5'-Primer BAPX_RTPCR1f (5µM)	2µl	96°C	30s
3'-Primer BAPX_RTPCR1r (5µM)	2µl	61°C	30s
5x PCR Buffer*	5µl	68°C	3min
GC-Melt*	2,5µl		
dNTP Mix*	0,5µl		
Polymerase Mix*	0,5µl		
H ₂ O (Merck)	2,5µl		
		37 Zyklen	

*„Advantage-GC 2 PCR Kit“

3.1.6 Aufreinigung von PCR- und RT-PCR-Produkten

Zur Aufreinigung der PCR- und RT-PCR-Produkte wurde entweder das „MultiScreen Vacuum Manifold 96-well“ mit „MultiScreen₉₆ PCR Plate“ (Millipore) oder das „QIAquick Gel Extraction Kit“ (Qiagen) verwendet.

3.1.6.1 Aufreinigung mittels „MultiScreen₉₆ PCR Plate“

Die PCR-Produkte wurden über Ultrafiltration mit der „MultiScreen₉₆ PCR Plate“ nach den Angaben des Herstellers aufgereinigt.

Kurzprotokoll

- PCR-Produkt auf 100µl mit H₂O (Merck) auffüllen
- auf die „MultiScreen₉₆ PCR Plate“ pipettieren
- Vakuum anlegen (PCR-Produkt < 250bp ~ 10inHg; PCR-Produkt > 250bp 20-24inHg)
- PCR-Produkt mit 300µl H₂O waschen
- PCR-Produkt mit 20µl H₂O von der Membran lösen

3.1.6.2 Aufreinigung mittels „QIAquick Gel Extraction Kit“

Zeigten PCR-Produkte nach elektrophoretischer Auftrennung (siehe Punkt 3.1.8) unspezifische Nebenprodukte, wurde die gewünschte Bande aus dem Agarosegel ausgeschnitten und aufgereinigt.

Kurzprotokoll

- Gelstück in 1,5ml Reagiergefäß (Sarstedt) geben
- mit QG Buffer versetzen (1 Volumen Agarosegel : 3 Volumen QG Buffer)
- im Heizblock inkubieren (50°C, 10min, 1.400rpm)
- mit 1 Volumen Agarosegel Isopropanol versetzen (falls PCR-Produkt < 500bp oder > 4kb)
- Lösung auf QIAquick Säule pipettieren
- zentrifugieren (1min, 10.000rpm (Biofuge pico, Heraeus))
- 1x mit 500µl QG Buffer und 2x 500µl PE Buffer waschen (jeweils 1min, 10.000rpm)
- zum Trocknen zentrifugieren (3min, 13.000rpm)
- mit 30µl H₂O in 1,5ml Reagiergefäß (Sarstedt) eluieren (1min, 13.000rpm)

3.1.7 Konzentrationsbestimmung von DNA und RNA in Lösung

Die genaue Konzentration von DNA und RNA wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von $\lambda = 260\text{nm}$ und 280nm bestimmt. Dazu wurden die Absorptionen im Spektrophotometer ND-1000 (NanoDrop Technologies) ermittelt. Eine optische Dichte von 1 bei 260nm (OD_{260}) entspricht $50\mu\text{g/ml}$ dsDNA, bzw. $40\mu\text{g/ml}$ RNA. Der Quotient aus der OD_{260} und der OD_{280} ist ein Grad für die Reinheit der Lösung. Er beträgt für reine DNA 1,8 und für reine RNA 2,0.

3.1.8 Gelelektrophorese

6x DNA-Probenpuffer	1,5g 2,5mg 2,5mg 200 μl ad 10ml	Ficoll 400 (Amersham) Bromphenolblau (Merck) Xylencyanol FF (Merck) 0,5M EDTA-Lösung H ₂ O (Merck)
10x TAE-Puffer	48,4g 11,4ml 20ml ad 1l	Tris Base (Sigma) Essigsäure (J.T. Baker) 0,5M EDTA-Lösung H ₂ O
5x TBE-Puffer	54,0g 27,5g 20ml ad 1l	Tris Base (Sigma) Borsäure (Sigma) 0,5M EDTA-Lösung H ₂ O
1kb DNA-Leiter	50 μl 100 μl 850 μl	1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ 1kb Ladder (Invitrogen) 6x DNA-Probenpuffer H ₂ O (Merck)
pUC19 DNA <i>MspI</i> (<i>HpaII</i>) geschnitten	100 μl 200 μl 900 μl	0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ pUC19 (MBI Fermentas) 6x Loading Dye (MBI Fermentas) H ₂ O (Merck)

PCR-Produkte wurden auf 1-2 %igen (w/v) Agarosegelen der Größe nach aufgetrennt. Die Agarose wurde in TAE-Puffer aufgekocht und mit $0,4\mu\text{g/ml}$ Ethidiumbromid (EtBr (10mg/ml), Invitrogen) versetzt. Als Laufpuffer diente ebenfalls TAE mit $0,4\mu\text{g/ml}$ EtBr. Den PCR-Produkten wurde 6x DNA-Probenpuffer zugegeben. Die Auftrennung im elektrischen Feld erfolgte bei 4V/cm Elektrodenabstand. Zur Ermittlung der spezifischen Größe der jeweiligen PCR-Produkte dienten verschiedene Größenstandards. Durch das in die DNA interkalierende EtBr konnte die DNA auf einem Transilluminator bei einer Wellenlänge von $\lambda = 312\text{nm}$ sichtbar gemacht werden.

3.1.8.1 Gelelektrophorese mit MetaPhor Agarose (Cambrex)

Deletionen ab 3bp in einem etwa 100bp großen PCR-Produkt können mit Hilfe von hochprozentigen und hochauflösenden Agarosegelen nachgewiesen werden. Hierfür wurden 5%ige (w/v) MetaPhor Agarosegele in TBE-Puffer verwendet. Der TBE-Puffer sorgt für eine geringere Porengröße im Vergleich zum TAE-Puffer. Für eine optimale Auflösung ist darauf zu achten, dass das Gel eine Stärke von 3-4mm hat und maximal 5mm mit TBE-Puffer überschichtet wird. Die Elektrophorese wurde mit 6V/cm Elektrodenabstand durchgeführt. Die Gele wurden wie im Folgenden beschrieben hergestellt.

Kurzprotokoll

- TBE-Puffer vorlegen und auf hoher Stufe rühren (Teflon beschichteter Rührstab!)
- die MetaPhor Agarose langsam in den TBE-Puffer einrieseln lassen (rühren!)
- die Lösung 15min quellen lassen
- Kolben wiegen
- die Lösung erhitzen (1min, Mikrowelle, 600W), anschließend 15min ruhen lassen
- die Lösung erhitzen (2min, Mikrowelle, 600W), 1min auf mittlerer Stufe rühren (blasenfrei!)
- die Lösung aufkochen (Mikrowelle, 600W), 1min auf mittlerer Stufe rühren (blasenfrei!)
- die Lösung 1min kochen lassen
- Kolben erneut wiegen, Verlust mit H₂O nachfüllen
- die Lösung auf mittlerer Stufe rühren bis sie auf 55°C abgekühlt ist (blasenfrei!)
- das Gel gießen und auf RT abkühlen lassen
- das Gel bei 4°C für 20min kühl stellen

3.1.9 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierung von klonierten PCR-Produkten und von PCR- und RT-PCR-Produkten wurde mit dem „Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 / v3.1“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Je nach Konzentration des Produkts wurde ein 10µl bzw. 20µl Sequenzierungsansatz gewählt. Die Ansätze und das Programm waren wie folgt.

Seq. Ansätze			10µl	20µl	Seq. Programm	
PCR-Produkt	100-200bp	≤ 5ng	5-20ng	5-20ng	96°C	1min
	200-500bp	≤ 10ng			96°C	10s
	500-1000bp	≤ 20ng			55°C	5s
Ready Reaction Premix*			4µl	4µl	60°C	4min
5x BigDye Sequencing Buffer*			-	2,5µl		
Primer (5µM)			1µl	2µl		
H ₂ O (Merck)			ad 10µl	ad 20µl		
					25 Zyklen	

*„Big Dye Terminator Cycle Sequencing Kit v1.1 / v3.1“

3.1.10 Quantitative Analyse des allelischen Transkriptverhältnisses

Um das allelische Transkriptverhältnis eines biallelisch exprimierten Gens zu bestimmen wurden „quantitative-primer-extension“-Analysen (SNaPshot-Analysen) durchgeführt. Hierfür wurden Primer entwickelt, die mit ihrem 3'-Ende direkt an einem exprimierten Polymorphismus liegen. In der SNaPshot-Reaktion wird der Primer um ein farbmarkiertes Didesoxynukleotid verlängert und so spezifisch mit den komplementären Basen des Polymorphismus markiert. Bei der anschließenden Auswertung am Genetic Analyzer 3100 (Applied Biosystems) kann aus den Signalintensitäten der farbmarkierten Primer der beiden Allele das Transkriptverhältnis bestimmt werden. Die Analysen wurden mit dem „SNaPshot Multiplex Kit“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Als Matrize dienten 60ng aufgereinigtes RT-PCR-Produkt, oder 100ng aufgereinigtes PCR-Produkt. Die Ansätze und das Programm waren wie folgt.

SNaPshot-Ansatz		SNaPshot-Programm	
RT-PCR- (PCR-) Produkt	60ng (100ng)	96°C	3min
Ready Reaction Premix*	5µl	96°C	10s
Primer (0,2µM)	1µl	54°C	5s
H ₂ O	ad 10µl	60°C	30s
* „SNaPshot Multiplex Kit“		25 Zyklen	

Für die Primer zur Untersuchung der verschiedenen exprimierten SNPs **siehe Anhang**.

3.1.11 Aufreinigung von Sequenzierungsreaktions- und SNaPshot-Produkten

Die Sequenzierungsreaktions- und SNaPshot-Produkte wurden über Sephadex Säulen aufgereinigt.

Das Sephadex G-50 Fine (GE Healthcare) wurde mit dem MultiScreen 45µl Loader (Millipore) abgemessen, in eine MultiScreen_{HTS}-HV Plate (Millipore) überführt und mit 300µl H₂O (Merck) für 3h quellen gelassen. Bei 2.750rpm (Centrifuge 5403, 16M 2-MT, Eppendorf) wurde das überschüssige Wasser abzentrifugiert und zweimal mit 150µl H₂O gewaschen. Die Aufreinigung der Sequenzierungsreaktions- und SNaPshot-Produkte wurde wie folgt durchgeführt.

Kurzprotokoll (Sequenzierungsreaktionsprodukte)

- Ansatz mit 1µl 2,2% (w/v) SDS versetzen
- 5min auf 98°C erhitzen
- mit 20µl H₂O (Merck) verdünnen
- auf Sephadex Säulen pipettieren
- zentrifugieren (5min, 2750rpm)
- Ansatz mit 20µl Hi-Di™ Formamid (Applied Biosystems) versetzen
- Analyse im 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)
- Dye Set: E (Big Dye® Kit v1.1)
Z (Big Dye® Kit v3.1)
- Mobility File: DT3100POP6{BD}v2.mob
- Run Module: Seq50_10s_4000s
Seq50_20s_4000s
Seq50_20s_6500s
- Analysis Module: BC_3100POP6SR_seqOffFtOff.saz
- Auswertung mit Sequencing Analysis 3.7 (Applied Biosystems) und Sequencher 4.5 (Gene Codes Corporation) Software

Kurzprotokoll (SNaPshot-Produkte)

- Ansatz mit 1µl 2,2% (w/v) SDS versetzen
- 5min auf 98°C erhitzen
- mit 20µl H₂O (Merck) verdünnen
- auf Sephadex Säulen pipettieren
- zentrifugieren (5min, 2750rpm)
- 2-4µl je Ansatz mit 0,25µl „GeneScan™ size standard“ (Applied Biosystems) versetzen, auf 10µl mit Hi-Di™ Formamid auffüllen
- Ansätze denaturieren (98°C, 2min, anschließend sofort in Eiswasser stellen)
- Analyse im 3100 Genetic Analyzer
- Dye Set: E5
- Run Module: GS_POP6_11s_2000s
GS_POP6_22s_2000s
- Analysis Module: GS120Analysis.gsp
- Auswertung mit GeneScan Analysis 3.7 (Applied Biosystems) und Genotyper 3.7 (Applied Biosystems) Software

3.1.12 Quantitative Expressionsanalyse

Zur Bestimmung der Transkriptmenge insgesamt von *BAPX1* wurden „TaqMan Gene Expression Assays“ (Applied Biosystems) durchgeführt. Bei dieser PCR bindet eine Sonde mit zwei Fluorophoren (einem Reporter-Fluorophor und einem Quencher-Fluorophor) an die Zielsequenz. Sind beide Fluorophore an die Sonde gebunden wird die Emission des Reporters gequencht. Während der Elongation der PCR wird die Sonde verdrängt und die 5'-3'-Exonukleaseaktivität der Taq DNA-Polymerase baut die Sonde ab. Der Reporter Fluorophor wird frei und emittiert seine Lichtenergie, die über einen Laser detektiert werden kann. Über den Verlauf der PCR des untersuchten Gens, im Vergleich zu Referenzgenen, kann die Transkriptmenge insgesamt von *BAPX1* bestimmt werden. Als Referenzgene für RNA aus Fibroblasten wurden *HPRT1*, *YWHAZ* und *GAPDH* verwendet (Vandesompele et

al., 2002). Alle „TaqMan Gene Expression Assays“ wurden als „assay on demand“ (Applied Biosystems) bezogen.

Für die TaqMan-Analysen wurden 2µg RNA aus kultivierten primären Fibroblasten in cDNA übersetzt (siehe Punkt 3.1.5). Die Ansätze und das Programm waren wie folgt.

TaqMan Ansätze		TaqMan Programm	
cDNA	300ng	95°C	10min
TaqMan Gene Expression Assay (20x)*	1µl	95°C	15s
TaqMan Universal PCR Master Mix (2x)*	10µl	60°C	1min
H ₂ O	ad 20µl		
* (Applied Biosystems)		45 Zyklen	

Die Daten wurden mit dem Programm ABI Prism 7000 SDS (Applied Biosystems) ausgewertet.

3.1.13 Bisulfit-Behandlung von genomischer DNA (nach Frommer *et al.*, 1992)

Bisulfit-Lösung		unter N ₂ Schutzgas
	4,25g	Natriumbisulfit (Sigma)
	450µl	50mM Hydrochinon (Merck)
	500µl	10M NaOH (Merck)
	ad 7,5ml	H ₂ O (Merck)

Für die Untersuchung der DNA-Methylierung wird genomische DNA mit 0,3M Alkali vollständig denaturiert und anschließend mit Natriumbisulfit behandelt. Hierbei werden nicht-methylierte Cytosine deaminiert und in Uracile umgewandelt. Bei einer anschließenden PCR werden Uracile durch das DNA-Analog Thymin ersetzt. Methylierte Cytosine sind gegen diese chemische Umwandlung geschützt und verbleiben so als Cytosine. Für die Bisulfit-Behandlung ist die vollständige Denaturierung der genomischen DNA essenziell. Hierzu wurden 50µl DNA-Lösung (2-5µg) mit 5,5µl 3M NaOH versetzt und bei 37°C für 15min inkubiert. Anschließend wurde die Lösung in einem vorgeheizten Thermoblock auf 95°C für 2min erhitzt und dann sofort in Eiswasser „schockgekühlt“. Die denaturierte DNA wurde mit 500µl Bisulfit-Lösung versetzt und unter Lichtausschluss für 16-20h bei 50°C inkubiert.

Die Aufreinigung der Bisulfit-behandelten DNA erfolgte mit dem Wizard DNA Clean-Up System (Promega).

Kurzprotokoll

- Bisulfit-behandelte DNA mit 1ml Wizard DNA Clean-Up Resin versetzen
- Lösung auf Wizard Minicolumns pipettieren
- Vakuum anlegen (nach Durchlauf weitere 30s Vakuum halten)
- mit 2ml 80% (v/v) Isopropanol waschen (nach Durchlauf weitere 30s Vakuum halten)
- Wizard Minicolumns in 1,5ml Reagiergefäß (Sarstedt) überführen
- zentrifugieren (2min, 10.000rpm (Biofuge pico, Heraeus))
- mit 50µl H₂O (65°C) 1min inkubieren, eluieren (20s, 13.000rpm)
- mit 5,5µl 3M NaOH versetzen, inkubieren (37°C, 15min)
- mit 55µl 6M NH₄OAc neutralisieren
- DNA mit 350µl EtOH abs. und 1µl Glycogen fällen, zentrifugieren (20min, 13.000rpm)
- mit 300µl 70% (v/v) EtOH waschen (5min, 13.000rpm)
- Pellet trocknen (7min, SpeedVac[®] plus (Savant) + Heizung)
- in 30µl H₂O aufnehmen

3.1.14 Ligation

Um den Methylierungsstatus des *BAPX1*-5'-Bereichs auf Ein-Zell-Ebene untersuchen zu können, mussten die aufgereinigten PCR-Produkte der Bisulfit-behandelten DNA kloniert werden. Hierzu wurden zunächst die PCR-Produkte in einen Vektor ligiert. Die Ligation wurde mit dem „pGEM-T Easy Vector System I“ (Promega) durchgeführt. Die Ansätze waren wie folgt.

Ligationsansätze	Probe	pos. Kontrolle	neg. Kontrolle
2x Rapid Ligation Buffer, T4 DNA Ligase*	5µl	5µl	5µl
pGEM-T Easy Vector*	1µl	1µl	1µl
PCR-Produkt	3µl	-	-
Control Insert DNA*	-	2µl	-
T4 DNA Ligase*	1µl	1µl	1µl
H ₂ O	-	1µl	3µl

*„pGEM-T Easy Vector System I“

Die Ansätze wurden bei 4°C über Nacht inkubiert und anschließend in Bakterien transformiert (siehe Punkt 3.2.2).

3.2 Arbeiten mit Bakterien

<i>E.coli</i> DH5 α	F', endA1, hsdR17, ($r_k^- m_k^+$), supE44, thi-1, recA1, gyrA, (Nal ^r), relA1, D(lacIZYA-argF), U169, deoR, (Φ 80dlacD(lacZ)M15)
LB-Medium	5g Trypton (BD Biosciences) 2,5g Hefe Extrakt (BD Biosciences) 5g NaCl (Merck) ad 500ml H ₂ O Medium autoklavieren

3.2.1 Herstellung kompetenter Bakterien

LB-Platten	5g Trypton 2,5g Hefe Extrakt 5g NaCl 6g Agar (BD Biosciences) ad 500ml H ₂ O Lösung autoklavieren
TFB1-Puffer	12,1g RbCl ₂ (Merck) 9,9g MnCl ₂ (Merck) 2,9g KOAc (Merck) 1,1g CaCl ₂ (Merck) 15ml Glycerin (Merck) ad1l H ₂ O auf pH 5,8 mit 0,2M HAc (J.T. Baker) Puffer autoklavieren
TFB2-Puffer	2,1g MOPS (Sigma) 1,2g RbCl ₂ 8,3g CaCl ₂ 15ml Glycerin ad1l H ₂ O auf pH 6,5 mit 1M KOH (Merck) Puffer autoklavieren

Bakterien (*E. coli*-Stamm DH5 α), die DNA aus der sie umgebenen Lösung aufnehmen können, wurden nach einem leicht modifizierten Protokoll der Rubidiumchlorid-Methode (Maniatis *et al.*, 1989) hergestellt.

Kurzprotokoll

- DH5 α auf LB Platte ausstreichen, inkubieren (37°C, über Nacht)
- 10ml LB-Medium animpfen (Vorkultur)
- inkubieren (37°C, ca. 2h, 250rpm, OD₅₅₀: 0,3)
- 100ml LB-Medium mit 5ml Vorkultur animpfen
- inkubieren (37°C, ca. 2,5h, 250rpm, OD₅₅₀: 0,48)
- Kultur auf vier gekühlte 50ml Gefäße verteilen, inkubieren (auf Eis, 5min)
- zentrifugieren (4°C, 15min, 3000rpm (Avanti™ J-20 XP, JS-5.3 Rotor, Beckman Coulter))
- in je 10ml kaltem TBF1-Puffer vorsichtig resuspendieren
- inkubieren (auf Eis, 90min)
- zentrifugieren (4°C, 15min, 3000rpm)
- in je 1ml kaltem TBF2-Puffer vorsichtig resuspendieren
- aliquotieren (100 μ l), in N₂ einfrieren, bei -80°C lagern

3.2.2 Transformation kompetenter Bakterien

LB _{amp/X-Gal} -Platten	5g	Trypton
	2,5g	Hefe Extrakt
	5g	NaCl
	6g	Agar (BD Biosciences)
ad 500ml	H ₂ O	
		Lösung autoklavieren, auf 50°C abkühlen lassen
	2ml	25mg/ml Ampicillin/H ₂ O (Roche/Merck)
	800 μ l	20mg/ml X-Gal/DMF (BioVectra/Merck)

Zur Aufnahme zirkulärer DNA (Plasmid) in Bakterien, werden die Zellen einem „heat shock“ ausgesetzt, der bewirkt, dass die Zellmembran durchlässig wird und das Plasmid aufgenommen werden kann.

Kurzprotokoll

- 5 μ l Ligationsansatz mit 50 μ l kompetenten DH5 α mischen, inkubieren (auf Eis, 30min)
- „heat shock“ (42°C (Wasserbad), 2min), anschließend 2min auf Eis
- DH5 α -Suspension mit 450 μ l LB-Medium versetzen, inkubieren (37°C, 1h, 225rpm)
- je 150 μ l und 300 μ l DH5 α -Suspension auf LB_{amp/X-Gal}-Platten ausstreichen
- inkubieren (37°C, über Nacht)

Für MINI Kulturen wurden je 4ml LB-Medium (+16 μ l Ampicillin) angeimpft und bei 37°C über Nacht inkubiert (250rpm).

3.2.3 Plasmid-Präparation (MINI Präp)

RNase-Lösung	2,5µl	RNase A (Boehringer)
	1µl	RNase T1 (Roche)
	496µl	H ₂ O (Merck)

Zur Präparation der Plasmide wurden die Bakterien einer alkalischen Lyse unterzogen und die DNA wurde durch Fällung isoliert.

Kurzprotokoll

- je 1,5ml MINI Kultur in 1,5ml Reagiergefäß (Sarstedt) pipettieren
- zentrifugieren (4°C, 5min, 5000rpm (Centrifuge 5804, 16F 24-11, Eppendorf))
- Pellet in 300µl P1 Buffer (Qiagen) resuspendieren
- mit 300µl P2 Buffer (Qiagen) versetzen, inkubieren (RT, 3min)
- mit 300µl P3 Buffer (Qiagen) neutralisieren, zentrifugieren (4°C, 15min, 13.000rpm)
- Überstand mit 500µl EtOH abs. versetzen, zentrifugieren (RT, 20min, 13.000rpm)
- mit 300µl 70% (v/v) EtOH waschen (RT, 5min, 13.000rpm)
- Pellet 5min in SpeedVac[®] plus (Savant) trocknen
- Pellet in 20µl RNase-Lösung aufnehmen, inkubieren (37°C (Wasserbad), 1h)

3.3 Arbeiten mit kultivierten primären Fibroblasten

Die Arbeiten wurden ausnahmslos unter einer Sterilbank durchgeführt. Sämtliche Geräte und Lösungen wurden vor der Benutzung sterilisiert.

3.3.1 Kultivieren von primären Fibroblasten

3.3.1.1 Ansetzen einer primären Fibroblastenkultur

Da das Material einer Hautbiopsie oder von operativen Eingriffen selbst nicht ausreicht, um daraus ausreichend DNA und RNA für die Untersuchungen zu präparieren, wurden primäre Fibroblastenkulturen angelegt. Das Gewebe wurde unter dem Binokular mit Präparierbesteck in möglichst kleine Stücke zerteilt und in 50ml (25cm²) Gewebekulturflaschen (greiner bio-one) mit 4ml AmnioMax-C100 Basal-Medium (Gibco) plus AmnioMax-C100 Supplement (Gibco) (im folgenden Kulturmedium) im Brutschrank kultiviert (37°C, 5% (v/v) CO₂, wassergesättigte Atmosphäre). Nach sieben Tagen erfolgte der erste Mediumwechsel. Danach wurde alle zwei bis drei Tage ein Mediumwechsel durchgeführt.

3.3.1.2 Passagieren von kultivierten primären Fibroblasten

Nachdem die Gewebekulturflaschen konfluent mit primären Fibroblasten bewachsen waren, wurden die Kulturen passagiert. Dazu wurde das Kulturmedium von den Fibroblasten abgegossen, die Zellen wurden einmal mit 2ml Trypsin-EDTA (Gibco) gewaschen und mit 2ml Trypsin-EDTA für 2-5min bei 37°C inkubiert. Die Suspension wurde mit 6ml Kulturmedium versetzt und in eine 250ml (75cm²) Gewebekulturflasche oder in zwei 50ml (25cm²) Gewebekulturflaschen überführt.

3.3.1.3 Ernte von kultivierten primären Fibroblasten für DNA- und RNA-Präparation

Das Kulturmedium wurde in ein 15ml Probenröhrchen (greiner bio-one) abgegossen, die Zellen wurden einmal mit 2ml Trypsin-EDTA gewaschen und mit 2ml Trypsin-EDTA bei 37°C für 2-5min 37°C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in das Probenröhrchen überführt und 10min bei 1.000rpm (Megafuge 1.0, BS4402/A, Heraeus) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet zweimal mit NaCl/EDTA gewaschen (zentrifugieren für 10min, 1.000rpm). Das Pellet wurde in 1ml NaCl/EDTA resuspendiert und in ein 1,5ml Reagiergefäß (Sarstedt) überführt.

3.3.1.4 Einfrieren und Lagerung von kultivierten primären Fibroblasten

Zum Einfrieren von kultivierten primären Fibroblasten wurde das Kulturmedium in ein 15ml Probenröhrchen gegeben und die Zellen mit 2ml Trypsin-EDTA bei 37°C für 2-5min inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in das Probenröhrchen überführt und 10min bei 1.000rpm zentrifugiert. Das Pellet wurde in 500µl Kulturmedium (+100µl DMSO) resuspendiert und sofort auf Eis gelagert. Die Zellen wurden zunächst für ca. 14 Tage bei -80°C gekühlt, bevor sie in flüssigem Stickstoff gelagert wurden.

3.3.1.5 Auftauen von kultivierten primären Fibroblasten

Die eingefrorene Kultur wurde aus dem flüssigen Stickstoff möglichst schnell aufgetaut, mit 1ml Kulturmedium gemischt, in ein 15ml Probenröhrchen überführt und dann für 10min bei 1.000rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde mit 2ml Kulturmedium gewaschen (zentrifugieren für 10min, 1.000rpm) und in 1ml Kulturmedium resuspendiert. Die Suspension wurde mit 3ml Kulturmedium versetzt, in eine Gewebekulturflasche überführt und mindestens 4 Tage im Brutschrank inkubiert.

3.3.2 Inhibitor-Experimente mit kultivierten primären Fibroblasten

Um epigenetische Regulationsmechanismen der Expression von *BAPX1* zu untersuchen wurden kultivierte primäre Fibroblasten mit zwei verschiedenen Methyltransferase-Inhibitoren und einem Histondeacetylase-Inhibitor behandelt. Die Behandlung mit dem Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2-desoxycytidin (5-Aza-dC (Sigma)) und dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA (Sigma)) erfolgte in Anlehnung an ein Protokoll von Kondo *et al.* (Kondo *et al.*, 2003). Die Behandlung mit dem Methyltransferase-Inhibitor RG108 erfolgte nach den Angaben von F. Lyko (DKFZ, Heidelberg), der RG108 freundlicherweise zur Verfügung gestellt hat. Die Zellkulturen wurden 12-24h vor der Behandlung geteilt und dann wie folgt mit 5-Aza-dC, RG108 und TSA (in zwei unterschiedlichen Konzentrationen) und einer Kombination aus 5-Aza-dC und TSA (in zwei unterschiedlichen Konzentrationen) behandelt. Als Kontrollen wurden Kulturen mit PBS (Lösungsmittel für 5-Aza-dC (Gibco)), DMSO (Lösungsmittel für TSA (J.T. Baker)) und 10% (v/v) DMSO in H₂O (Lösungsmittel für RG108) behandelt.

Kurzprotokoll (Behandlung mit 5-Aza-dC)

- 12-24h vor der Behandlung mit 5-Aza-dC Kultur teilen
- 100µl 2mM 5-Aza-dC in PBS pro 4ml Medium zur Kultur geben
- Inkubation für 72h
- Mediumwechsel alle 24h (Medium mit 5-Aza-dC)
- als Kontrolle eine Kultur mit 100µl PBS

Kurzprotokoll (Behandlung mit TSA)

- 12-24h vor der Behandlung mit TSA Kultur teilen
- 10µl (20µl) 300µM TSA in DMSO pro 4ml Medium zur Kultur geben
- Inkubation für 48h
- Mediumwechsel alle 24h (Medium mit TSA)
- als Kontrolle eine Kultur mit 20µl DMSO

Kurzprotokoll (Behandlung mit 5-Aza-dC + TSA)

- 12-24h vor der Behandlung mit 5-Aza-dC + TSA Kulturen teilen
- 100µl 2mM 5-Aza-dC in PBS pro 4ml Medium zur Kultur geben
- Inkubation für 48h
- Mediumwechsel alle 24h (Medium mit 5-Aza-dC)
- 20µl (40µl) 300µM TSA in DMSO pro 4ml Medium zur Kultur geben
- Inkubation für 24h
- als Kontrolle eine Kultur mit 100µl PBS für 48h und 40µl DMSO für 24h

Kurzprotokoll (Behandlung mit RG108)

- 12-24h vor der Behandlung mit RG108 Kulturen teilen
- 40µl 5mM RG108 in 10% (v/v) DMSO in H₂O pro 4ml Medium zur Kultur geben
- Inkubation für 72h (Medium mit RG108)
- Mediumwechsel alle 24h

4. Ergebnisse

Um eine Ursache für das Okulo-Aurikulo-Vertebrale Spektrum (OAVS, OMIM %164210) zu identifizieren, wurden verschiedene Gene auf Mutationen untersucht. Zum einen wurden Kandidatengene untersucht, in denen Mutationen zu möglichen allelischen Fehlbildungssyndromen führen. Zum anderen wurde eine Mutationsanalyse in den Genen durchgeführt, die als positionelle und funktionelle Kandidatengene aus der Untersuchung der Patientin mit OAVS, multiplen kartilaginären Exostosen und einer Translokation t(4;8)(p15.3;q24.1) hervorgegangen sind.

Für alle Kandidatengene wurden Sequenzanalysen durchgeführt, um mögliche Mutationen zu identifizieren. Hierbei wurden auch die konservierten 5'- und 3'-Spleißsignale („splice donor site“ und „splice acceptor site“) und exonische Sequenzen, die das Spleißen unterstützen können, so genannte „exonic splice enhancer“ (ESEs), auf Mutationen untersucht (Cartegni *et al.*, 2002).

4.1 Mutationsanalyse in Genen möglicher allelischer Fehlbildungssyndrome

Für Fehlbildungssyndrome, die aufgrund ihrer phänotypischen Überlappungen zu einer Gruppe von Syndromen zusammengefasst werden können, wird diskutiert, ob diese auch eine gemeinsame genetische Ursache haben (allelische Fehlbildungssyndrome, Winter, 1996). Für zwei mögliche allelische Fehlbildungssyndrome von OAVS, dem Treacher Collins-Syndrom (TCS, OMIM #154500) und der Branchio-Oto-Renalen Dysplasie (BOR, OMIM #113650) sind die ursächlichen Gene (*TCOF1* bzw. *EYA1*) bekannt und sollten bei Patienten mit OAVS und überlappendem Phänotyp zu einer der beiden Erkrankungen untersucht werden.

4.1.1 Mutationsanalyse im *TCOF1*-Gen

Das *TCOF1*-Gen, bestehend aus 27 Exons, wurde 1996 als das hauptverantwortliche Gen für das Treacher Collins-Syndrom identifiziert (Treacher Collins Collaborative Group, 1996). Um zu überprüfen, ob bei Patienten mit OAVS eine krankheitsverursachende Mutation im *TCOF1*-Gen vorliegt, wurden zehn bilateral betroffene Patienten mit OAVS und einem mit dem TCS überlappenden Phänotyp auf Veränderungen im *TCOF1*-Gen untersucht. Es wurden 14 Veränderungen, jedoch keine Mutation nachgewiesen (Tabelle 4.1). Ein weiterer

Patient mit OAVS, der im Rahmen eines Forschungsprojekts zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei TCS untersucht wurde, hatte ebenfalls keine Mutation im *TCOF1*-Gen (Teber *et al.*, 2004).

Tabelle 4.1: Sequenzveränderungen im *TCOF1*-Gen bei 11 Patienten mit OAVS

Variation	Lokalisation	Nukleotid Veränderung	betroffene Aminosäure	Allelfrequenz Patienten
1	Exon 3	c.230 G>A *	R77H	01/20
2	Intron 6	c.639+32 C>T ^S	-	01/20
3	Intron 7	c.852+39 A>G *	-	17/20
4	Exon 10	c.1347 T>C ^{W,S}	P449P	15/20
5	Exon 11	c.1530 G>T ^S	G510G	02/20
6	Exon 11	c.1611 G>A ^{W,S}	S537S	15/20
7	Exon 12	c.1762 C>G ^H	P588A	17/20
8	Intron 15	c.2428-20 ins CTCTC ^W	-	10/20
9	Exon 16	c.2429 C>T ^{E,W,S}	A810V	18/20
10	Intron 19	c.3066+66 C>T ^S	-	02/20
11	Intron 20	c.3287-34 G>A *	-	02/20
12	Exon 21	c.3296 C>G ^S	P1099R	04/20
13	Intron 21	c.3370-3 C>T *	-	02/20
14	Exon 23	c.3938 C>T ^{E,S}	A1313V	07/20

* neu identifizierter Polymorphismus; ^S (Splendore *et al.*, 2000); ^W (Wise *et al.*, 1997);
^H (Haga *et al.*, 2002); ^E (Edwards *et al.*, 1997)

Die bei Patienten mit OAVS nachgewiesenen Basensubstitutionen im *TCOF1*-Gen, die in Tabelle 4.1 zusammengefasst sind, lassen sich bei Normalpersonen wie auch bei Patienten mit klinisch sicherer Diagnose TCS finden. Es handelt sich demnach höchstwahrscheinlich um Polymorphismen, und es kann davon ausgegangen werden, dass es sich beim TCS und dem OAVS nicht um allelische Fehlbildungssyndrome handelt. Dies steht im Einklang mit den Ergebnissen neuerer Arbeiten (Splendore *et al.*, 2000; Teber *et al.*, 2004; Thiel *et al.*, 2005).

4.1.2 Mutationsanalyse im *EYA1*-Gen

In der Literatur werden mehrere Patienten mit einem überlappenden Phänotyp von OAVS und der Branchio-Oto-Renalen Dysplasie beschrieben (Cohen *et al.*, 1989; Sensi *et al.*, 1996). Ein für BOR ursächliches Gen ist das humane Ortholog des *Drosophila eyes absent*-Gens, *EYA1*. Das Gen besteht aus 17 Exons und erstreckt sich über eine Länge von ca. 160kb. Das *EYA1*-Gen kodiert für zwei alternativ gespleißte Transkripte (*EYA1A* und *B*), die sich in der Nutzung der ersten beiden 5'-Exons (Exon 0 und Exon 1) unterscheiden (Abdelhak *et al.*, 1997a; Abdelhak *et al.*, 1997b). Es wurden aus unserem Patientenkollektiv zwölf Patienten ausgewählt, bei denen einzelne überlappende klinische Zeichen von OAVS und BOR vorliegen, um sie auf Veränderungen im *EYA1*-Gen zu untersuchen.

Tabelle 4.2: Sequenzveränderungen im *EYA1*-Gen bei 12 Patienten mit OAVS (normal: *EYA1A*, kursiv: *EYA1B*)

Variation	Lokalisation	Nukleotid Veränderung	betroffene Aminosäure	Allelfrequenz Patienten
1	Intron 4	c.319+40 G>C c.418+40 G>C	-	1/24
2	Exon 6	c.510 A>G c.609 A>G	T170T T203T	4/24
3	Intron 6	c.540+39 T>G c.639+39 T>G	-	14/24
4	Exon 12	c.1179 C>T c.1278 C>T	G393G G426G	2/24
5	Intron 12	c.1261+53 C>T c.1360+53 C>T	-	8/24
6	Intron 13	c.1376+85 G>T c.1475+85 G>T	-	8/24
7	Intron 14	c.1498+59 C>T c.1597+59 C>T	-	8/24
8	Intron 15	c.1600-23 A>G c.1699-23 A>G	-	8/24
9	Intron 15	c.1600-55 G>A c.1699-55 G>A	-	6/24
10	Exon 16	c.1656 T>C c.1755 T>C	H552H H585H	7/24

Bei der Untersuchung wurden zehn Sequenzveränderungen gefunden, sieben davon in Introns und drei in kodierenden Bereichen, die aber keine Veränderung der Aminosäuresequenz bewirken. Die Variationen in den kodierenden Bereichen sind bereits als Polymorphismen publiziert worden (Abdelhak *et al.*, 1997a; Abdelhak *et al.*, 1997b). Somit konnte bei keinem der Patienten eine Mutation nachgewiesen werden. Damit scheinen Mutationen im *EYA1*-Gen nicht ursächlich für das OAVS zu sein.

4.2 Mutationsanalyse in Kandidatengenem auf Chromosom 4p15

Die Translokation t(4;8)(p15.3;q24.1) in einer Patientin mit OAVS und multiplen kartilaginären Exostosen zerreißt das *EXT1*-Gen auf Chromosom 8, was kausal mit dem Auftreten der Exostosen in Verbindung steht. Der Translokationsbruchpunkt auf Chromosom 4 zerreißt das *RAB28*-Gen im Intron 3. Außerdem liegt das *BAPX1*-Gen 76kb proximal zum Chromosom 4-Bruchpunkt. Diese beiden Gene wurden als positionelle Kandidatengene, *BAPX1* zudem als gutes funktionelles Kandidatengen (siehe Einleitung, Kapitel 1.3.2.3) bei Patienten mit OAVS untersucht.

4.2.1 Mutationsanalyse im *RAB28*-Gen

Das *RAB28*-Gen kodiert für eine GTPase, die eine schwache Homologie (31-33% Sequenzidentität) zu weiteren Mitgliedern der RAB-Familie zeigt. Das Gen wird ubiquitär in zwei Isoformen (*hRab28S*, *hRab28L*) exprimiert, wobei *hRab28L* eine besonders starke Expression in Testis zeigt. Eine spezifische Funktion konnte der GTPase bislang noch nicht zugeordnet werden (Brauers *et al.*, 1996). Das *RAB28*-Gen besteht aus 8 Exons. Die Exons und flankierenden Intronsequenzen wurden einzeln mittels PCR amplifiziert und sequenziert. Die Analyse wurde bei 75 Patienten mit OAVS durchgeführt.

Tabelle 4.3: Sequenzveränderungen im *RAB28*-Gen bei 75 Patienten mit OAVS

Variation	Lokalisation	Nukleotid Veränderung	betroffene Aminosäure	Allelfrequenz Patienten
1	Intron 4	c.391+33 A>C	-	1/150
2	Intron 4	c.392-19 T>C	-	2/150
3	Exon 7	c.579 T>C	I193I	1/150
4	Intron 7	c.663+70 G>C	-	1/150
5	Intron 7	c.664-34 A>G	-	2/150

Es wurden fünf unterschiedliche Sequenzveränderungen gefunden. Eine der Sequenzveränderungen liegt im kodierenden Bereich von Exon 7. Diese Veränderung hat jedoch keine Auswirkung auf die Aminosäuresequenz, und ihr konnte keine weitere Funktion, wie beispielsweise die eines „exonic splice enhancers“, zugeschrieben werden (Cartegni *et al.*, 2002). Vier weitere Sequenzveränderungen liegen in den Introns 4 und 7, betreffen jedoch keine konservierten Spleisignale. Aus diesen Ergebnissen kann keine Bedeutung von *RAB28* bei der Entstehung von OAVS abgeleitet werden.

4.2.2 Mutationsanalyse im *BAPX1*-Gen

Aufgrund seiner chromosomalen Lage und seines embryonalen Expressionsmusters galt *BAPX1* als interessantestes Kandidatengen für OAVS. Es besteht aus zwei Exons, die durch ein etwa 1,4kb großes Intron voneinander getrennt sind. Die Exons liegen in zwei CpG-reichen Regionen, so genannten CpG-Inseln. Um *BAPX1* untersuchen zu können, wurde aufgrund des hohen GC-Gehaltes der Sequenz eine spezielle PCR-Methode in Anlehnung an die Arbeit von Pergolizzi *et al.* etabliert (Pergolizzi *et al.*, 1992). Damit wurde das *BAPX1*-Gen bei 122 Patienten mit OAVS untersucht. Exon 1 wurde in zwei überlappenden PCR-Produkten, Exon 2 in einem PCR-Produkt amplifiziert, und die PCR-Produkte wurden sequenziert.

Tabelle 4.4: Sequenzveränderungen im *BAPX1*-Gen bei 122 Patienten mit OAVS

Variation	Lokalisation	Nukleotid Veränderung	betroffene Aminosäure	Allelfrequenz Patienten	Allelfrequenz Normalpersonen
1	5'-UTR	c.1-10 C>A	-	14/244	16/600
2	Exon 1	c.96 G>A	G32G	02/244	00/600
3	Exon 1	c.126 G>T	S42S	03/244	02/600
4	Exon 1	c.247 A>C*	R83R	87/244	216/600
5	Exon 1	c.292 A>T	S98C	01/244	00/600
6	Exon 1	c.323 C>G	A108G	03/244	01/600
7	Exon 1	c.351 C>G	G117G	02/244	12/600
8	Exon 2	c.493 G>C	D165H	02/244	01/600

*publizierter Polymorphismus (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)

Neben dem bereits in der Datenbank verzeichneten Polymorphismus c.247 A>C konnten sieben weitere Veränderungen identifiziert werden, von denen sechs im kodierenden Bereich liegen und eine in der 5'-UTR von *BAPX1* liegt. Da die Veränderung in der 5'-UTR sowie die Veränderung c.351 C>G auch bei Normalpersonen sehr häufig auftreten, scheint es sich hierbei um weitere Polymorphismen zu handeln. Auffällig ist die Häufung von Sequenzvariationen im ersten Exon. Hier finden sich sechs der insgesamt acht Veränderungen. Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz haben drei Veränderungen, von denen jedoch nur eine (c.292 A>T, S98C) nicht bei Normalpersonen gefunden wurde. Keine der neu identifizierten Sequenzveränderungen liegt in einer der konservierten und funktionell wichtigen Domänen von *BAPX1* (Tribioli & Lufkin, 1997).

Bei Patienten mit einer Sequenzvariante, die zu einer Aminosäuresubstitution führt (c.292 A>T, S98C; c.323 C>G, A108G; c.493 G>C, D165H), sollte untersucht werden, ob die Variante neu in der Familie auftrat oder ob ein Familienmitglied diese Variante vererbt hat

(Segregationsanalyse). In allen Fällen, in denen die Untersuchung von Material der Eltern oder Geschwistern möglich war, konnte gezeigt werden, dass die Sequenzvariante von einem gesunden Elternteil vererbt wurde. In einem Fall konnte sie auch bei dem gesunden Bruder nachgewiesen werden (Abbildung 4.1).

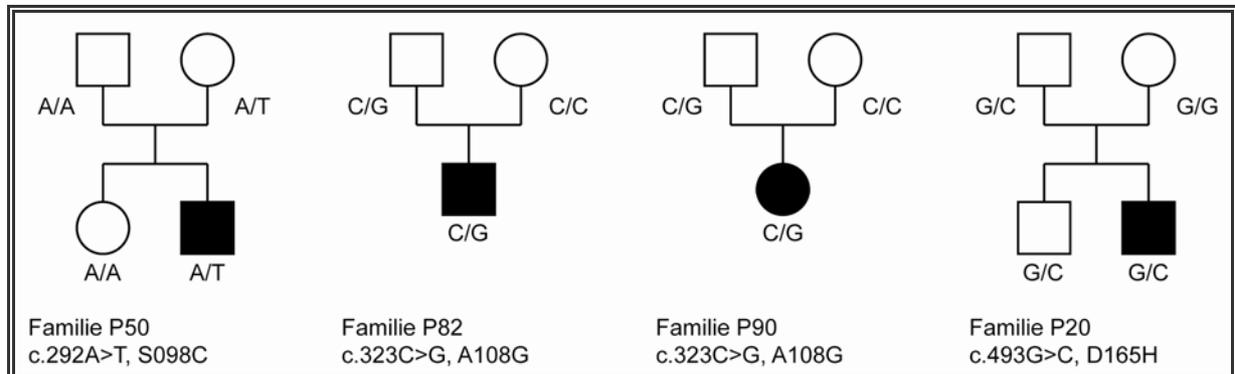


Abbildung 4.1: Segregationsanalysen in vier Familien von Patienten mit OAVS. In allen Fällen konnte die bei den Patienten nachgewiesene Sequenzvariante auch in mindestens einem gesunden Familienmitglied nachgewiesen werden (siehe Genotypen an den jeweiligen Personen). Von zwei Patienten (P57 & P92) stand kein Material der Eltern zur Verfügung. weiß: gesunde Familienangehörige, schwarz: Patienten mit OAVS

Die Mutationsanalyse von *BAPX1* bei Patienten mit OAVS und die Untersuchung der identifizierten Sequenzvariationen bei Normalpersonen ergaben zunächst keinen Hinweis auf eine Beteiligung von *BAPX1* an der Ausprägung von OAVS. Da sich Einzelbasensubstitutionen in den kodierenden Bereichen jedoch auf das korrekte Spleißen der prä-mRNA auswirken können, wurde im Folgenden die Expression von *BAPX1* untersucht.

4.3 Expressionsanalyse des *BAPX1*-Gens

4.3.1 Qualitative Expressionsanalyse des *BAPX1*-Gens

Einzelbasensubstitutionen in den kodierenden Bereichen eines Gens können sich unter Umständen auch dann funktionell auswirken, wenn sie zu keiner Aminosäuresubstitution führen. Dies ist z.B. der Fall bei Mutationen in exonischen Sequenzen, die die Prozessierung der prä-mRNA unterstützen, so genannte „exonic splice enhancer“ (ESE) (Cartegni *et al.*, 2002). ESEs bestehen aus Konsensussequenzen von 6-10bp Länge, die von spezifischen Serin/Arginin-reichen Proteinen erkannt werden. Diese SR-Proteine haben verschiedene Funktionen bei der Prozessierung der prä-mRNA, wie z.B. dem Ausschneiden konstitutiv gespleißter Introns und der Regulation alternativer Spleißvarianten (Graveley, 2000).

Im kodierenden Bereich des *BAPX1*-Gens liegen drei Basensubstitutionen (c.126 G>T, c.323 C>G und c.493 G>C) in Konsensussequenzen für putative ESEs. Die Basensubstitution c.126 G>T führt zum Verlust eines Purins im ESE für das SR Protein SC35. Die Basensubstitution c.323 C>G resultiert in dem Verlust eines konservierten Cytosins im ESE für das Protein SRp40. Die Basensubstitution c.493 G>C zerstört das Sequenzmotiv (GAC)_n, das als Erkennungssequenz für das SR Protein 9G8 dient (Cartegni *et al.*, 2002). Um einen möglichen Effekt dieser Veränderungen auf das Spleißen zu untersuchen, musste zunächst ein Gewebe identifiziert werden, in dem *BAPX1* exprimiert ist. *BAPX1*-mRNA ist weder in Leukozyten noch in Zellen der Mundschleimhaut nachweisbar, wohl aber in Fibroblastenkulturen aus Hautbiopsien (Abbildung 4.2 A&B).

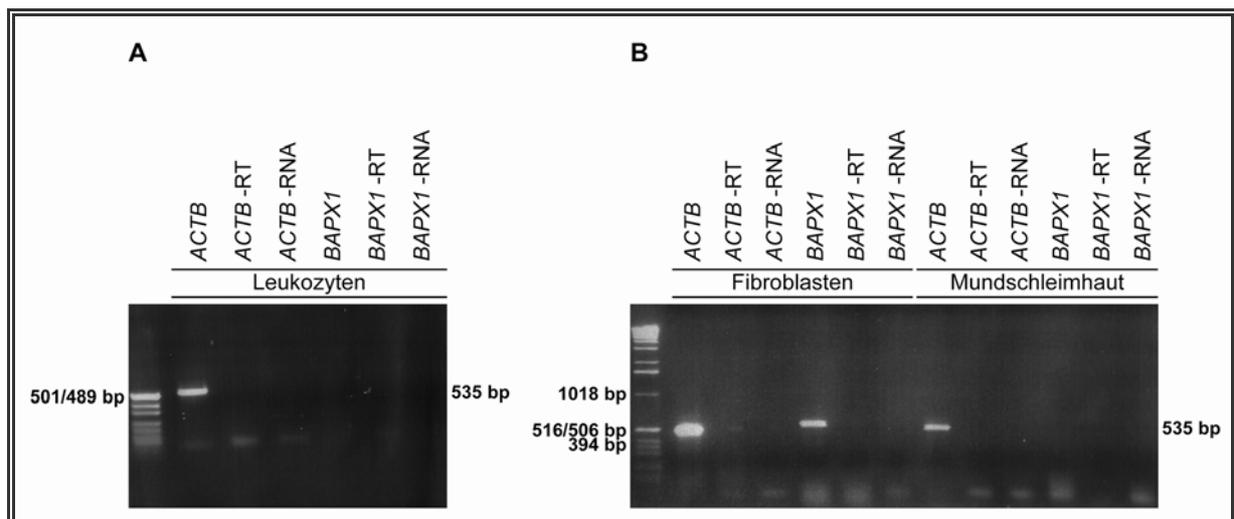


Abbildung 4.2: RT-PCR-Analysen der Expression von *BAPX1* mit RNA aus verschiedenen Geweben. Nachweisbar war die Expression von *BAPX1* in RNA aus Fibroblasten (B: Spur 4), jedoch nicht nachweisbar in RNA aus Leukozyten und aus Zellen der Mundschleimhaut (A: Spur 4, B: Spur 10). *ACTB*: β -Actin (als Kontrollgen), -RT: Kontrolle ohne Reverse Transkriptase, -RNA: Kontrolle ohne RNA

Dementsprechend wurden RT-PCR-Analysen mit RNA aus kultivierten primären Fibroblasten von zwei Patienten mit OAVS (P18 und P20) durchgeführt. Die RNA wurde mittels reverser Transkription in cDNA umgeschrieben. Diese wurde in eine Intron-überspannende PCR eingesetzt. In beiden Fällen ergab die RT-PCR ein einzelnes PCR-Produkt, dessen Größe einer korrekt gespleißten mRNA von *BAPX1* entsprach (Abbildung 4.3 C&D).

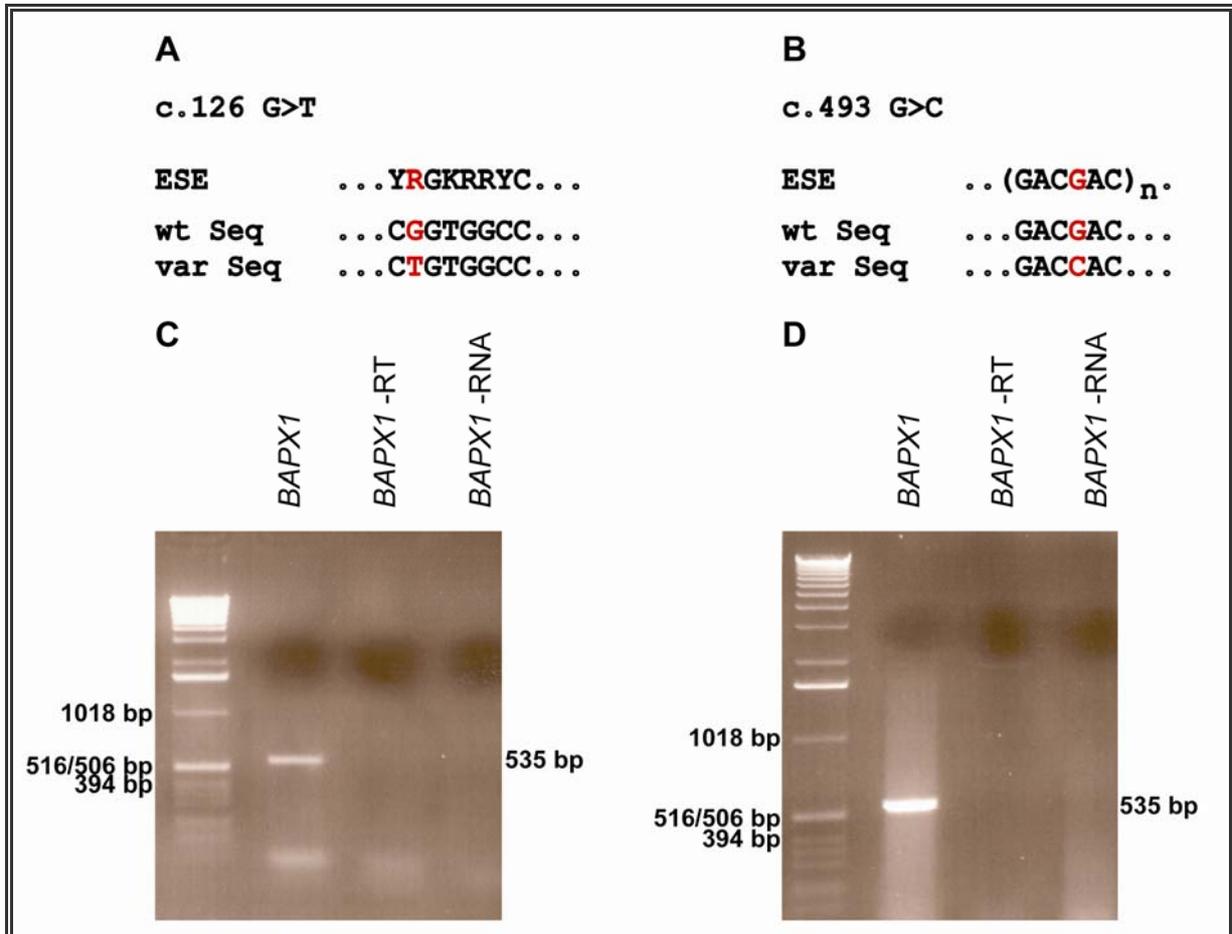


Abbildung 4.3 A&B: Sequenzvariationen im *BAPX1*-Gen, die in Konsensussequenzen potenzieller ESEs liegen. C&D: RT-PCR-Analyse mit RNA von zwei Patienten mit OAVS (C: P18, D: P20) die eine Sequenzvariation in einem potenziellen ESE haben.

Eine fehlerhafte RNA kann unter bestimmten Bedingungen über den Mechanismus des „nonsense-mediated mRNA decay“ (NMD) abgebaut werden (Maquat, 2004). Um zu untersuchen, ob die in Folge einer Mutation in einem putativen ESE möglicherweise fehlerhaft prozessierte mRNA durch einen Mechanismus ähnlich dem NMD abgebaut wird und deshalb nicht nachweisbar ist, wurde die allelische Expression anhand exprimierter Polymorphismen (c.247 A>C bzw. c.493 G>C) untersucht. Hierfür wurde das RT-PCR-Produkt der Patienten P18 und P20 sowie einer Normalperson sequenziert. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.4 zusammengestellt.

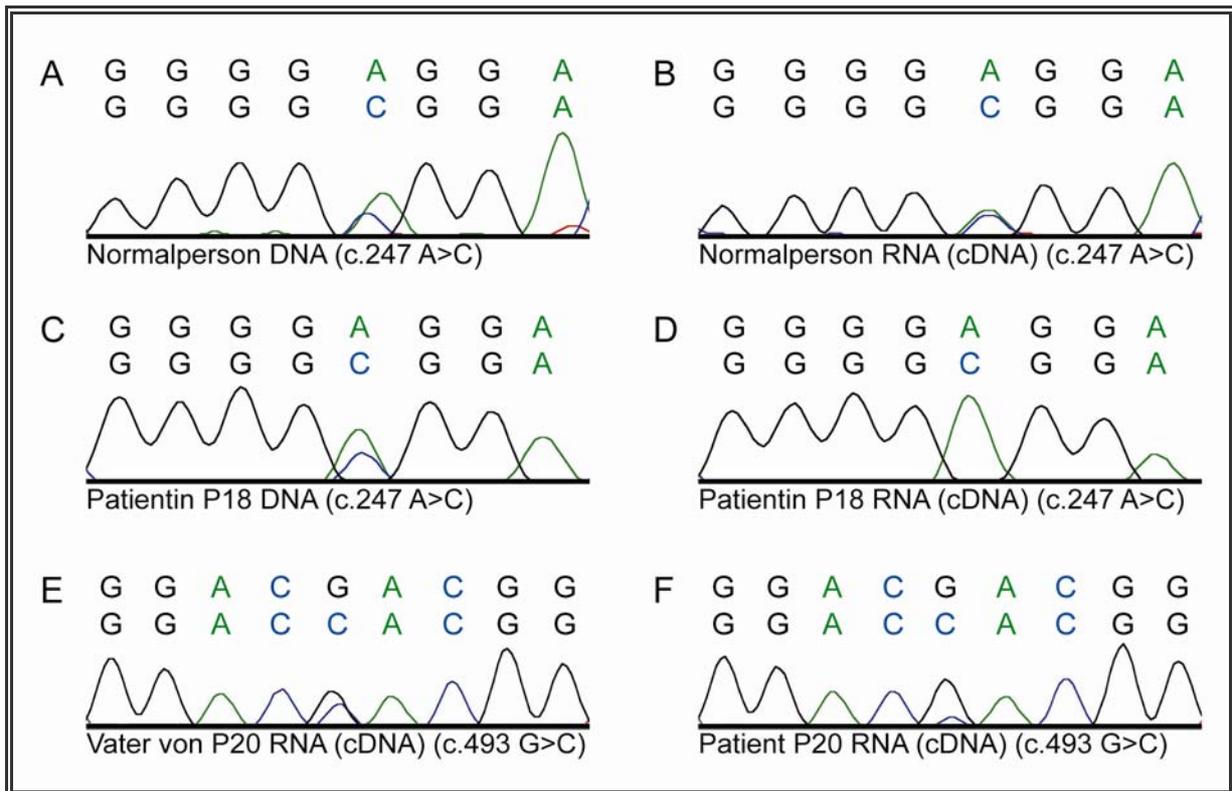


Abbildung 4.4: Sequenzanalysen von DNA und cDNA bei einer Normalperson (A&B) und bei der Patientin P18 (C&D). Als cDNA-Kontrolle für P20 diente sein gesunder Vater (E&F).

Der Patient P20 ist heterozygot für den Basenaustausch c.493 G>C, der in einer Konsensussequenz eines putativen ESE liegt. Die Sequenzierung der cDNA von P20 zeigte, dass das Allel mit der Veränderung im ESE unterrepräsentiert ist (Abbildung 4.4 F). Im Gegensatz dazu ist das Transkriptverhältnis beim Vater des Patienten, der ebenfalls heterozygot für den Basenaustausch im ESE ist, relativ ausgeglichen (Abbildung 4.4 E). Obwohl das Allel mit der C-Variante im ESE in der cDNA des Patienten unterrepräsentiert ist, spricht das ausgeglichene Transkriptverhältnis beim Vater gegen eine fehlerhafte Prozessierung und den Abbau des fehlerhaften Transkripts durch einen NMD-ähnlichen Mechanismus.

In der cDNA einer untersuchten Normalperson lässt sich am Polymorphismus c.247 A>C, wie erwartet, ein ausgeglichenes Verhältnis beider Allele nachweisen (Abbildung 4.4 A&B).

Die Sequenzierung des RT-PCR-Produkts von Patientin P18 zeigte nur die Expression eines Allels. Wie in Abbildung 4.4 D zu erkennen, ist nur das Allel, das an der Position c.247 ein A trägt, nachweisbar. Demnach könnte das nicht nachweisbare, möglicherweise falsch prozessierte Allel, durch einen NMD-ähnlichen Mechanismus abgebaut worden sein. Im Weiteren wurde durch Sequenzanalysen ermittelt, ob das nicht nachweisbare Allel, dasjenige ist, welches die T-Variante im ESE (c.126 G>T) trägt. Hier konnte jedoch festgestellt werden, dass das Allel mit der T-Variante exprimiert wird. Demnach führt auch in

diesem Fall die Variation im ESE nicht zu einer fehlerhaften Prozessierung der prä-mRNA und zu einem Abbau der mRNA durch einen NMD-ähnlichen Mechanismus.

Bei weiterführenden Untersuchungen der *BAPX1*-Expression in kultivierten primären Fibroblasten der Patientin P18 stellte sich heraus, dass das nicht nachweisbare Allel (c.247 C) im Laufe mehrerer Passagen wieder nachweisbar wurde (Abbildung 4.5 C&D). In RNA aus einer frischen Fibroblastenkultur einer zweiten Hautbiopsie desselben Arms konnte erneut keine Expression des Allels c.247 C gezeigt werden (Abbildung 4.5 E).

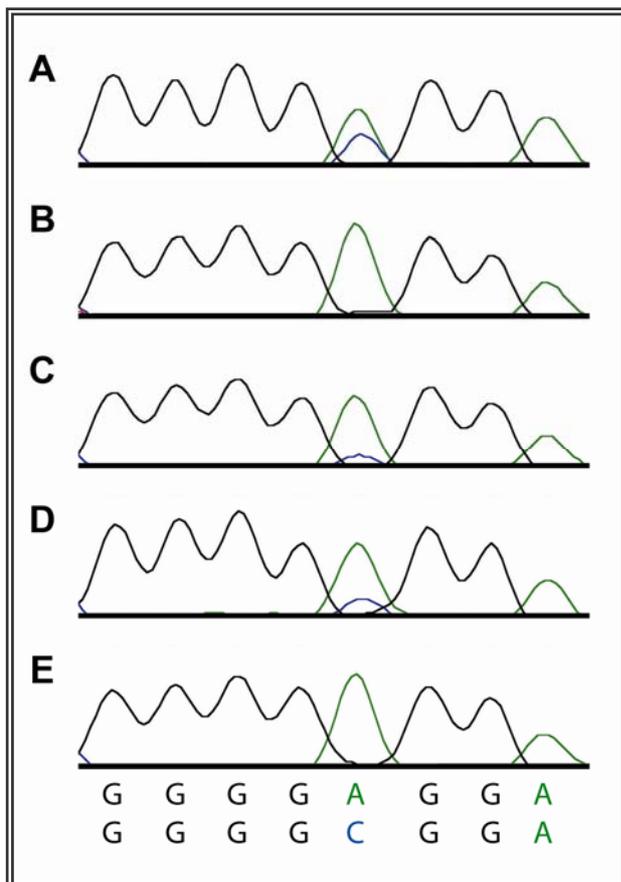


Abbildung 4.5: Sequenzanalysen von genomischer DNA (A) und cDNA (B-E) der Patientin P18. Das verschobene Transkriptverhältnis wird mit zunehmender Kulturdauer der primären Fibroblasten relativiert (B: 37d, C: 53d, D: 61d). In Fibroblasten einer zweiten Hautbiopsie ist nach 12d Kulturdauer wieder nur ein Allel nachweisbar (E).

Die Ergebnisse der Expressionsanalyse bei Patientin P18 deuten darauf hin, dass ein *BAPX1*-Allel fehlerhaft reguliert wird. Ursächlich hierfür kann eine Mutation in einem *cis*-regulativen Element sein. Des Weiteren ist auch eine fehlerhafte epigenetische Transkriptionsregulation denkbar, wofür die sukzessive Nachweisbarkeit des zweiten Allels mit zunehmender Kulturdauer der Fibroblasten spricht.

Da *BAPX1* bei der untersuchten Normalperson biallelisch exprimiert wird, könnte das verschobene Transkriptverhältnis in einem kausalen Zusammenhang mit OAVS stehen.

4.3.2 Quantitative Expressionsanalyse des *BAPX1*-Gens

4.3.2.1 Quantitative Analyse des Transkriptverhältnisses

Die Sequenzierung der RT-PCR-Produkte erlaubt bestenfalls eine semiquantitative Abschätzung relativer Transkriptmengen. Für eine quantitative Analyse der Transkriptverhältnisse wurden „quantitative-primer-extension“-Analysen (SNaPshot-Analysen) durchgeführt (siehe Material & Methoden, Punkt 3.1.10). Auch für diese Technik ist ein exprimierter Polymorphismus essenziell, damit in der cDNA die beiden Allele unterschieden werden können. Um die Anzahl der informativen Patienten zu erhöhen, wurden Patienten, die keine der in Tabelle 4.4 aufgeführten Sequenzvarianten aufwiesen, auf zwei weitere in der Datenbank verzeichnete Polymorphismen in der 3'-UTR untersucht. Die Ergebnisse sind in Tabelle 4.5 zusammengefasst.

Tabelle 4.5: Untersuchung von 44 Patienten mit OAVS auf zwei Polymorphismen in der 3'-UTR.

Variation	Lokalisation	Nukleotid Veränderung	betroffene Aminosäure	Allelfrequenz Patienten
1	3'-UTR	c.999+732 T>C*	-	88/88
2	3'-UTR	c.999+945 T>C*	-	10/88

*publizierte Polymorphismen (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP>)

Die Untersuchung der 3'-UTR ergab acht weitere Patienten (P46, P48, P71, P78, P96, P97, P101, P102), die für den Polymorphismus c.999+945 T>C heterozygot waren. Der Patient P76 war homozygot für das seltene Allel c.999+945 C. Alle Patienten sind homozygot für das seltene Allel des Polymorphismus c.999+732 T>C, was darauf schließen lässt, dass es sich hier um einen Sequenzierfehler in der Datenbank handelt.

Für die SNaPshot-Analysen wurde RNA aus Fibroblastenkulturen von informativen Patienten isoliert und in cDNA umgeschrieben. Die cDNA wurde dann in eine Intron-überspannende PCR für *BAPX1* eingesetzt. Mit den aufgereinigten RT-PCR-Produkten und mit aufgereinigten PCR-Produkten von genomischer DNA wurden die SNaPshot-Reaktionen durchgeführt. Nach dem Auslesen der SNaPshot-Reaktion am Genetic Analyzer 3100 wurde aus den „Peak“-Integralen der beiden Allele das Transkriptverhältnis berechnet, indem das größere durch das kleinere „Peak“-Integral dividiert wurde (Abbildung 4.6). Der erhaltene Wert wurde mit dem allelischen Verhältnis der DNA (1:1) normiert. Dieser Schritt muss durchgeführt werden, da die Fluoreszenzintensitäten der verschiedenen Fluorophore, mit denen die einzelnen Basen markiert sind, unterschiedlich stark sind. Demzufolge erhält man auch bei der Untersuchung der DNA einen Wert ungleich eins. Für die Normierung der

Transkriptverhältnisse der RNA wurde ein Mittelwert aus 4-6 Allelverhältnissen der DNA von Normalpersonen errechnet.

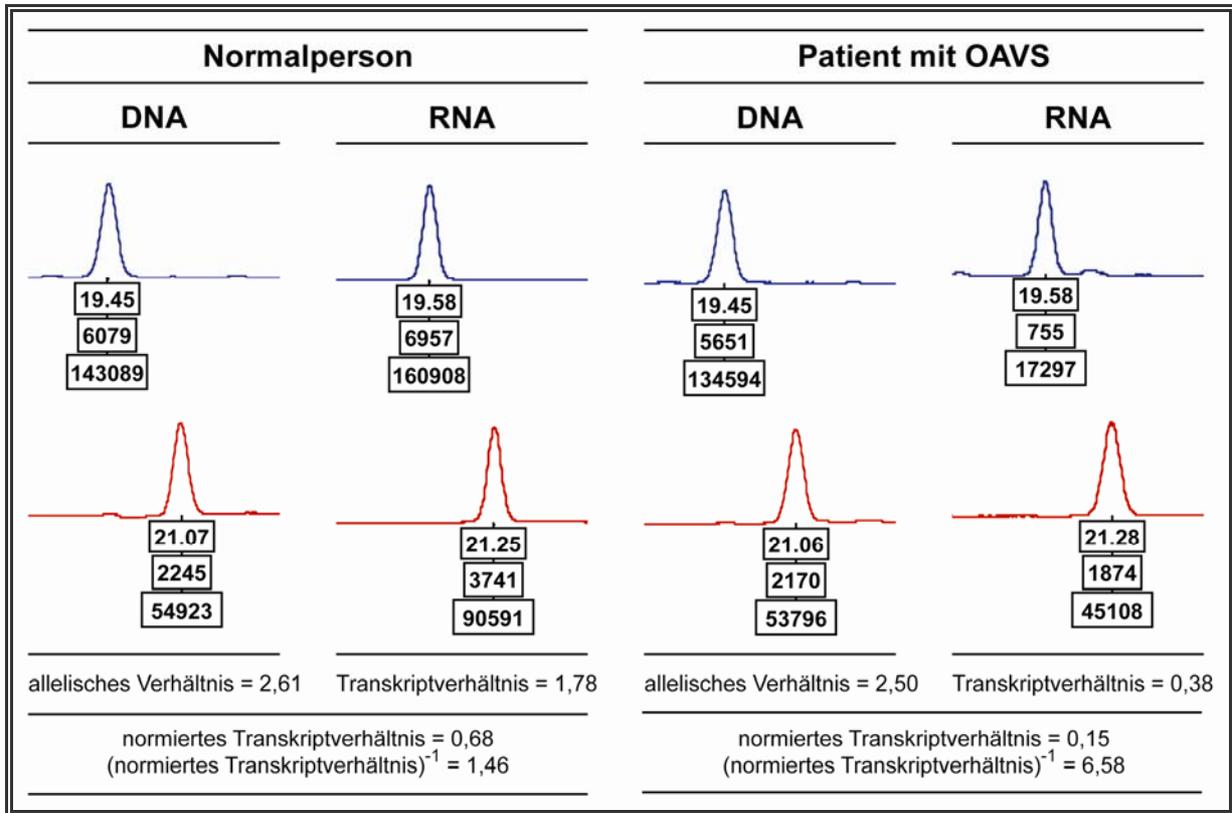


Abbildung 4.6: Beispiel für das Ergebnis einer SNaPshot-Analyse von einer Normalperson und von einem Patienten mit OAVS. Die blauen „Peaks“ repräsentieren das Allel c.247 C, die roten „Peaks“ das Allel c.247 A. Aus den „Peak“-Integralen werden die allelischen Verhältnisse und die Transkriptverhältnisse berechnet. Daraus werden die normierten Transkriptverhältnisse durch Division der Transkriptverhältnisse durch die allelischen Verhältnisse berechnet. Erhält man Werte unter 1 wird der Kehrwert berechnet. Unter den „Peaks“ angegeben sind die Produktgröße, die „Peak“-Höhe und das „Peak“-Integral.

Die SNaPshot-Analysen wurden für neun Normalpersonen und zwölf Patienten (P18, P20, P29, P32, P50, P90, P93, P107, P110, P123, P125, P127) durchgeführt. Tabelle 4.6 fasst die Ergebnisse der SNaPshot-Analysen zusammen, Abbildung 4.7 A zeigt die normierten Transkriptverhältnisse der Normalpersonen und der Patienten graphisch.

Tabelle 4.6: Normierte Transkriptverhältnisse von Patienten und Normalpersonen.

Patienten											
P93	P50	P32	P107	P18	P20	P110	P90	P29	P123	P127	P125
1,94	8,83	1,04	1,39	6,18	4,22	3,13	12,63	1,42	1,10	1,38	1,82
Normalpersonen											
NP1	NP2	NP3	NP4	NP5	NP6	NP7	NP8	NP9			
1,83	2,10	1,40	2,61	1,39	1,48	1,47	2,29	1,41			

Unter der Annahme der Normalverteilung der Werte von Normalpersonen wurde das 99%-Konfidenzintervall berechnet [0,65;2,98]. Patienten mit einem Wert außerhalb dieses Konfidenzintervalls haben demnach ein verschobenes Transkriptverhältnis. Nach dieser statistischen Unterteilung haben fünf (siehe Abbildung 4.7 A) von zwölf Patienten ein verschobenes Transkriptverhältnis. Daraus lässt sich ein p -Wert von 0,038 (nach Fishers Exakt Test) errechnen. Das Ergebnis dieser Untersuchung ist demnach insgesamt statistisch signifikant.

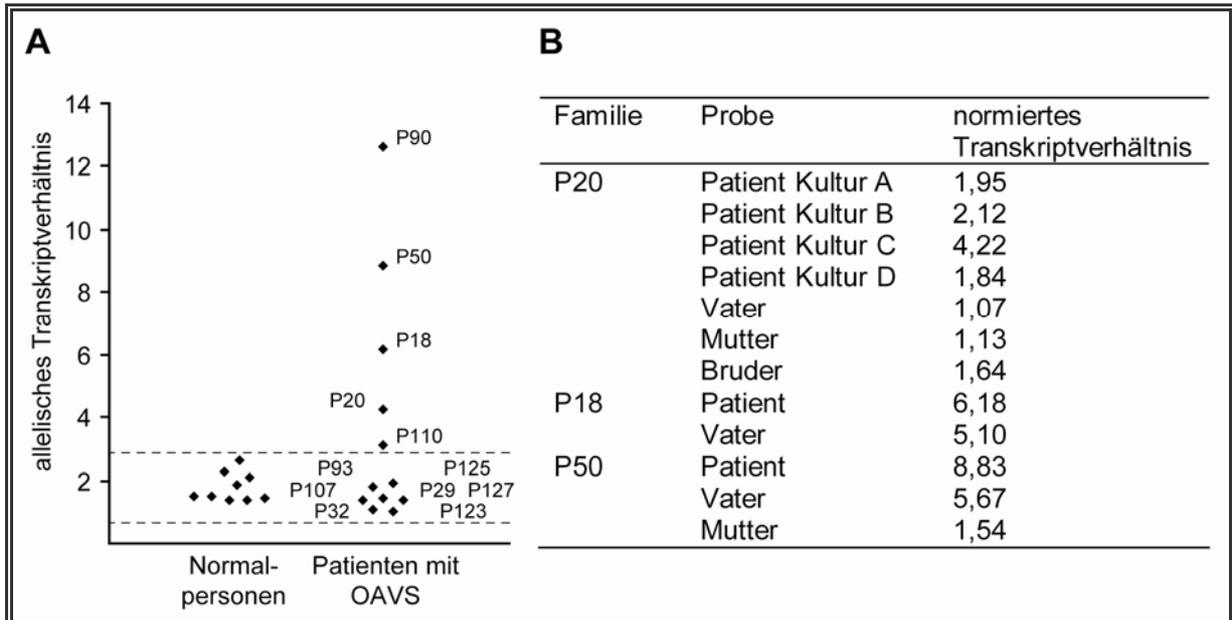


Abbildung 4.7A: Mittels SNaPshot-Analysen bestimmte Transkriptverhältnisse von neun Normalpersonen und zwölf Patienten. Die gestrichelten Linien geben das 99%-Konfidenzintervall an [0,65;2,98]. Patienten mit einem Wert für das Transkriptverhältnis, der außerhalb des 99%-Konfidenzintervalls liegt, haben ein verschobenes Transkriptverhältnis. B: SNaPshot-Analysen von Familienangehörigen der Patienten P20, P18 und P50. Von P20 wurden verschiedene Fibroblastenkulturen (A, B, C, D) untersucht.

Bei der Untersuchung des allelischen Verhältnisses auf DNA-Ebene fiel ein Patient (P107) auf. Er zeigte in mehreren SNaPshot-Analysen eine deutliche Abweichung von den errechneten DNA-Mittelwerten. In diesem Fall könnte ein somatisches Mosaik von Zellen mit einer Deletion oder Duplikation eines *BAPX1*-Allels vorliegen und so zu einer Gendosisveränderung führen (Daten nicht gezeigt).

In einer weiteren Untersuchung wurde der Frage nachgegangen, ob die verschobenen Transkriptverhältnisse bei den Patienten *de novo* auftreten oder ob Familienangehörige ebenfalls ein verschobenes Transkriptverhältnis aufweisen. Hierfür wurde RNA aus Fibroblasten von Familienmitgliedern der Patienten P20, P18 und P50 ebenfalls mittels SNaPshot-Analysen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.7 B & 4.8 dargestellt. In der Familie P20 scheint das verschobene Transkriptverhältnis beim betroffenen Sohn *de*

novo aufzutreten. Seine Eltern und auch sein nicht betroffener Bruder haben jeweils ein ausgeglichenes Transkriptverhältnis (Abbildung 4.8 A). Interessant sind die Ergebnisse verschiedener Fibroblastenkulturen von P20 (Abbildung 4.7 B). Nur in einer Kultur (C) konnte das verschobene Transkriptverhältnis nachgewiesen werden. Drei weitere Kulturen (A, B, D) zeigen ein ausgeglichenes Transkriptverhältnis. Bei diesem Patienten scheint das verschobene Transkriptverhältnis von *BAPX1* nur in einem Teil seiner somatischen Zellen aufzutreten, also als Mosaik vorzuliegen. Die weiteren Untersuchungen zur *BAPX1*-Expression insgesamt (siehe 4.3.2.2) und zur Ursache für das verschobene Transkriptverhältnis (siehe 4.5) wurden mit RNA durchgeführt, die aus Kultur C isoliert wurde.

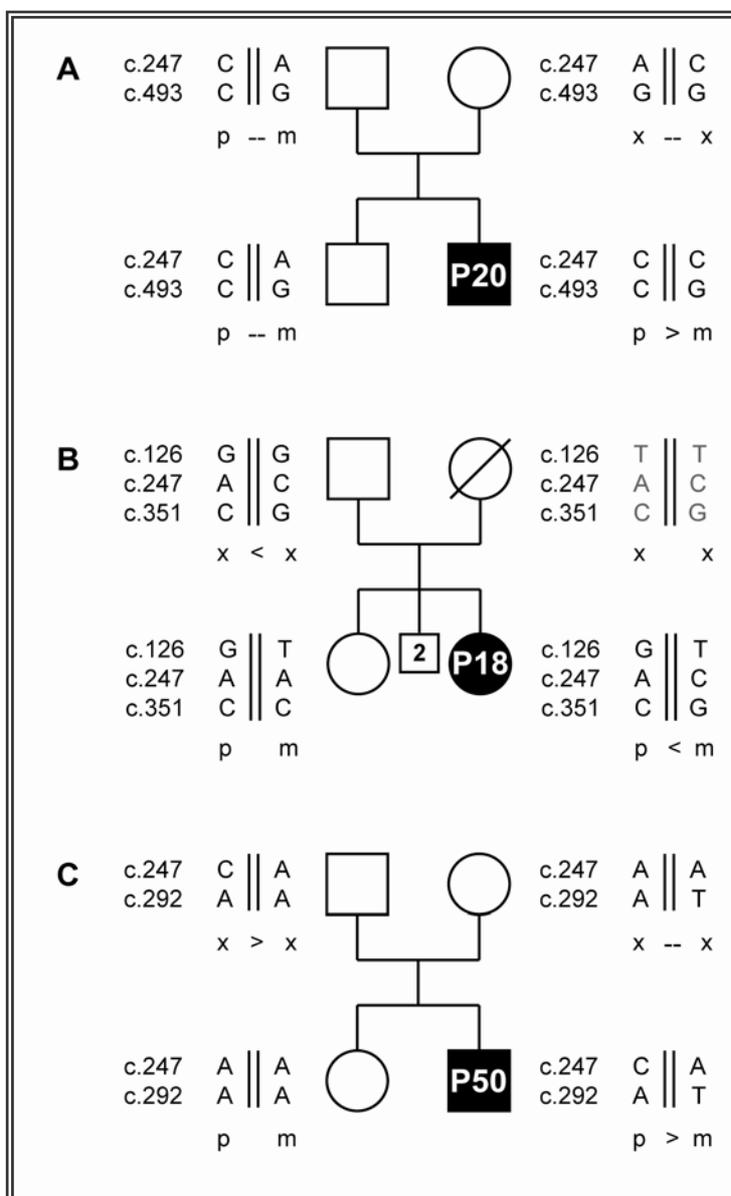


Abbildung 4.8: Segregationsanalyse des verschobenen Transkriptverhältnisses bei drei Familien von Patienten mit OAVS (A: P20, B: P18, C: P50). p: paternal, m: maternal, x: nicht bestimmbar, --: ausgeglichenes Transkriptverhältnis, ><: verschobenes Transkriptverhältnis, grau: abgeleitete Haplotypen

In den Familien von P18 und P50 zeigen nicht nur die Patienten ein verschobenes Transkriptverhältnis, sondern auch jeweils der Vater. Die Mutter von P50 weist ein ausgeglichenes Transkriptverhältnis auf. Das Transkriptverhältnis weiterer Familienmitglieder von P18 und P50 konnte nicht untersucht werden, da von ihnen kein Material zur Verfügung stand, oder sie nicht informativ für die untersuchten Polymorphismen waren.

Bei Patientin P18 ist das paternale Allel unterrepräsentiert. Bei dem Vater von P18, der ebenfalls ein verschobenes Transkriptverhältnis hat, ist genau dieses Allel ebenfalls unterrepräsentiert. Das überrepräsentierte Allel von P18 hat sie demnach von ihrer Mutter geerbt, deren Transkriptverhältnis nicht bestimmt werden konnte (Abbildung 4.8 B).

Im Fall von P50 ist das maternale Allel unterrepräsentiert. Die Mutter von P50 hingegen hat ein ausgeglichenes Transkriptverhältnis. Das überrepräsentierte Allel des Patienten wird von seinem Vater vererbt. Genau dieses Allel ist beim Vater ebenfalls überrepräsentiert (Abbildung 4.8 C).

Ein einfaches Modell lässt sich aus diesen Ergebnissen für die Vererbung des verschobenen Transkriptverhältnisses nicht ableiten.

Von den Familien der Patienten P90 und P110 stand bis zum Abschluss der Arbeit kein Material für die SNaPshot-Analysen zur Verfügung.

4.3.2.2 Quantitative Analyse der Transkriptmenge

Nachdem ein verschobenes Transkriptverhältnis bei fünf von zwölf Patienten mit OAVS nachgewiesen werden konnte, wurde der Frage nachgegangen, ob sich ein verschobenes Transkriptverhältnis auf die Transkriptmenge insgesamt auswirkt. Ein verschobenes Transkriptverhältnis kann prinzipiell zwei Ursachen haben. (1) In einem aktiven Gen ist ein Allel eines normalerweise biallelisch exprimierten Gens fälschlicherweise vollständig oder partiell abgeschaltet. (2) Ein inaktives Gen zeigt fälschlicherweise eine vollständige oder partielle Aktivität eines Allels. Für die Untersuchungen der Transkriptmenge wurden „TaqMan Gene Expression Assays“ durchgeführt. Hierbei wurde die Transkriptmenge von *BAPX1* in Relation zu drei Referenzgenen gesetzt, die in Fibroblasten interindividuell gleichmäßig stark und konstitutiv exprimiert sind (Vandesompele *et al.*, 2002). Die Ergebnisse der TaqMan-Analysen sind in Abbildung 4.9 zusammengestellt.

Die dargestellten Säulen repräsentieren den Unterschied in der Expression zwischen *BAPX1* und den Referenzgenen *HPRT1*, *YWHAZ* und *GAPDH* (Abbildung 4.9 A-C). Abbildung 4.9 D zeigt das geometrische Mittel aller drei Referenzgene, in Bezug auf *BAPX1*. Die Expression von *BAPX1* bei Normalpersonen ist im Rahmen interindividueller Schwankungen relativ

konstant und streut um den Mittelwert von 0,00081. Allein im Vergleich zu *GAPDH* (Abbildung 4.9 C) fallen zwei Werte der Normalpersonen heraus. Bei den Patienten mit OAVS finden sich hingegen wesentlich größere Schwankungen bei den Expressionswerten von *BAPX1*. Auffällig ist, dass Patient P50, der ein verschobenes Transkriptverhältnis aufweist, im Vergleich zu allen Referenzgenen *BAPX1* deutlich stärker exprimiert. Die beiden weiteren Patienten, die ein verschobenes Transkriptverhältnis aufweisen (P18 & P20), zeigen eine Expression von *BAPX1*, die anscheinend im Bereich der Expression der Normalpersonen liegt. Die Patienten P93 und P32, die beide ein ausgeglichenes Transkriptverhältnis aufweisen, zeigen hingegen eine sehr geringe *BAPX1*-Expression. Diese beiden Patienten zeigten bei der Untersuchung des allelischen Transkriptverhältnisses ein ausgeglichenes Verhältnis. Der Patient P107, der auf DNA-Ebene Auffälligkeiten in den SNaPshot-Analysen aufwies, zeigt hier eine *BAPX1*-Expression, die im Bereich der Normalpersonen liegt.

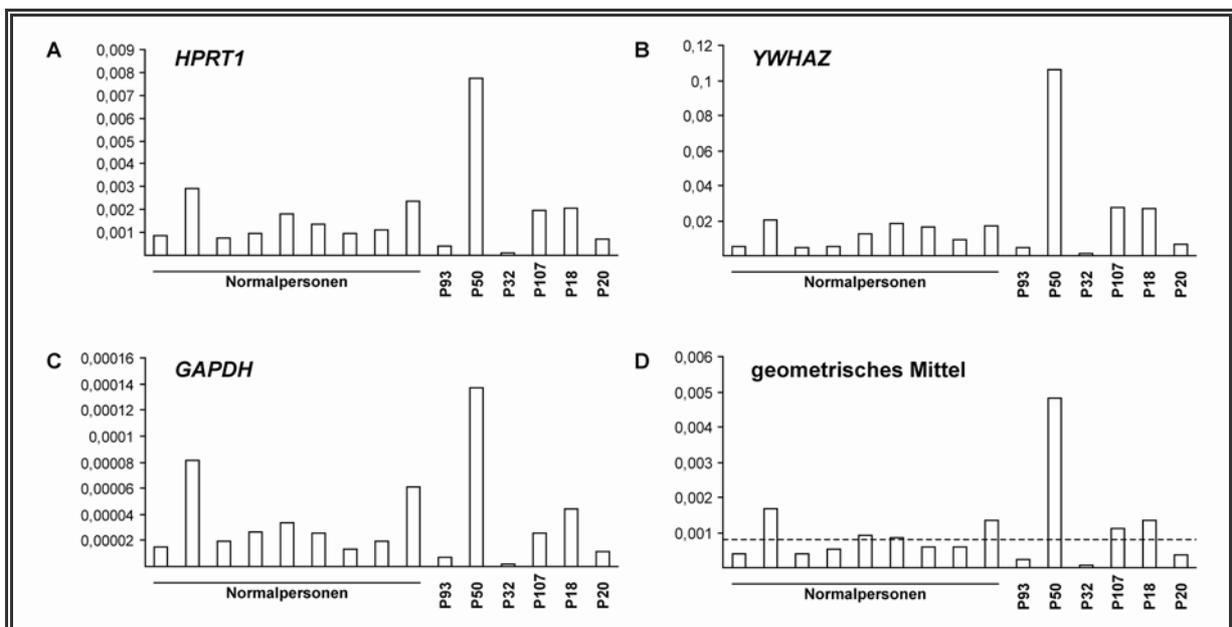


Abbildung 4.9: Ergebnisse der TaqMan-Analysen von neun Normalpersonen und sechs Patienten mit OAVS. Die Säulen repräsentieren jeweils den Unterschied der *BAPX1*-Expression zu einem Referenzgen (A-C), bzw. zum geometrischen Mittel der Referenzgene (D). Die Expression von *BAPX1* wurde im Vergleich zu den Referenzgenen *HPRT1* (A), *YWHAZ* (B) und *GAPDH* (C) bestimmt. Die gestrichelte Linie gibt den Mittelwert der Normalpersonen an.

Abschließend lässt sich festhalten, dass bei Patienten mit OAVS die Stärke der *BAPX1* Expression deutlich mehr variiert. Diese Variation kann sowohl eine deutliche Zunahme der Expression darstellen (P50) als auch stark verringert erscheinen (P93 & P32).

4.4 Promotor-Analysen des *BAPX1*-Gens

Die Expressionsdaten von *BAPX1* warfen die Frage nach der Ursache für das verschobene Transkriptverhältnis der beiden Allele und die Schwankungen in der Transkriptmenge auf. Prinzipiell kann man zur Beantwortung dieser Fragestellung zwei möglichen Ursachen nachgehen: einer genetischen und einer epigenetischen. Die genetische Ursache kann eine Mutation in einem *cis*-regulativen Element (Promotor, „enhancer“, Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren) sein. Als epigenetische Ursache kommen mehrere Mechanismen der Transkriptionsregulation in Frage, wie z. B. DNA-Methylierung und Histonacetylierung.

4.4.1 Mutationsanalyse im Promotor des *BAPX1*-Gens

Um zunächst eine mögliche genetische Ursache zu untersuchen, wurde eine Mutationsanalyse im Promotor und in Erkennungssequenzen von Transkriptionsfaktoren durchgeführt. Eine Mutation im Promotor von *BAPX1* kann sich auf die Expression des betroffenen Allels auswirken. Da der direkte 5'-Bereich des *BAPX1*-Gens bisher wenig charakterisiert worden ist, wurden etwa 600bp direkt 5' des Start-ATG von *BAPX1* auf die klassischen Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren (GC-Box, TATA-Box, CAAT-Box, TRE und CRE) durchsucht. Innerhalb der 600bp fanden sich sieben GC-Boxen mit dem Sequenzmotiv GGGCGG, oder einer Variante dieser Sequenz, und eine CAAT-Box mit der Sequenz CCAAT.

Der *BAPX1*-Promotor wurde bei 122 Patienten mit OAVS auf Mutationen untersucht. Hierfür wurde der Bereich mittels PCR amplifiziert und die PCR-Produkte sequenziert. Es konnte bei keinem der 122 untersuchten Patienten eine Veränderung im 5'-Bereich von *BAPX1* identifiziert werden. Die oben erwähnte Veränderung c.1-10 C>A war bereits bei der Mutationsanalyse im *BAPX1*-Gen aufgefallen (siehe Punkt 4.2.2) und nach der Untersuchung von Normalpersonen als Polymorphismus angesehen worden.

Rodrigo *et al.* beschrieben 2003 eine Interaktion der Transkriptionsfaktoren Pax1/Pax9 mit einer Sequenz 880-844bp 5' des Start-ATG von *Bapx1*. Innerhalb dieser Sequenz liegt ebenfalls eine vorhergesagte Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor Pax6 (Rodrigo *et al.*, 2003). Im Jahr 2004 wurde in der gleichen Region (828-823bp 5' des Start-ATG von *Bapx1*) eine Erkennungssequenz für den Transkriptionsfaktor Meox1 identifiziert (Rodrigo *et al.*, 2004). Ein Vergleich der murinen mit der humanen Sequenz anhand einer DNA-Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>) konnte die von Rodrigo *et al.* publizierte Sequenz aus der Maus im humanen Genom identifizieren (Abbildung 4.10 A).

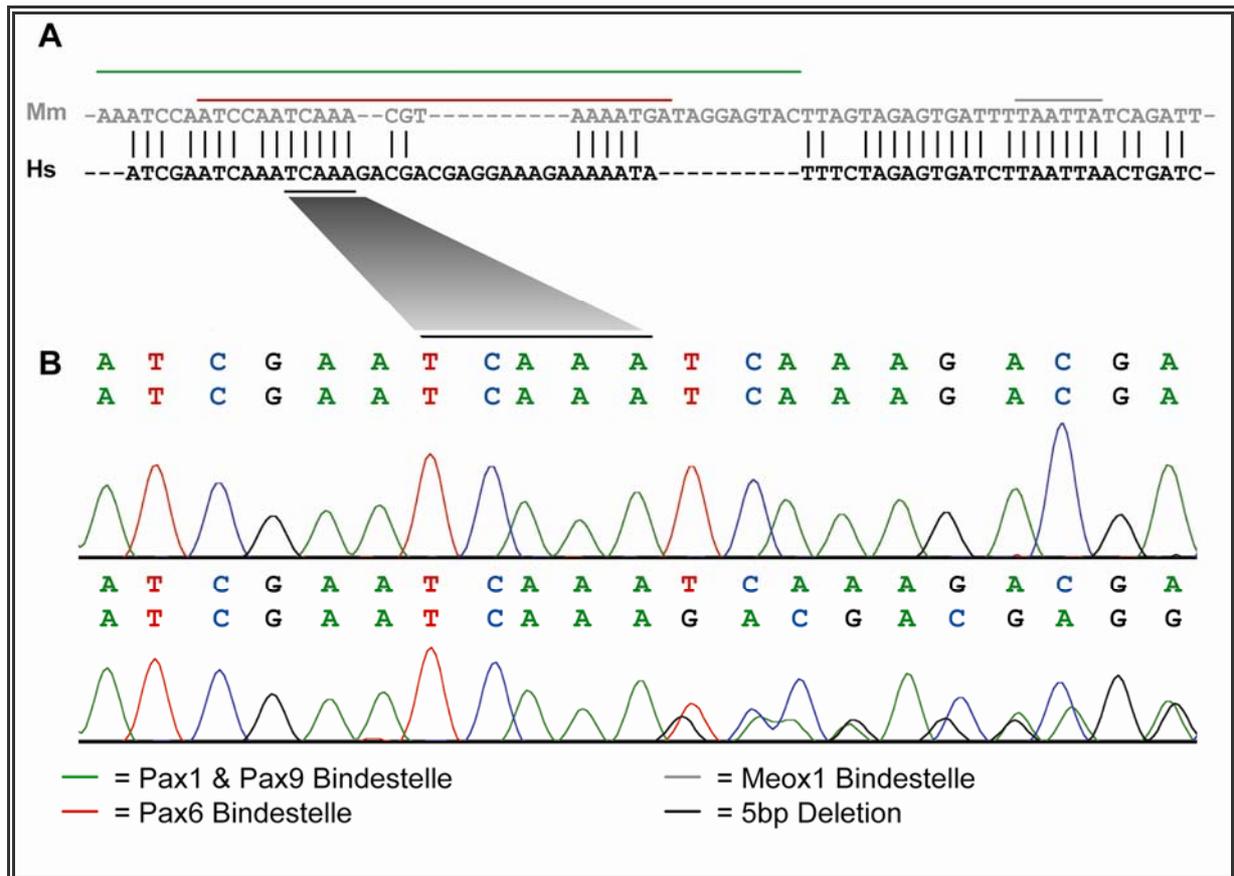


Abbildung 4.10: Promotorsequenz von *Bapx1* in der Maus und von *BAPX1* im Menschen. Im Bereich von -880bp bis -823bp liegen Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren Meox1, Pax1/Pax9, sowie eine vorhergesagte Erkennungssequenz von Pax6 (A). Eine 5bp-Deletion liegt genau in der Erkennungssequenz von Pax1/Pax9, sowie in der vorhergesagten Erkennungssequenz von Pax6 (B). Mm: *Mus musculus*, Hs: *Homo sapiens*

Mögliche Mutationen in diesen Erkennungssequenzen wurden über Sequenzanalysen bei Patienten mit OAVS untersucht. Hierfür wurde ein 97bp großes Fragment per PCR amplifiziert, in dem die Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren Meox1, Pax1/Pax9 und Pax6 enthalten waren. Die durchgeführte Sequenzierung von sechs PCR-Produkten zeigte in drei Fällen eine Deletion von 5bp, die genau in der Erkennungssequenz von Pax1/Pax9 sowie in der vorhergesagten Erkennungssequenz von Pax6 liegt (Abbildung 4.10 B).

Für eine Untersuchung von allen Patienten mit OAVS und von Normalpersonen auf die 5bp-Deletion wurde eine hochauflösende Gelelektrophorese benutzt. Auf einem 5%igen Agarosegel konnte die 5bp-Deletion in einem 96bp großen PCR-Fragment identifiziert werden (Abbildung 4.11).

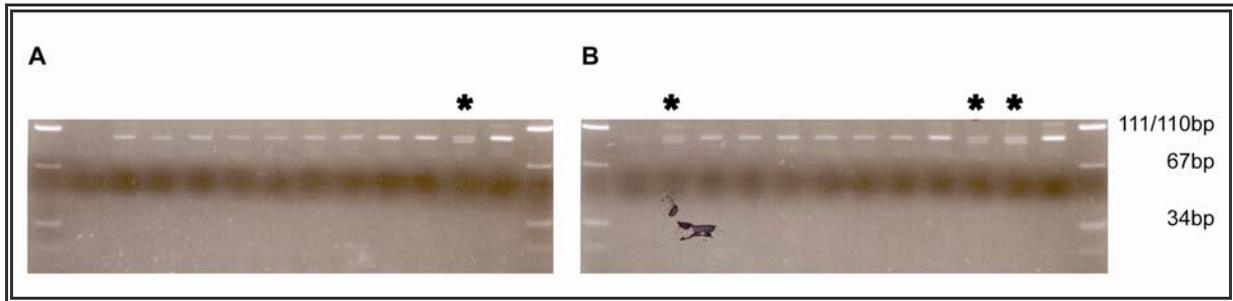


Abbildung 4.11: Beispiel für die Ergebnisse der hochauflösenden Gelelektrophorese. Mit den Sternchen sind die Patienten (A) und die Normalpersonen (B) markiert, die die Deletion tragen. Hier lassen sich zwei Banden (97bp & 92bp) identifizieren.

Die Deletionsanalyse wurde für 105 Patienten mit OAVS und 88 Normalpersonen durchgeführt. Unter den Patienten fanden sich elf, die heterozygot für die 5bp-Deletion sind, unter den Normalpersonen fanden sich 14 Heterozygote und eine Person, die sogar homozygot für die 5bp-Deletion ist. Von den Patienten mit einem verschobenen Transkriptverhältnis zeigte nur P20 eine heterozygote Deletion.

Aus der Gesamtschau der Daten lässt sich eine Verbindung zwischen der Deletion und dem verschobenen Transkriptverhältnis nicht herstellen. Die Deletion wurde demnach als Polymorphismus angesehen. Die Sequenzierung der PCR-Produkte ergab des Weiteren keine Sequenzveränderung in der Meox1-Erkennungssequenz.

Es lässt sich also festhalten, dass keine genetische Ursache für das verschobene Transkriptverhältnis identifiziert werden konnte.

4.4.2 Methylierungsuntersuchung der 5'-CpG-Insel des *BAPX1*-Gens

Wie für elterlich geprägte Gene („imprinted genes“), Gene auf dem inaktiven X-Chromosom und Tumorsuppressorgene seit langem bekannt, kann ihre Expression durch DNA-Methylierung reguliert werden.

Das *BAPX1*-Gen liegt in zwei CpG-Inseln, die als potenzielle Ziele für die Methylierung von Cytosinen zur Regulation der Expression genutzt werden könnten (Abbildung 4.12 A). Die *BAPX1* Expression könnte somit über den epigenetischen Mechanismus der DNA-Methylierung reguliert werden.

Zur Untersuchung der DNA-Methylierung wurde die 5'-CpG-Insel ausgewählt, die sich bis in den kodierenden Bereich von *BAPX1* erstreckt, da bekannt ist, dass DNA-Methylierung im Promotor und/oder in der 5'-UTR Auswirkung auf die Expression des jeweiligen Gens hat (Jones & Takai, 2001). Die CpG-Insel wurde in zwei amplifizierbare Teile unterteilt (Abbildung 4.12 B). Es wurden Primer ausgesucht, die in Bereichen ohne CpG-Dinukleotide

liegen und so entworfen, dass sie ausschließlich an Bisulfit-behandelte DNA binden (Abbildung 4.12 C).

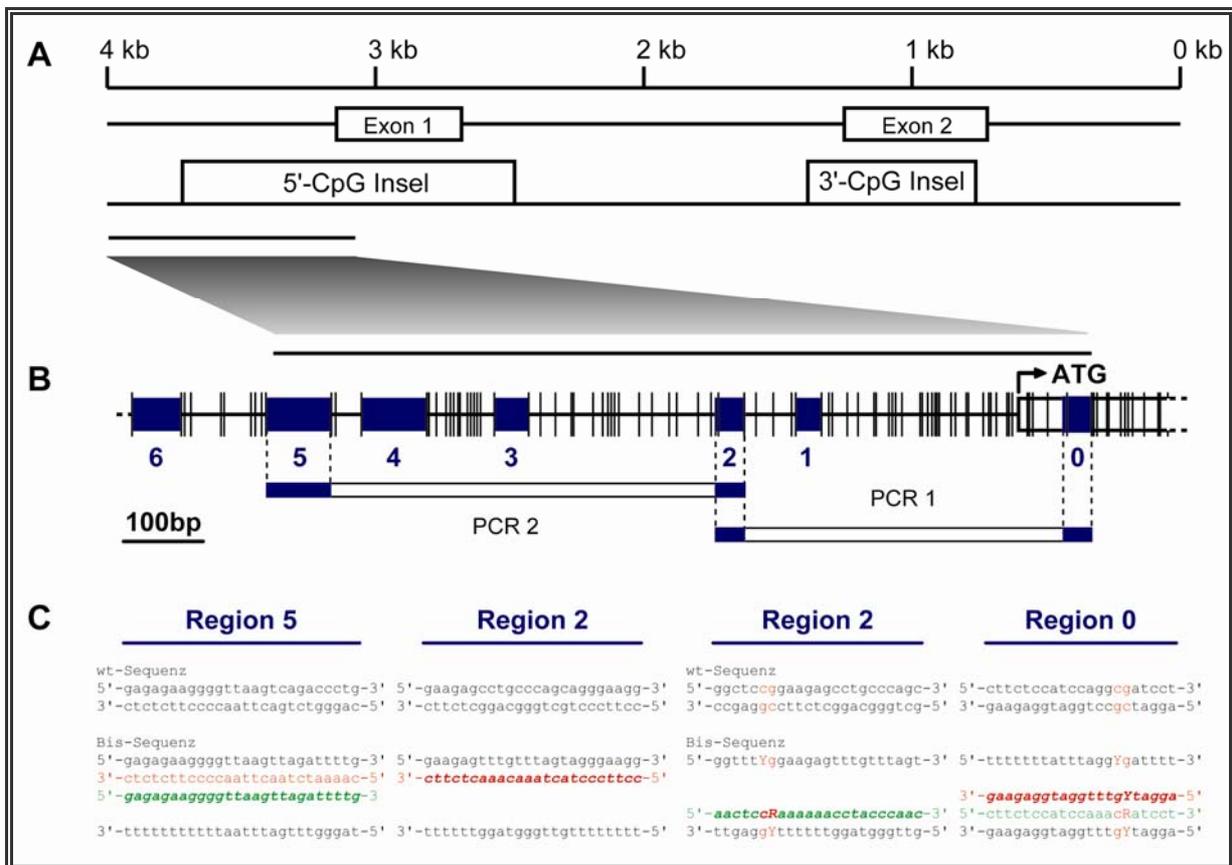


Abbildung 4.12: Genomische Struktur des *BAPX1*-Gens. Das *BAPX1*-Gen erstreckt sich über etwa 3,8kb genomische Sequenz und liegt in zwei CpG-Inseln (5'-CpG-Insel & 3'-CpG-Insel) (A). Die 5'-CpG-Insel besitzt 6 Bereiche, in denen über eine Länge von mindestens 25bp keine CpG-Dinukleotide liegen. Diese Bereiche eigneten sich zur Auswahl der Primer. Die 5'-CpG-Insel wurde in zwei überlappenden PCR-Produkten (Bereich 0 bis 2 und Bereich 2 bis 5) amplifiziert (B). Die Primer wurden so entworfen, dass sie ausschließlich an Bisulfit-behandelte DNA binden (C). Grün fett gedruckt: „forward“-Primer, rot fett gedruckt: „reverse“-Primer

Die Untersuchungen wurden für zwei Patienten (P18 & P48) durchgeführt. P18 war die erste Patientin, bei der ein verschobenes Transkriptverhältnis nachgewiesen werden konnte und bei der demnach ein Verdacht auf eine fehlerhafte Regulation von *BAPX1* bestand. Die zweite Patientin, die auf DNA-Methylierung untersucht wurde, war die Patientin mit der Translokation t(4;8)(p15.3;q24.1). In einem Artikel von Tufarelli *et al.* wird die *de novo*-DNA-Methylierung eines Gens beschrieben, die durch eine Deletion hervorgerufen wird (Tufarelli *et al.*, 2003). Somit bestand die Möglichkeit, dass auch Gene in der Nähe einer Translokation durch eine *de novo*-DNA-Methylierung stillgelegt werden.

Für die Untersuchungen der DNA-Methylierung wurde genomische DNA der Translokationspatientin (P48) aus lymphoblastoiden Zelllinien und genomische DNA der Patientin P18 aus Leukozyten mit Natriumbisulfit behandelt. Dies führt zu einer Konversion von nicht-methylierten Cytosinen in Uracile, die in einer anschließenden PCR durch Thymin

ersetzt werden. Für eine quantitative Auswertung der Methylierung wurden die PCR-Produkte in den pGEM[®]-T Easy Vector (Promega) kloniert und pro PCR-Produkt 12 Klone per Sequenzierung untersucht. Die Ergebnisse sind beispielhaft für die Patientin P48 in Abbildung 4.13 dargestellt.

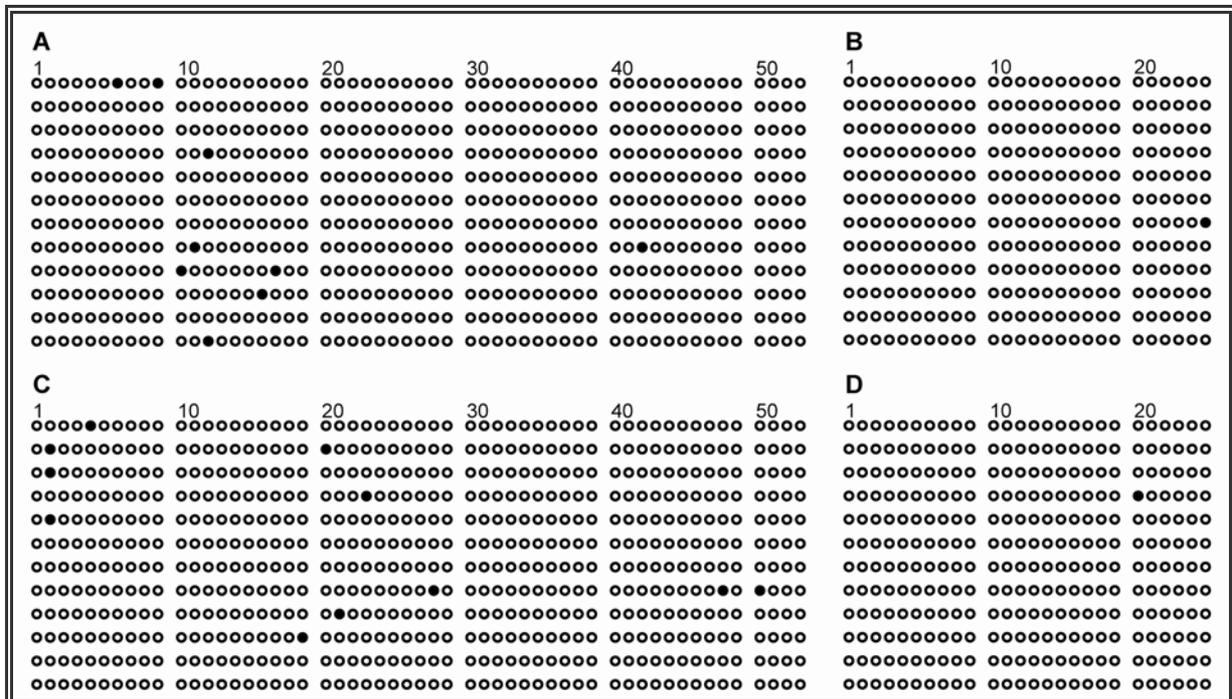


Abbildung 4.13: Untersuchung der DNA-Methylierung bei der Patientin P48 und bei einer Normalperson. PCR-Produkte Bisulfit-behandelter DNA wurden kloniert und die Klone einzeln sequenziert. Horizontal sind die CpG-Dinukleotide gezeigt (54 CpG-Dinukleotide im PCR-Produkt des Bereichs 0 bis 2 (A&C), 26 CpG-Dinukleotide im PCR-Produkt des Bereichs 2 bis 5 (B&D)). Je PCR-Produkt wurden 12 Klone sequenziert (vertikal). Ausgefüllte Kreise: methyliertes CpG, offene Kreise: nicht-methyliertes CpG

Es konnte bei der Patientin P48 keine DNA-Methylierung in der 5'-CpG-Insel von *BAPX1* nachgewiesen werden (Abbildung 4.13 A&C). Vereinzelt scheint ein CpG-Dinukleotid methyliert zu sein, was jedoch auf eine unvollständige Konversion von nicht-methylierten Cytosinen durch Bisulfit zurückzuführen ist, da sich in keinem Klon eine vollständige Methylierung der CpG-Insel nachweisen ließ.

Ähnliche Ergebnisse wurden für die DNA der Patientin P18 erzielt und sind deshalb hier nicht im Detail aufgeführt.

Es kann also festgehalten werden, dass (1) die Translokation bei der Patientin P48 nicht zu einer fehlerhaften Methylierung der 5'-CpG-Insel von *BAPX1* führt und (2) das verschobene Transkriptverhältnis in der RNA der Patientin P18 nicht auf eine fehlerhafte DNA-Methylierung eines Allels im Bereich der 5'-CpG-Insel von *BAPX1* zurückzuführen ist.

4.5 Untersuchung epigenetischer Transkriptionsregulation

Epigenetische Transkriptionsregulation kann über DNA-Methylierung und/oder Histonmodifikation erfolgen (Fuks, 2005; Ng & Bird, 1999). Eine Störung dieser Transkriptionsregulation, z.B. durch fehlerhafte DNA-Methylierung oder Histondeacetylierung kann zum Abschalten von Genen führen. Tritt dieser Fehler nur auf einem Allel auf, kann dies zu einem verschobenen Transkriptverhältnis führen. Im vorigen Abschnitt wurde bereits die Untersuchung der DNA-Methylierung spezifisch für die 5'-UTR von *BAPX1* beschrieben. Da sich jedoch auch DNA-Methylierung in weiteren regulatorischen Sequenzen, z.B. von Transkriptionsfaktoren von *BAPX1* auf die Expression auswirken können (Jones & Takai, 2001), wurde hier zusätzlich ein unspezifischer Ansatz gewählt.

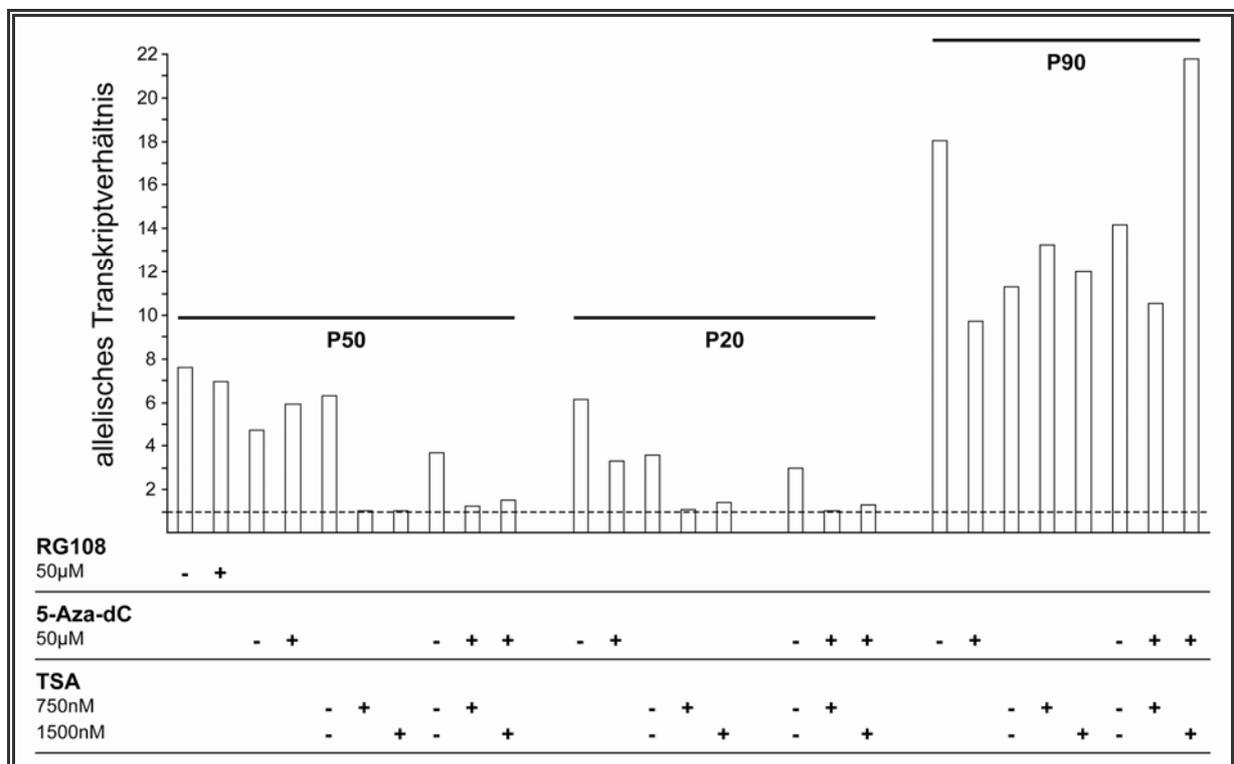


Abbildung 4.14: Behandlung von kultivierten primären Fibroblasten mit Inhibitoren für epigenetische Transkriptionsregulation. Die Säulen repräsentieren die Transkriptverhältnisse nach Behandlung mit RG108, 5-Aza-dC, TSA und einer Kombination von 5-Aza-dC und TSA. Die gestrichelte Linie markiert ein Transkriptverhältnis von 1. Untersucht wurden die Patienten P50, P20 und P90.

Um die beiden epigenetischen Mechanismen der Transkriptionsregulation zu untersuchen, wurden Fibroblastenkulturen von Patienten mit OAVS und einem verschobenen Transkriptverhältnis mit Inhibitoren für epigenetische Transkriptionsregulation behandelt. Hierfür wurden die DNA-Methyltransferase-Inhibitoren 5-Aza-2-desoxycytidin (5-Aza-dC) und RG108 sowie der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A (TSA) verwendet. Die Fibroblastenkulturen wurden 48 – 72 Stunden mit den Inhibitoren kultiviert (modifiziert nach

Kondo *et al.*, 2003). Aus den behandelten Kulturen wurde anschließend RNA präpariert; Eine RT-PCR mit dieser RNA wurde durchgeführt und die aufgereinigten PCR-Produkte wurden per SNaPshot-Analysen untersucht. Die Ergebnisse sind in Abbildung 4.14 dargestellt.

In den Fibroblastenkulturen der Patienten P20 und P50 konnte durch Behandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor TSA und mit einer Kombination aus dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-dC und TSA eine Normalisierung des Transkriptverhältnisses erreicht werden. Mit 5-Aza-dC alleine und mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor RG108 konnte kein Effekt erzielt werden. Da mit 5-Aza-dC allein kein Effekt erzielt werden konnte, kann man davon ausgehen, dass die Normalisierung des Transkriptverhältnisses in den Fibroblastenkulturen, die mit der Kombination aus 5-Aza-dC und TSA behandelt wurden, auf der Wirkung des TSA beruht. Die Ergebnisse deuten demnach darauf hin, dass das verschobene Transkriptverhältnis von *BAPX1* bei den Patienten P20 und P50 über eine fehlerhafte Histonacetylierung/Histondeacetylierung hervorgerufen wird. In den Fibroblastenkulturen der Patientin P90 kann mit keinem der verwendeten Inhibitoren eine Normalisierung des Transkriptverhältnisses erreicht werden. Bei dieser Patientin scheint ein alternativer Mechanismus für das verschobene Transkriptverhältnis verantwortlich zu sein.

5. Diskussion

5.1 Kandidatengene möglicher allelischer Fehlbildungssyndrome

Das Okulo-Aurikulo-Vertebrale Spektrum (OAVS) ist ein sehr heterogenes Krankheitsbild mit einigen klinischen Auffälligkeiten, die auch bei anderen Fehlbildungssyndromen zu finden sind. Aufgrund der klinischen Überlappungen mit dem Treacher Collins-Syndrom (TCS), der Branchio-Oto-Renalen Dysplasie (BOR) und dem Townes-Brocks-Syndrom (TBS) bestand die Vermutung, dass es sich bei OAVS und TCS, BOR bzw. TBS um allelische Fehlbildungssyndrome handeln könnte. Das heißt, dass OAVS und eines der weiteren Fehlbildungssyndrome mit bekannter Ursache eine gemeinsame genetische Grundlage haben könnten. Aus diesem Grund wurden Patienten mit OAVS, die einen überlappenden Phänotyp zum TCS zeigen, auf Mutationen im *TCOF1*-Gen untersucht (siehe Tabelle 4.1). Patienten mit OAVS und einem überlappenden Phänotyp zum BOR wurden auf Mutationen im *EYA1*-Gen untersucht (siehe Tabelle 4.2). In Kooperation mit PD Dr. J. Kohlhase (Freiburg) wurden Patienten mit OAVS und einem überlappenden Phänotyp zu TBS auf Mutationen im *SALL1*-Gen untersucht. Das einheitliche Ergebnis aller Untersuchungen war, dass keine Mutationen in den Genen, die für die möglichen allelischen Fehlbildungssyndrome verantwortlich sind, bei Patienten mit OAVS gefunden werden konnten. Demnach ist es unwahrscheinlich, dass es sich bei OAVS und TCS, BOR bzw. TBS um allelische Fehlbildungssyndrome handelt. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit zwischenzeitlich erschienenen Arbeiten, die ebenfalls keine genetischen Zusammenhänge zwischen den Fehlbildungssyndromen herstellen konnten (Splendore *et al.*, 2000; Teber *et al.*, 2004; Thiel *et al.*, 2005).

5.2 Positionelle und funktionelle Kandidatengene

5.2.1 Das *RAB28*-Gen

Der Chromosom 4-Bruchpunkt bei einer Patientin mit OAVS, multiplen kartilaginären Exostosen und einer Translokation t(4;8)(p15.3;q24.1) zerreißt das *RAB28*-Gen im Intron 3. Es kodiert für eine GTPase, einen zellulären Schalter, der in Transportprozesse und in die Signalweiterleitung involviert ist (Brauers *et al.*, 1996).

Interessanterweise wurden RAB-GTPasen bereits mit syndromalen Erkrankungen in Verbindung gebracht. So sind beispielsweise Mutationen im *RAB27A* ursächlich für das

Griscelli-Syndrom Typ II, charakterisiert durch partiellen Albinismus und Immundefizienzen (Griscelli *et al.*, 1978; Menasche *et al.*, 2000). Des Weiteren wurden Mutationen im *RAB7*-Gen bei Patienten mit Charcot-Marie-Tooth Typ IIB, vornehmlich charakterisiert durch eine sensorische Neuropathie, nachgewiesen (Kwon *et al.*, 1995; Verhoeven *et al.*, 2003).

RAB28 wurde bei 75 Patienten mit OAVS untersucht, jedoch wurden keine Mutationen nachgewiesen (siehe Tabelle 4.3). Die einzige Sequenzveränderung im kodierenden Bereich (c.579 T>C, I193I) führt nicht zu einem Austausch einer Aminosäure und liegt auch nicht in einer Konsensussequenz für einen putativen „exonic splice enhancer“ (ESE) (Cartegni *et al.*, 2002). Die Sequenzveränderungen, die in den Introns 4 und 7 nachgewiesen werden konnten, betreffen keine bekannte Sequenz, die für die Prozessierung der prä-mRNA von Bedeutung ist. Auch die Variationen 1 und 5, bei denen ein Adenin (hochkonserviert in der „branch site“ in Introns) verloren geht, können aufgrund ihrer Lage zu den Exon/Intron-Grenzen als nicht bedeutsam für die Prozessierung der prä-mRNA angesehen werden.

Da keine Mutationen im *RAB28*-Gen identifiziert werden konnten und eine genauere funktionelle Charakterisierung von *RAB28*, die auf eine Beteiligung an der Ausprägung von OAVS schließen lässt, derzeit nicht vorliegt, wurde die Untersuchung dieses Gens nach 75 Patienten eingestellt.

5.2.2 Das *BAPX1*-Gen

Nicht durch die Translokation zerrissen, aber nur ca. 76,4kb proximal zum Translokationsbruchpunkt gelegen, war *BAPX1* ein weiteres Kandidatengen. Aufgrund seiner chromosomalen Lage, insbesondere aber aufgrund seines embryonalen Expressionsmusters in Zebrafisch, Huhn und Maus und aufgrund von Studien an „knock-out“-Mäusen, war es das aussichtsreichste Kandidatengen. Auch wenn der kodierende Bereich von *BAPX1* nicht durch die Translokation beeinflusst wird, könnte die chromosomale Aberration zu einer fehlerhaften Regulation führen. In mehreren Arbeiten wurde gezeigt, dass durch Translokationen die Expression von Genen beeinflusst werden kann, die weit entfernt vom Translokationsbruchpunkt liegen. Beispielsweise wird die Expression der Gene *SHH* und *SOX9*, beides Transkriptionsaktivatoren von *Bapx1* in der Maus (Zeng *et al.*, 2002), durch Translokationen beeinflusst, die bis zu 1000kb 5' ihrer kodierenden Sequenz liegen (Lettice *et al.*, 2002; Pop *et al.*, 2004). Dies wiederum wird auf zwei mögliche Ursachen zurückgeführt. Zum Einen kann durch eine Translokation ein Gen von seinen *cis*-aktiven Regulationseinheiten getrennt werden, zum Anderen kann die lokale und/oder globale Chromatinstruktur am betreffenden Gen durch die Translokation so verändert sein, dass das Gen stillgelegt wird (Kleinjan & van Heyningen, 2005). Die zweite Ursache wird in Anlehnung

an den bei *Drosophila melanogaster* entdeckten „position effect variegation“ (PEV) diskutiert (Muller, 1930).

BAPX1 ist Teil einer evolutionär konservierten Gruppe von Homeoboxgenen, die auf das NK-„Cluster“ zurückgeht (Garcia-Fernandez, 2005). Auf dem humanen Chromosom 4 finden sich distal von *BAPX1* zwei weitere Homeoboxgene (*MSX1* und *HMX1*). Die gleiche Anordnung der Gene findet sich auf dem murinen Chromosom 5 wieder (Abbildung 5.1, Pollard & Holland, 2000).

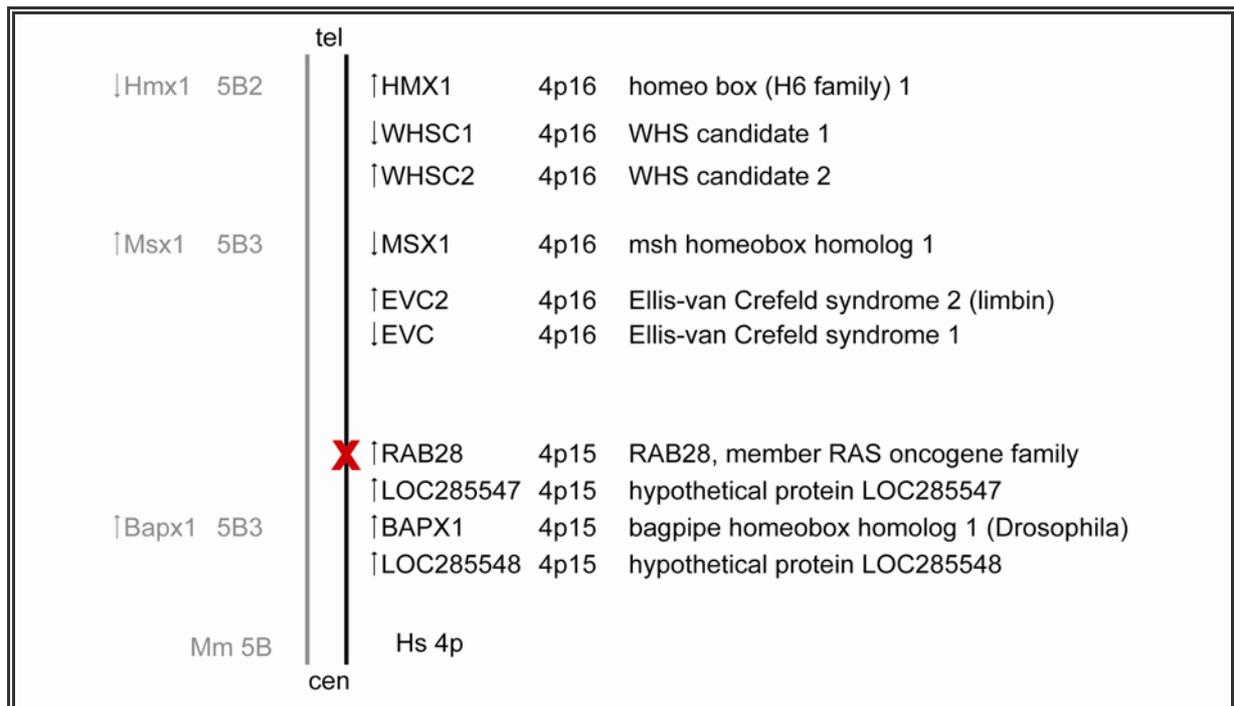


Abbildung 5.1: Genomische Region der Chromosomen 4p beim Menschen und 5B bei der Maus. Die Homeoboxgene *Hmx1* (*HMX1*), *Msx1* (*MSX1*) und *Bapx1* (*BAPX1*) sind in der gleichen Orientierung angeordnet. Auf dem menschlichen Chromosom 4 finden sich weitere Regionen und Gene, die in die Gesichtsentwicklung involviert sind (*WHSC1*, *WHSC2*, *EVC1* & *EVC2*). X: Bruchpunkt

MSX1-Mutationen werden mit dem Auftreten von Hypodontie mit/ohne Lippen- und/oder Gaumenspaltbildung und dem Witkop-Syndrom in Verbindung gebracht (De Muyneck *et al.*, 2004; Hudson & Witkop, 1975). Deletionen von *MSX1* werden als mitverantwortlich für das Wolf-Hirschhorn-Syndrom angesehen, charakterisiert unter anderem durch mentale Retardierung, Herzfehlbildung und Spaltbildung des Gesichts (Nieminen *et al.*, 2003). Des Weiteren werden verschiedene Translokationen mit 4p-Beteiligung im Zusammenhang mit dem Wolf-Hirschhorn-Syndrom berichtet (Altherr *et al.*, 1991; Giglio *et al.*, 2002; Goodship *et al.*, 1992; Wieczorek *et al.*, 2000). Das *HMX1*-Gen wurde ursprünglich mit dem Ellis-van Crefeld-Syndrom, charakterisiert durch kurze Extremitäten und Rippen, postaxiale Polydaktylie und dysplastische Nägel und Zähne, in Verbindung gebracht (Polymeropoulos *et al.*, 1996). Inzwischen sind jedoch zwei Gene, in denen Mutationen ursächlich für das Ellis-van Crefeld-Syndrom sind, identifiziert worden (Galdzicka *et al.*, 2002; Ruiz-Perez *et al.*,

2000). Funktionell scheint die Region 4p15-16 also unter anderem wichtig für die Entwicklung von Strukturen des Gesichts zu sein. Die dort lokalisierten Homeoboxgene bilden zwar kein klassisches Homeoboxgen-„Cluster“, dessen Expression koordiniert reguliert wird (Kmita & Duboule, 2003), sie könnten aber eine funktionelle Gruppe bilden. Das Zerreißen dieser evolutionär konservierten Gruppe könnte somit zu einer fehlerhaften Regulation von *BAPX1* führen.

Die Mutationsanalyse von *BAPX1* bei Patienten mit OAVS ergab sechs neue Sequenzveränderungen in den Protein-kodierenden Bereichen (Tabelle 4.4). Drei Sequenzveränderungen führen zu einer Aminosäuresubstitution (c.292 A>T, S98C; c.323 C>G, A108G; c.493 G>C D165H). Keine dieser Substitutionen liegt in einer der konservierten Domänen von *BAPX1* (Tribioli & Lufkin, 1997). Die Substitution A108G kann vernachlässigt werden, da sich die Aminosäuren Alanin und Glycin sehr ähnlich sind und die Veränderung auch in einer von 300 Normalpersonen und bei gesunden Familienangehörigen von zwei von drei Patienten (P82, P90) gefunden wurde. Die Substitution S98C wurde bei einem Patienten (P50), jedoch nicht in Normalpersonen gefunden. Die Veränderung konnte aber bei der gesunden Mutter des Patienten nachgewiesen werden. Die Substitution von Serin zu Cystein führt zu einem Austausch einer Hydroxyl- zu einer Sulfhydryl-Gruppe, die sich chemisch sehr ähnlich sind, und deshalb ebenfalls vernachlässigt werden kann. Die Substitution D165H wurde bei zwei Patienten und einer Normalperson gefunden und führt zu einem Austausch der sauren Aminosäure Aspartat zur basischen Aminosäure Histidin. Bei einem Patient (P20) lässt sich die Transmission der Sequenzvariation vom Großvater über den Vater nachweisen. Eine Substitution D>H ist nicht zu vernachlässigen, da sie jedoch auch bei Normalpersonen gefunden wurde, ist ein Zusammenhang mit der Ausprägung von OAVS unwahrscheinlich.

Zwei der oben genannten und eine weitere Sequenzveränderung (c.126 G>T, S42S; c.323 C>G A108G; c.493 G>C, D165H) liegen in Konsensussequenzen potenzieller ESEs. Veränderungen dieser Sequenzen könnten sich auf die Prozessierung der prä-mRNA auswirken und somit zu einem fehlerhaften Transkript und ggf. zu einem fehlerhaften Protein führen (Cartegni *et al.*, 2002). Die Sequenzveränderungen in den ESEs betreffen Nukleotide, die in Mensch und Maus konserviert sind, das heißt diese Nukleotide könnten essenziell für das korrekte Prozessieren der prä-mRNA sein. Wie bereits erwähnt, konnten die Sequenzveränderungen c.323 C>G und c.493 G>C sowohl bei gesunden Familienangehörigen als auch bei Normalpersonen nachgewiesen werden. Auch die Sequenzveränderung c.126 G>T (P1, P18, P113) konnte bei Normalpersonen und gesunden Familienangehörigen (P18) nachgewiesen werden.

Sequenzveränderungen in einem potenziellen ESE können sich im Vergleich zu Sequenzveränderungen, die zu Substitutionen von Aminosäuren führen, unterschiedlich

auswirken. Eine Sequenzveränderung in einem ESE kann, muss aber nicht zwingend zu einem fehlerhaft gespleißten Transkript führen. Da die Prozessierung der prä-mRNA ein fein regulierter Prozess ist, der vor allem beim alternativen Spleißen präzise ablaufen muss, kann eine Sequenzveränderung in einem potenziellen ESE demnach zu einem verschobenen Gleichgewicht von konstitutionell und alternativ oder fehlerhaft gespleißtem Transkript führen (Graveley, 2000).

So ließe sich erklären, dass Patienten, gesunde Angehörige und Normalpersonen die gleiche Sequenzveränderung in einem potenziellen ESE aufweisen; diese Veränderung jedoch zu einer unterschiedlichen Konzentration konstitutiv gespleißten Transkripts führen kann, die sich unter Umständen unterschiedlich auf den Phänotyp auswirkt.

5.3 Expressionsanalyse von *BAPX1*

Die vorliegenden Ergebnisse ließen Expressionsanalysen von *BAPX1* sinnvoll erscheinen. Hierbei konnte gezeigt werden, dass *BAPX1* nicht in Leukozyten und nicht in Zellen der Mundschleimhaut exprimiert wird. Das Gewebe, das sich nach Ausschluss der beiden am einfachsten zugänglichen Gewebe eignet, sind Fibroblasten, die durch eine Hautbiopsie gewonnen werden oder bei operativen Eingriffen, z.B. zur Entfernung von präaurikulären Anhängseln, zur Kieferdistraction oder zum Ohrmuschelaufbau verfügbar werden. *BAPX1* zeigt hier eine schwache, aber nachweisbare Expression. Da das Material einer Hautbiopsie oder von operativen Eingriffen für die Untersuchungen nicht ausreichte, wurde das primäre Biopsat kultiviert, und Fibroblastenkulturen wurden angelegt.

5.3.1 Untersuchung des allelischen Transkriptverhältnisses

Bei insgesamt 12 Patienten mit OAVS konnte die Expression von *BAPX1* untersucht werden. Die Ergebnisse der RT-PCR ergaben keine Hinweise auf fehlerhaft prozessierte mRNA. Für alle zwölf Patienten wurden SNaPshot-Analysen durchgeführt, um das Transkriptverhältnis zu untersuchen. Fünf der 12 untersuchten Patienten (P18, P20, P50, P90, P110) zeigten ein verschobenes Transkriptverhältnis von *BAPX1* (siehe Abbildung 4.7 A).

Von den fünf Patienten mit verschobenem Transkriptverhältnis weisen drei Patienten (P18, P20, P90) eine Sequenzveränderung in Konsensussequenzen potenzieller ESEs auf. In zwei dieser Fälle (P20, P90) ist das unterrepräsentierte Allel dasjenige, das die Sequenzveränderung im ESE zeigt. In diesen beiden Fällen könnte durch die Veränderung im ESE fehlerhaft prozessierte RNA durch einen Prozess ähnlich dem „nonsense-mediated

mRNA decay“ (NMD) (Maquat, 2004) abgebaut worden sein, und so zu einem verschobenen Transkriptverhältnis führen. Gegen diese Vermutung spricht jedoch, dass der Vater von P20, der ebenfalls die Sequenzveränderung im ESE hat, ein ausgeglichenes Transkriptverhältnis zeigt. Es muss also in diesem Fall davon ausgegangen werden, dass nicht ein Allel nach Transkription degradiert wird, sondern ein Allel fehlerhaft reguliert und dadurch fehlerhaft transkribiert wird. Dieser Mechanismus muss auch für P18 angenommen werden, da bei ihr das unterrepräsentierte Allel die Normalsequenz im ESE trägt.

Ursachen für ein verschobenes Transkriptverhältnis können unter anderem Mutationen in *cis*-regulativen Elementen (Promotor, „enhancer“, Erkennungssequenzen für Transkriptionsfaktoren) sein. Sequenzanalysen des Promotors von *BAPX1* und von Erkennungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren Pax1/Pax9, Pax6 und Meox1 (Rodrigo *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2004) zeigten jedoch keine Auffälligkeiten, die sich mit einem verschobenen Transkriptverhältnis in Zusammenhang bringen ließen.

Es bleibt anzumerken, dass die Transkriptverhältnisse bei den Normalpersonen nicht wie erwartet äquimolar sind, sondern eine Streuung um den Wert 1,77 zeigen. Pastinen *et al.* haben die Expression von 126 Genen in CEPH (Centre du Etude Polymorphisme Humain)-Familien untersucht und konnten bei 23 Genen (18%) eine Abweichung vom äquimolaren Verhältnis nachweisen, die auf *cis*-regulativen genetischen und/oder epigenetischen Variationen beruht (Pastinen *et al.*, 2004). In weiteren Studien an humanen Gehirnen von Verstorbenen und fetalem Leber- und Nierengewebe zeigten sogar 25-50% der untersuchten Gene eine Abweichung vom äquimolaren Verhältnis (Bray *et al.*, 2003; Lo *et al.*, 2003). Ein von 1,0 abweichendes Transkriptverhältnis scheint demnach nicht ungewöhnlich. Interessanterweise gibt es jedoch auch Hinweise darauf, dass ein verschobenes Transkriptverhältnis für Krankheiten prädisponieren kann. Yan *et al.* konnten zeigen, dass eine geringe Veränderung des allelischen Transkriptverhältnisses des *APC*-Gens zu Darmkrebs prädisponiert. Die Expressionsveränderungen wurden auf *cis*-regulative genetische Variationen zurückgeführt (Yan *et al.*, 2002).

Bemerkenswert ist, dass nicht nur bei den Transkriptverhältnissen eine Abweichung vom äquimolaren Verhältnis beobachtet werden konnte. Hinweise für eine Abweichung vom äquimolaren allelischen Verhältnis von *BAPX1* auf Ebene der genomischen DNA konnte mit Hilfe von SNaPshot-Analysen bei dem Patienten P107 gewonnen werden. Hier könnte es sich um ein somatisches Mosaik von Zellen mit einer Deletion oder Duplikation eines *BAPX1*-Allels handeln. Diese Beobachtung lässt im Weiteren die Vermutung zu, dass Patienten, die an keiner der identifizierten Sequenzveränderungen im *BAPX1*-Gen heterozygot waren, hemizygot sind, d.h. dass sie möglicherweise eine Deletion eines *BAPX1*-Allels haben. Berechnet man die Heterozygoten-Häufigkeit für den häufigen Polymorphismus c.247 A>C ergibt sich jedoch eine Rate von 55,4% bei den Patienten und

eine Rate von 46,2% bei den Normalpersonen. Eine Deletion von *BAPX1* ist demnach keine häufig auftretende genetische Veränderung bei Patienten mit OAVS. In Einzelfällen könnte jedoch eine Deletion vorliegen. Für diese Untersuchungen kommen vor allem Patienten in Frage, die eine seltene, homozygot erscheinende Veränderung haben wie der Patient P76, der nur das seltene Allel c.999+945 C am 3'-UTR Polymorphismus c.999+945 zeigt.

5.3.2 Segregationsanalyse des verschobenen Transkriptverhältnisses

Die Segregationsanalyse ergab, dass das verschobene Transkriptverhältnis in einem Fall *de novo* auftrat und in zwei Fällen vererbt worden ist (Abbildung 4.8).

Bei P20 tritt das verschobene Transkriptverhältnis *de novo* auf. Interessant sind in diesem Zusammenhang zwei Fakten.

(1) In dieser Familie treten das verschobene Transkriptverhältnis und die Erkrankung *de novo* auf. Dies ist ein Hinweis darauf, dass das verschobene Transkriptverhältnis von *BAPX1* kausal mit dem Auftreten von OAVS in Verbindung steht.

(2) Die milde Ausprägung von OAVS bei diesem Patient korreliert damit, dass das Transkriptverhältnis hier nur gering verschoben erscheint. Ein Grund hierfür dürfte die Tatsache sein, dass dieser Patient ein somatisches Mosaik für das verschobene Transkriptverhältnis aufweist, denn in drei von vier Fibroblastenkulturen konnte kein verschobenes Transkriptverhältnis nachgewiesen werden. Hier geht möglicherweise ein deutlich verschobenes Transkriptverhältnis in einer Population von Zellen mit ausgeglichenem Transkriptverhältnis unter. Dieser Patient bietet neben Patient P107, der ein Mosaik auf Ebene der genomischen DNA aufweist, den zweiten Hinweis darauf (hier auf RNA-Ebene), dass OAVS durch eine genetische Ursache hervorgerufen wird, die als somatisches Mosaik vorliegt. Das wiederum steht im Einklang mit der Diskussion, wie die asymmetrische Manifestation und das einseitige Auftreten einiger klinischer Zeichen von OAVS zu erklären sind.

In der Familie P18 wird das verschobene Transkriptverhältnis vom Vater vererbt. Die Patientin hat ein unterrepräsentiertes Allel, das sie von ihrem Vater geerbt hat. Beim Vater, der ebenfalls ein verschobenes Transkriptverhältnis aufweist, ist genau dieses Allel auch unterrepräsentiert. Ursache für die zu schwache Expression dieses Allels könnte eine Mutation in einem *cis*-regulativen Element oder eine Epimutation sein, die in *cis* wirkt. Aufgrund des unterrepräsentierten Allels war zu erwarten, dass sich dies auch auf die Transkriptmenge insgesamt auswirkt und diese im Vergleich zu Normalpersonen verringert erscheint.

Schwieriger ist die Familie von P50 zu erklären. Hier ist das unterrepräsentierte Allel von P50 das Allel, das von der Mutter vererbt wird. Diese zeigt ein ausgeglichenes Transkriptverhältnis. Der Vater von P50 hingegen zeigt ebenfalls ein verschobenes Transkriptverhältnis. Sein unterrepräsentiertes Allel wird jedoch nicht vererbt. In diesem Fall scheinen das unterrepräsentierte Allel (von der Mutter, die ein ausgeglichenes Transkriptverhältnis hat) und das verschobene Transkriptverhältnis (vom Vater) nicht gekoppelt vererbt zu werden. Die Transmission des verschobenen Transkriptverhältnisses unabhängig vom betroffenen Allel ist schwierig zu erklären, da man erwartet, dass die Ursache für die fehlerhafte Regulation eines Allels an das entsprechende Allel gekoppelt und in *cis* aktiv ist. Für eine „*trans*“-aktive Ursache ist eine fehlerhafte Regulation nur eines Allels schwierig nachvollziehbar. Eine Transmission dieser Art konnte allerdings bereits für die monoallelische Expression des *ILA1*-Gens in CEPH-Familien gezeigt werden (Pastinen *et al.*, 2004).

5.3.3 Analyse der Transkriptmenge von *BAPX1*

Es wurden sechs Patienten (P18, P20, P32, P50, P93, P107) und neun Normalpersonen auf ihre *BAPX1*-Transkriptmenge untersucht (siehe Abbildung 4.9).

Für die Patientin P18 war zu erwarten, dass sie eine reduzierte Expression von *BAPX1* zeigt. Die Werte von P18 liegen jedoch im Bereich der Expression der Normalpersonen. Da *BAPX1* in Fibroblasten *per se* schwach exprimiert ist, wird vor allem eine verringerte Expression von *BAPX1* insgesamt, die durch ein verschobenes Transkriptverhältnis hervorgerufen wird und als solche nachweisbar ist, schwierig zu detektieren sein.

Grund hierfür dürfte auch sein, dass *BAPX1* vornehmlich in der Embryonalentwicklung des ersten und zweiten Schlundbogens und bei der Morphogenese ihrer Derivate eine essenzielle Rolle spielt (Akazawa *et al.*, 2000; Lettice *et al.*, 1999; Tribioli & Lufkin, 1999). Sind diese Strukturen entwickelt, wird die Expression von *BAPX1* schwächer, bis sie lediglich nur noch als basale Expression im postnatalen Organismus nachzuweisen ist. Auf diesem niedrigen Expressionsniveau kann der Effekt einer fehlerhaften Regulation von *BAPX1* zwar als verschobenes Transkriptverhältnis nachgewiesen werden, eine Veränderung der Transkriptmenge insgesamt kann unter Umständen jedoch technisch bedingt nicht nachweisbar sein. Wie schwach *BAPX1* in Fibroblasten exprimiert wird, zeigen auch Daten von genomweiten Expressionsprofilen, die mit der Affymetrix Chip-Technologie erhoben wurden. Hier wird die Expression von *BAPX1* in Fibroblasten als nicht detektierbar eingestuft (Expressionsdaten aus Fibroblasten von Patienten mit Prader-Willi-Syndrom; Horsthemke, persönliche Mitteilung). Dass man trotzdem in Fibroblasten, in denen *BAPX1* offensichtlich

eine untergeordnete Rolle spielt, eine Veränderung der Expression detektieren kann, stützt die Überlegung, dass eine fehlerhafte *BAPX1*-Expression mit der Ausprägung von OAVS in Verbindung steht. Wenn sogar in Fibroblasten eine fehlerhafte Expression nachgewiesen werden kann, wird die Auswirkung einer fehlerhaften *BAPX1*-Expression in den sich entwickelnden kraniofazialen Strukturen, in denen *BAPX1* stark exprimiert wird, wesentlich deutlicher ausgeprägt sein und kann so zu einer fehlerhaften Entwicklung beitragen.

Die Annahme, dass *BAPX1* bei Patienten mit OAVS zu gering exprimiert ist, wird durch die Expressionsdaten der Patienten P20, P32 und P93 gestützt. In diesen drei Fällen liegt die Expression von *BAPX1* deutlich unter dem Mittelwert der Normalpersonen (siehe Abbildung 4.9).

Dem Patient P107 muss bei der Diskussion der Expression eine Sonderstellung eingeräumt werden, da man eine Auswirkung des Mosaiks auf DNA-Ebene (Deletion oder Duplikation) auf die Expression nicht absehen kann.

Die Patientin P90 konnte hier nicht untersucht werden, da keine frischen Fibroblasten für weitere Untersuchungen mehr zur Verfügung standen.

Die vorliegenden Expressionsdaten liefern Hinweise darauf, dass bei vier (P18, P20, P32, P93) von sechs untersuchten Patienten eine zum Teil deutlich verringerte *BAPX1*-Expression im Vergleich zu Normalpersonen vorliegt und somit ein Zusammenhang zwischen verringerter *BAPX1*-Expression und der Ausprägung von OAVS hergestellt werden kann.

Im Gegensatz dazu zeigt Patient P50 eine deutlich erhöhte Expression von *BAPX1* im Vergleich zu den Normalpersonen. Er scheint eine Ausnahme darzustellen, oder es liegt hier ein technisches Artefakt vor. Schließt man ein technisches Artefakt aus, lässt sich für P50 eine eigene Erklärung finden, die jedoch im Widerspruch zu den anderen Patienten steht. Für P50 muss dann angenommen werden, dass das Allel, das der Vater an den Patienten vererbt, fälschlicherweise aktiv ist und deswegen überrepräsentiert erscheint. Ein fälschlicherweise aktives Allel in einem regulär schwach exprimierten Gen könnte dann zu einem stark verschobenen Transkriptverhältnis und zu einer deutlich erhöhten Expression von *BAPX1* führen.

5.3.4 Untersuchungen mit Inhibitoren epigenetischer Transkriptionsregulatoren

Um die Ursache des verschobenen Transkriptverhältnisses zu identifizieren, wurden Fibroblasten von Patienten mit OAVS mit TSA (Histondeacetylase-Inhibitor) und 5-Aza-dC (DNA-Methyltransferase-Inhibitor) kultiviert und die Auswirkung der Inhibitoren auf die Expression von *BAPX1* untersucht. Es konnte für die Patienten P20 und P50 gezeigt

werden, dass TSA das verschobene Transkriptverhältnis ausgleichen kann, wogegen 5-Aza-dC keinen Effekt hat (siehe Abbildung 4.14).

Für den Patienten P20 lässt sich anhand des verschobenen Transkriptverhältnisses, der reduzierten Transkriptmenge und dem ausgleichenden Effekt von TSA auf das verschobene Transkriptverhältnis schließlich folgendes Modell postulieren. Die verminderte Expression eines *BAPX1*-Allels führt zu einer verminderten Transkriptmenge insgesamt. Mit TSA lässt sich das unterrepräsentierte Allel reaktivieren und so das verschobene Transkriptverhältnis ausgleichen. Der Mechanismus der Transkriptionsregulation über gezielte Histondeacetylierung ist bereits für einige Gene beschrieben worden (Cai *et al.*, 2003; Luo *et al.*, 2001; Morrison *et al.*, 2002).

Für die Patientin P18 lässt sich das gleiche Modell postulieren. Jedoch können hier lediglich Hinweise für dieses Modell angeführt werden, da die Untersuchungen mit den Inhibitoren bei dieser Patientin nicht durchgeführt werden konnten, weil von ihr keine frischen Fibroblasten mehr zur Verfügung standen. Es kann aber aufgrund von drei Tatsachen angenommen werden, dass auch bei dieser Patientin ein Allel fehlerhaft durch Histondeacetylierung abgeschaltet ist.

(1) Mit zunehmender Kulturdauer verliert sich in den Fibroblasten der Patientin P18 der Effekt des verschobenen Transkriptverhältnisses. Es handelt sich demnach in diesem Fall nicht um einen stabilen Zustand (z.B. eine Mutation im Promotor), sondern um ein Phänomen, das in Kultur nicht erhalten werden kann. Da bekannt ist, dass eine epigenetische Genregulation in transienten Zellkulturen nicht stabil ist (Horsthemke, persönliche Mitteilung), spricht dies für eine epigenetische Regulation von *BAPX1*.

(2) Die Regulation von *BAPX1* über DNA-Methylierung kann bei dieser Patientin als unwahrscheinlich angesehen werden, da die Methylierungsanalyse der 5'-CpG-Insel von *BAPX1* in diesem Fall keine DNA-Methylierung zeigte.

(3) Aus Studien beim Zebrafisch und bei der Maus ist bekannt, dass die Expression von *bapx1* (*Nkx3.2/Bapx1*) über Histonacetylierung/deacetylierung reguliert wird. Beim Zebrafisch ist die Histonacetyltransferase *moz* für die Aufrechterhaltung der *hox1-4*-Expression in den Kiemenbögen essenziell. Die Expression von *hoxa2* im zweiten Kiemenbogen bewirkt dann die Expression von *bapx1* (Miller *et al.*, 2003; Miller *et al.*, 2004).

Gegen die oben aufgestellten Modelle spricht auf den ersten Blick Patientin P90, die das am stärksten verschobene Transkriptverhältnis zeigt, das sich mit den Inhibitoren nicht ausgleichen lässt. Hier müsste postuliert werden, dass das über Histondeacetylierung hervorgerufene verschobene Transkriptverhältnis mit einem Histondeacetylase-Inhibitor nicht wieder zu aktivieren ist. Diese Tatsache ist schwierig zu erklären. Hier können zwei alternative Mechanismen eine Rolle spielen.

(1) Bei dieser Patientin liegt eine Promotor- oder „enhancer“-Mutation vor, die die Expression des zweiten Allels vollständig verhindert. Dagegen spricht jedoch, dass keine Veränderungen im Promotor und in den Erkennungssequenzen der Transkriptionsfaktoren Pax1/Pax9, Pax6 und Meox1 (Rodrigo *et al.*, 2003; Rodrigo *et al.*, 2004) identifiziert werden konnten. Eine Segregationsanalyse könnte hier einen weiteren Hinweis liefern. Hat ein Elternteil auch ein verschobenes Transkriptverhältnis, wäre es interessant, ob das unterrepräsentierte Allel dasjenige ist, das auch bei der Patientin unterrepräsentiert ist. Bei einer postulierten Promotor- oder „enhancer“-Mutation muss die Mutation mit dem unterrepräsentierten Allel vererbt werden.

(2) Wie oben bereits diskutiert, trägt das nicht nachweisbare Allel dieser Patientin eine Sequenzveränderung in der Konsensussequenz eines potentiellen ESE. Hier könnte also tatsächlich das Allel, das die Veränderung im ESE trägt, durch einen Mechanismus ähnlich dem „nonsense-mediated decay“ abgebaut werden. Des Weiteren wäre interessant zu untersuchen, ob eine Behandlung von Fibroblastenkulturen dieser Patientin mit einem NMD-Inhibitor (z.B: Cycloheximid) zur Nachweisbarkeit des zweiten Allels führt. Sollte das zweite Allel nach Behandlung der Fibroblastenkulturen wieder nachweisbar werden, wäre das ein Hinweis auf eine Beteiligung von ESEs und von posttranskriptionaler Degradierung der mRNA an dem verschobenen Transkriptverhältnis von *BAPX1* in diesem Fall.

Festzuhalten bleibt für P90, dass auch dieses Modell für ein unterrepräsentiertes, abgeschaltetes oder fehlendes Allel spricht, was zu einer reduzierten Transkriptmenge führen könnte. Interessant wäre es, die Expression von *BAPX1* insgesamt bei dieser Patientin zu untersuchen. Erwarten würde man, nach den oben dargestellten möglichen Ursachen des verschobenen Transkriptverhältnisses, in diesem Fall eine deutlich verringerte Expression von *BAPX1*, ähnlich der Expressionsdaten von P32 und P93.

Die Ergebnisse für P50 zeigen ebenfalls, dass sich das verschobene Transkriptverhältnis nach Behandlung mit TSA ausgleichen lässt (siehe Abbildung 4.14). Da keine Mutationen im Promotor und in den untersuchten Erkennungssequenzen für die Transkriptionsfaktoren identifiziert werden konnten, ließe sich aus den vorliegenden Daten schließlich, unter der Voraussetzung, dass es sich nicht um ein technisches Artefakt handelt, für den Patienten P50 folgendes Modell aufstellen. Ursächlich für das verschobene Transkriptverhältnis könnte bei diesem Patienten eine Mutation in einer „upstream repressor sequence“ (URS) sein. Eine Histondeacetylase (HDAC) wird über einen Korepressor an diese URS rekrutiert, bewirkt somit eine Deacetylierung von Histonen in der direkten Umgebung der URS und sorgt über diesen Mechanismus für das Abschalten des entsprechenden Allels. Mit einer Mutation in der URS kann der Korepressorkomplex mit der HDAC nicht binden und das Allel mit der Mutation kann entsprechend nicht korrekt abgeschaltet werden. Nach Behandlung der

Fibroblastenkulturen mit TSA wird das korrekt abgeschaltete Allel reaktiviert und das verschobene Transkriptverhältnis ausgeglichen.

Als Fazit muss festgehalten werden, dass auch nach der Untersuchung der Ursachen für das verschobene Transkriptverhältnis kein einheitliches Modell für die untersuchten Patienten aufzustellen ist. Bei Patient P50 könnte ein *BAPX1*-Allel fälschlicherweise aktiv sein, was zu einer deutlichen Zunahme der Expression führt. Anhand dieser Daten lässt sich zwar für P50 ein in sich stimmiges Modell aufbauen, das jedoch nicht auf die anderen untersuchten Patienten übertragen werden kann.

5.4 Ausblick, allgemeine Diskussion und Fazit

Um ein deutlicheres Bild davon zu erhalten, ob *BAPX1* fälschlicherweise zu gering oder erhöht exprimiert ist, lässt sich überlegen, ob in weiteren Studien die RNA der Fibroblasten, die mit TSA und/oder 5-Aza-dC behandelt wurden, mit dem „Taqman Gene Expression Assay“ untersucht werden. So ließe sich unter Umständen klären, ob die Reversion des verschobenen Transkriptverhältnisses bei Patient P20 zu einer Erhöhung der *BAPX1*-Expression insgesamt führt, was das oben dargestellte Modell für P18 und P20 stützen würde. Das gleiche Experiment sollte mit frischen Fibroblasten der Patientin P18 durchgeführt werden. Insgesamt ist dies jedoch technisch schwierig, da die Auswirkung der eingesetzten Inhibitoren auf die Referenzgene nicht absehbar ist und somit eine Quantifizierung der *BAPX1*-Expression anhand von Referenzgenen nicht sinnvoll erscheint. Hier könnte eine absolute Quantifizierung der *BAPX1*-Expression durchgeführt werden, wofür jedoch zunächst Eichkurven mit verschiedenen Verdünnungsreihen erstellt werden müssten.

Außerdem dürfte die Analyse der Transkriptmenge bei Patientin P90 und bei ihren Eltern und auch bei dem Vater von P50 einen klareren Einblick in die Transmission des verschobenen Transkriptverhältnisses und in die Ursache für das verschobene Transkriptverhältnis liefern. Schließlich sollte erwähnt werden, dass die interessanten Ergebnisse der Untersuchungen auf DNA- und RNA-Ebene eine Analyse von *BAPX1* auf Protein-Ebene sinnvoll und notwendig erscheinen lassen.

Es bleibt abschließend anzumerken, dass nicht alle Patienten eine Auffälligkeit in der Expression von *BAPX1* zeigen. Dies spricht jedoch nicht gegen dieses Phänomen als mögliche Ursache für die Ausprägung von OAVS.

Da es sich bei OAVS um ein phänotypisch sehr heterogenes Krankheitsbild handelt, wird diskutiert, dass es auch genetisch heterogen sein könnte. Es wäre demnach möglich, dass Patienten mit OAVS, die keine Auffälligkeit in der Expression von *BAPX1* zeigen, eine andere genetische Ursache aufweisen können. Mögliche Kandidaten wären Gene aus dem genetischen Netzwerk, in das *BAPX1* eingebunden ist. Ein Beispiel hierfür wäre *GSC*. In Zebrafischen, die eine Mutation im *hand2*-Gen aufweisen, geht die Expression von *gsc* im ersten Kiemenbogen verloren, während sich die Expression von *bapx1* ektopisch in diese Region ausbreitet. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass *gsc* die Expression von *bapx1* reprimiert (Miller *et al.*, 2004). Interessanterweise identifizierten Kelberman *et al.* in einer Familie mit hemifazialer Mikrosomie über „linkage“-Analysen eine Region auf Chromosom 14q32, in der das humane *GSC* lokalisiert ist. Aufgrund des Expressionsmusters von *gsc* und des Phänotyps von *gsc* „knock-out“-Mäusen (Rivera-Perez *et al.*, 1995; Yamada *et al.*, 1995) haben Kelberman *et al.* *GSC* als Kandidatengen für die hemifaziale Mikrosomie publiziert (Kelberman *et al.*, 2001). Diese Ergebnisse stützen die Vermutung, dass *BAPX1* mit der Ausprägung von OAVS kausal in Verbindung steht. Weitere Kandidatengene ließen sich von „knock-out“-Mäusen ableiten, die Fehlbildungen in sich entwickelnden kraniofazialen Strukturen aufweisen. Beispiele hierfür wären die „knock-out“-Mäuse für *hoxa-2* (Gendron-Maguire *et al.*, 1993), *ET_A* (Clouthier *et al.*, 1998), *ET-1* (Kurihara *et al.*, 1994), *hand2* (Ruest *et al.*, 2003; Srivastava *et al.*, 1997), *Msx1* (Satokata & Maas, 1994), sowie die „*Hfm*“-Maus (Naora, 1994) und die „*far*“-Maus (Juriloff, 1991).

Des Weiteren wird diskutiert, dass OAVS eine multifaktorielle Erkrankung sein könnte. Demnach wäre es denkbar, dass Patienten mit OAVS, die keine Auffälligkeit in der Expression von *BAPX1* zeigen, keine genetische Ursache für die Ausprägung von OAVS haben. Als exogene Faktoren werden mütterlicher Diabetes mellitus (Ewart-Toland *et al.*, 2000; Grix, 1982), die Einnahme von Thalidomid (Miehlke & Partsch, 1963; Rosenal, 1965), Primidon (Gustavson & Chen, 1985) oder Retinolsäure (Lammer *et al.*, 1985; Mounoud *et al.*, 1975) während der Schwangerschaft berichtet. Außerdem wird eine frühe Gefäßdisruption mit Hämatomformation *in utero* diskutiert (Poswillo, 1973). Schließlich wird auch eine Überreife der Eizelle zum Zeitpunkt der Befruchtung („Overripeness Ovopathy“) als mögliche Ursache von OAVS diskutiert (Jongbloet, 1987).

Es war auffällig, dass nicht betroffene Familienangehörige die gleichen Veränderungen zeigen wie die Patienten. Diese Tatsache spricht nicht gegen diese Veränderungen als Ursache von OAVS.

Hier kann als Erklärung das Konzept der verminderten Penetranz herangezogen werden. Interessant ist in diesem Zusammenhang die Tatsache, dass die „*Hfm*“-Maus eine deutlich verminderte Penetranz zeigt. Nur 22% der heterozygoten Tiere zeigen eine dysmorphe

Kraniofazies (Cousley *et al.*, 2002). Dies könnte erklären, warum gesunde Familienangehörige ebenfalls ein verschobenes Transkriptverhältnis zeigen, den Phänotyp jedoch nicht ausprägen. Des Weiteren könnte dies die hohe Zahl von spontan auftretenden Fällen von OAVS erklären. In den Familien der Patienten P18 und P20 wird das verschobene Transkriptverhältnis jeweils vom gesunden Vater an die Patienten vererbt. In diesen Fällen könnte es sich also um verminderte Penetranz handeln.

Auffällig ist in diesem Zusammenhang aber auch, dass das verschobene Transkriptverhältnis bei den Vätern geringer ausgeprägt ist als bei den Patienten. Es ließe sich hieraus auch das Konzept der Antizipation ableiten. Schließt man einen Erhebungsfehler aus, kann man in vielen Familien mit OAVS eine Zunahme der klinischen Zeichen in den aufeinander folgenden Generationen beobachten. Die Eltern zeigen einen milden Phänotyp, wogegen die Patienten schwerer betroffen sind. Vor diesem Hintergrund kann ein verschobenes Transkriptverhältnis bei den Eltern zur Ausprägung von OAVS prädisponieren und bei Überschreiten eines Schwellenwerts dann zur Ausprägung von OAVS führen. Auch das *de novo* auftretende verschobene Transkriptverhältnis bei P20, das relativ schwach ausgeprägt ist und mit einem milden Phänotyp korreliert, spricht für diese Überlegung.

Zum verschobenen Transkriptverhältnis sollen hier noch zwei allgemeine Gedanken angemerkt werden.

(1) Bei der Einteilung zwischen ausgeglichenem und verschobenem Transkriptverhältnis handelt es sich um eine statistische Abgrenzung, der gewisse Annahmen zu Grunde liegen, unter anderem die Normalverteilung der Werte für die Transkriptverhältnisse der Normalpersonen. Die so errechnete Grenze muss demnach nicht mit einem natürlichen Schwellenwert übereinstimmen. So könnte auch ein verschobenes Transkriptverhältnis $>2,89$ noch im Normbereich liegen. Das verschobene Transkriptverhältnis könnte *in vivo* durch verschiedene Faktoren, die auf die Expression von *BAPX1* oder auf die Translation der *BAPX1*-mRNA wirken kompensiert werden und erst bei einem stärker verschobenen Transkriptverhältnis einen Schwellenwert erreichen, der sich phänotypisch auswirkt. So konnte in einer Studie von Pastinen *et al.* gezeigt werden, dass das verschobene Transkriptverhältnis des *IGF1*-Gens einen weiten Normbereich der Transkriptverhältnisse (80:20 – 20:80) zeigt (Pastinen *et al.*, 2004).

(2) Weiterhin können interindividuelle Variationen in der Expression von Genen, die mit *BAPX1* interagieren, einen Schwellenwert für jede Familie individuell bestimmen. Dies steht wiederum im Einklang mit der verminderten Penetranz. Als Ursache für die verminderte Penetranz wird eine Schwellenwerttheorie („threshold theory“) diskutiert. Dieser Schwellenwert wird beeinflusst von der Expression einer Reihe von Genen, die Einfluss auf das ursächliche Gen nehmen („modifier genes“) (Lohmann, 1999).

Als weiteres Modell lässt sich ein Zwei-Schritt-Mutationsmechanismus heranziehen, der zuerst beim Retinoblastom beschrieben worden ist (Knudson *et al.*, 1975). Dieses Modell ist deswegen als ursächlicher Mechanismus attraktiv, weil die epibulbären Tumoren, die bei Patienten mit OAVS auftreten, vermutlich nach diesem Mechanismus entstehen. Demnach könnte auch OAVS in einem Zwei- oder Mehr-Schritt-(Epi)Mutationsmechanismus entstehen. Dies steht im Einklang mit der großen Anzahl sporadisch auftretender Fälle von OAVS und trägt der Vermutung Rechnung, dass es sich um ein heterogenes Fehlbildungssyndrom handelt.

Schließlich soll noch angemerkt werden, dass eine Epimutation, wie in dieser Arbeit für einen Teil der Patienten nachgewiesen, eine plausible Ursache für OAVS darstellt. Epigenetische Veränderungen stellen in der Regel keine „Alles-oder-Nichts“-Entscheidung dar, wie beispielsweise eine DNA-Mutation, und können von daher einige Besonderheiten des OAVS, wie die Diskordanz bei eineiigen Zwillingen, häufig sporadisches Auftreten, große klinische Variabilität und asymmetrische Manifestation erklären.

Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Expression von *BAPX1* bei sieben von zwölf Patienten Abweichungen von der Expression bei Normalpersonen zeigt. Dies gilt sowohl für das Transkriptverhältnis der beiden Allele (P18, P20, P50, P90, P110) als auch für die Transkriptmenge insgesamt (P32, P50, P93). In einem Fall (P50) wird *BAPX1* deutlich stärker exprimiert, was zu einer Repression von „downstream“-Genen (beispielsweise *Runx2*) führen könnte. Dieser Patient stellt jedoch eine Ausnahme dar. Im Fall P18 lässt sich anhand des verschobenen Transkriptverhältnisses diskutieren, dass während der Entwicklung der Strukturen der ersten beiden Schlundbögen *BAPX1* zu gering exprimiert wird, da ein Allel fälschlicherweise reprimiert wird. Im Fall P20 wird diese Überlegung durch die Daten des verschobenen Transkriptverhältnisses, der Untersuchung der Transkriptmenge und die Untersuchungen mit TSA und 5-Aza-dC gestützt. Für die Patienten P90 und P110, die beide ein verschobenes Transkriptverhältnis zeigen, konnte die Expression von *BAPX1* insgesamt noch nicht untersucht werden. P90 ist besonders interessant, da das sehr stark verschobene Transkriptverhältnis weder mit TSA und 5-Aza-dC ausgeglichen werden kann. Dieser Patient könnte für weitere Untersuchungen eine wichtige Rolle spielen, da hier das allelische Transkriptverhältnis stabil zu sein scheint. Bei zwei weiteren Patienten (P32 & P93) ist *BAPX1* insgesamt deutlich geringer exprimiert als bei Normalpersonen. Diese beiden Patienten zeigen ein ausgeglichenes Transkriptverhältnis. Der Grund für die geringe Expression von *BAPX1* bei diesen Patienten wird Gegenstand weiterer Untersuchungen sein.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass die Fehlregulation von *BAPX1* eine Rolle bei der Entwicklung von OAVS spielt. Absolut neuartig wäre in diesem Zusammenhang das Vorliegen einer Epimutation, hier eine fehlerhafte Histonacetylierung/deacetylierung, bei einem Fehlbildungssyndrom. Die Ergebnisse dieser Arbeit können einige genetische und phänotypische Merkmale von OAVS erklären:

- (1) Meist sporadisches Auftreten, wobei familiäre Fälle eine (epi)genetische Ursache wahrscheinlich machen.
- (2) Einseitige und/oder asymmetrische Manifestation der klinischen Zeichen, was sich durch eine Epi(Mutation) erklären lassen würde, die als somatisches Mosaik vorliegt.
- (3) Diskordanz bei monozygoten Zwillingen, was gegen eine einfache mendelnde Vererbung spricht und das Feld für eine epigenetische Diskussion öffnet.

Möglicherweise ist eine fehlerhafte epigenetische Regulation auch ursächlich in weiteren, augenscheinlich sporadisch auftretenden angeborenen Fehlbildungen. Die Ergebnisse dieser Arbeit können demnach paradigmatisch für weitere Fehlbildungssyndrome sein, womit ein Beitrag zur Entschlüsselung (epi)genetischer Mechanismen geleistet wird, die komplexen und heterogenen Krankheiten zu Grunde liegen.

6. Zusammenfassung

Ziel der Arbeit war es, einen Gendefekt für das Okulo-Aurikulo-Vertebrale Spektrum zu identifizieren.

Hierfür wurden zunächst zwei Gene (*TCOF1* & *EYA1*) bei Patienten mit OAVS untersucht, in denen Mutationen für mögliche allelische Fehlbildungssyndrome verantwortlich sind. Es konnten keine Mutationen bei Patienten mit OAVS und einem überlappenden Phänotyp zum Treacher Collins-Syndrom oder zur Branchio-Oto-Renalen Dysplasie identifiziert werden. Dies lässt den Schluss zu, dass es sich bei OAVS und TCS bzw. BOR nicht um allelische Fehlbildungssyndrome handelt.

Im Weiteren wurden zwei Gene auf Chromosom 4p15 (*RAB28* & *BAPX1*), die aufgrund einer Translokation bei einer Patientin mit OAVS identifiziert wurden, auf Mutationen bei Patienten mit OAVS untersucht. Auch hier ergab die Mutationsanalyse keine *bona fide* Mutation.

Expressionsanalysen von *BAPX1* an Fibroblastenkulturen von Patienten mit OAVS zeigten jedoch in fünf von zwölf untersuchten Fällen ein verschobenes Transkriptverhältnis. Segregationsanalysen ergaben, dass das verschobene Transkriptverhältnis in einem Fall *de novo* aufgetreten ist und in zwei Fällen vererbt wurde. In zwei von drei untersuchten Fällen konnte gezeigt werden, dass das verschobene Transkriptverhältnis mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A, jedoch nicht mit dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-Aza-2-desoxycytidin, ausgeglichen werden kann. Es konnte somit nachgewiesen werden, dass Histondeacetylierung an dem verschobenen Transkriptverhältnis beteiligt ist.

In fünf Fällen gibt es Hinweise darauf, dass *BAPX1* zu gering exprimiert wird. Diese ergeben sich aus dem verschobenen Transkriptverhältnis, der Transmission des verschobenen Transkriptverhältnisses und aus den Untersuchungen der Transkriptmenge insgesamt. Die verringerte Expression von *BAPX1* könnte zu Haploinsuffizienz während der Embryonalentwicklung führen und so zur Ausprägung von OAVS beitragen.

In zwei Fällen konnte das Vorliegen einer *BAPX1*-Veränderung als somatisches Mosaik gezeigt werden. In einem Fall führt sie zu einer Gendosisveränderung auf DNA-Ebene. In einem weiteren Fall kann auf RNA-Ebene das verschobene Transkriptverhältnis nur in einer von vier untersuchten Fibroblastenkulturen nachgewiesen werden.

Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse kann davon ausgegangen werden, dass eine fehlerhafte Regulation von *BAPX1* eine Rolle bei der Ausprägung von OAVS spielt.

- Abdelhak, S. *et al.* A human homologue of the *Drosophila* eyes absent gene underlies branchio-oto-renal (BOR) syndrome and identifies a novel gene family. *Nat Genet* **15**, 157-64 (1997a).
- Abdelhak, S. *et al.* Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (*eyaHR*) of *EYA1*. *Hum Mol Genet* **6**, 2247-55 (1997b).
- Ahn, J. *et al.* Cloning of the putative tumour suppressor gene for hereditary multiple exostoses (EXT1). *Nat Genet* **11**, 137-43 (1995).
- Akazawa, H. *et al.* Targeted disruption of the homeobox transcription factor *Bapx1* results in lethal skeletal dysplasia with asplenia and gastroduodenal malformation. *Genes Cells* **5**, 499-513 (2000).
- Altherr, M. R. *et al.* Molecular confirmation of Wolf-Hirschhorn syndrome with a subtle translocation of chromosome 4. *Am J Hum Genet* **49**, 1235-42 (1991).
- Araneta, M. R. *et al.* Goldenhar syndrome among infants born in military hospitals to Gulf War veterans. *Teratology* **56**, 244-51 (1997).
- Bassila, M. K. & Goldberg, R. The association of facial palsy and/or sensorineural hearing loss in patients with hemifacial microsomia. *Cleft Palate J* **26**, 287-91 (1989).
- Baum, J. L. & Feingold, M. Ocular aspects of Goldenhar's syndrome. *Am J Ophthalmol* **75**, 250-257 (1973).
- Bennun, R. D., Mulliken, J. B., Kaban, L. B. & Murray, J. E. Microtia: a microform of hemifacial microsomia. *Plast Reconstr Surg* **76**, 859-65 (1985).
- Boles, D. J., Bodurtha, J. & Nance, W. E. Goldenhar complex in discordant monozygotic twins: a case report and review of the literature. *Am J Med Genet* **28**, 103-9 (1987).
- Botzenhart, E. M. *et al.* *SALL1* mutation analysis in Townes-Brocks syndrome: twelve novel mutations and expansion of the phenotype. *Hum Mutat* **26**, 282 (2005).
- Brauers, A. *et al.* Alternative mRNA splicing of the novel GTPase *Rab28* generates isoforms with different C-termini. *Eur J Biochem* **237**, 833-40 (1996).
- Bray, N. J., Buckland, P. R., Owen, M. J. & O'Donovan, M. C. Cis-acting variation in the expression of a high proportion of genes in human brain. *Hum Genet* **113**, 149-53 (2003).
- Burck, U. Genetic aspects of hemifacial microsomia. *Hum Genet* **64**, 291-6 (1983).
- Cai, Y., Brophy, P. D., Levitan, I., Stifani, S. & Dressler, G. R. *Groucho* suppresses *Pax2* transactivation by inhibition of JNK-mediated phosphorylation. *Embo J* **22**, 5522-9 (2003).
- Cartegni, L., Chew, S. L. & Krainer, A. R. Listening to silence and understanding nonsense: exonic mutations that affect splicing. *Nat Rev Genet* **3**, 285-98 (2002).
- Choong, Y. F., Watts, P., Little, E. & Beck, L. Goldenhar and cri-du-chat syndromes: a contiguous gene deletion syndrome? *J Aapos* **7**, 226-7 (2003).
- Clouthier, D. E. *et al.* Cranial and cardiac neural crest defects in endothelin-A receptor-deficient mice. *Development* **125**, 813-24 (1998).
- Cohen, J. & Schanen, N. C. Branchial cleft anomaly, congenital heart disease, and biliary atresia: Goldenhar complex or Lambert syndrome? *Genet Couns* **11**, 153-6 (2000).
- Cohen, M. M., Jr., Rollnick, B. R. & Kaye, C. I. Oculoauriculovertebral spectrum: an updated critique. *Cleft Palate J* **26**, 276-86 (1989).

- Constantinides, P. G., Jones, P. A. & Gevers, W. Functional striated muscle cells from non-myoblast precursors following 5-azacytidine treatment. *Nature* **267**, 364-6 (1977).
- Cousley, R., Naora, H., Yokoyama, M., Kimura, M. & Otani, H. Validity of the Hfm transgenic mouse as a model for hemifacial microsomia. *Cleft Palate Craniofac J* **39**, 81-92 (2002).
- De Muynck, S. *et al.* A novel MSX1 mutation in hypodontia. *Am J Med Genet A* **128**, 401-3 (2004).
- Delleman, J. W. & Oorthuys, J. W. Orbital cyst in addition to congenital cerebral and focal dermal malformations: a new entity? *Clin Genet* **19**, 191-8 (1981).
- Derbent, M. *et al.* Chromosome 22q11.2 deletion and phenotypic features in 30 patients with conotruncal heart defects. *Am J Med Genet A* **116**, 129-35 (2003).
- Dixon, M. J. Treacher Collins syndrome. *Hum Mol Genet* **5 Spec No**, 1391-6 (1996).
- Edwards, S. J., Gladwin, A. J. & Dixon, M. J. The mutational spectrum in Treacher Collins syndrome reveals a predominance of mutations that create a premature-termination codon. *Am J Hum Genet* **60**, 515-24 (1997).
- Ewart-Toland, A. *et al.* Oculoauriculovertebral abnormalities in children of diabetic mothers. *Am J Med Genet* **90**, 303-9 (2000).
- Fan, C. M. & Tessier-Lavigne, M. Patterning of mammalian somites by surface ectoderm and notochord: evidence for sclerotome induction by a hedgehog homolog. *Cell* **79**, 1175-86 (1994).
- Fischer, S. *et al.* Histone acetylation dependent allelic expression imbalance of BAPX1 in patients with the oculo-auriculo-vertebral spectrum. *Hum Mol Genet* **15**, 581-7 (2006).
- Frommer, M. *et al.* A genomic sequencing protocol that yields a positive display of 5-methylcytosine residues in individual DNA strands. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**, 1827-31 (1992).
- Fuks, F. DNA methylation and histone modifications: teaming up to silence genes. *Curr Opin Genet Dev* **15**, 490-5 (2005).
- Gabrielli, O. *et al.* Description of a patient with difficult nosological classification: Goldenhar syndrome or Townes-Brocks syndrome? *Minerva Pediatr* **45**, 459-62 (1993).
- Galdzicka, M. *et al.* A new gene, EVC2, is mutated in Ellis-van Creveld syndrome. *Mol Genet Metab* **77**, 291-5 (2002).
- Garcia-Fernandez, J. The genesis and evolution of homeobox gene clusters. *Nat Rev Genet* **6**, 881-92 (2005).
- Gendron-Maguire, M., Mallo, M., Zhang, M. & Gridley, T. Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell* **75**, 1317-31 (1993).
- Giglio, S. *et al.* Heterozygous submicroscopic inversions involving olfactory receptor-gene clusters mediate the recurrent t(4;8)(p16;p23) translocation. *Am J Hum Genet* **71**, 276-85 (2002).
- Goldenhar, M. Associations malformatives de l'oeil et de l'oreille, en particulier le syndrome dermoide épibulbaire - appendices auriculaires - fistula auris congenita et ses relations avec la dysostose mandibulo-faciale. *J de Génét Hum* **1**, 243-282 (1952).
- Goodship, J. *et al.* A submicroscopic translocation, t(4;10), responsible for recurrent Wolf-Hirschhorn syndrome identified by allele loss and fluorescent in situ hybridisation. *J Med Genet* **29**, 451-4 (1992).
- Gorlin, R. J. *Syndromes of the Head and Neck* (Oxford University Press, New York, 2001).
- Gorlin, R. J. *Syndromes of the Head and Neck* (Oxford University Press, New York, 1991).

- Gorlin, R. J., Jue, K. L., Jacobson, U. & Goldschmidt, E. Oculoauriculovertebral dysplasia. *J Pediatr* **63**, 991-999 (1963).
- Grabb, W. C. The first and second branchial arch syndrome. *Plast Reconstr Surg* **36**, 485-508 (1965).
- Graham, J. M. *et al.* Autosomal dominant transmission of a Goldenhar-like syndrome: Description of a family and report of a sporadic case with a de novo 4p16;8q24.11 translocation. *Am J Hum Genet* **55**, Suppl A107 (1994).
- Graveley, B. R. Sorting out the complexity of SR protein functions. *Rna* **6**, 1197-211 (2000).
- Greenberg, F., Herman, G. E., Stahl, S., Gruber, H. & H., L. D. Chromosome abnormalities associated with facio-auriculo-vertebral spectrum. *Am J Med Genet* **4A**, 170 (1988).
- Griscelli, C. *et al.* A syndrome associating partial albinism and immunodeficiency. *Am J Med* **65**, 691-702 (1978).
- Grix, A., Jr. Malformations in infants of diabetic mothers. *Am J Med Genet* **13**, 131-7 (1982).
- Gustavson, E. E. & Chen, H. Goldenhar syndrome, anterior encephalocele, and aqueductal stenosis following fetal primidone exposure. *Teratology* **32**, 13-7 (1985).
- Haga, H., Yamada, R., Ohnishi, Y., Nakamura, Y. & Tanaka, T. Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. *J Hum Genet* **47**, 605-10 (2002).
- Harvey, R. P. NK-2 homeobox genes and heart development. *Dev Biol* **178**, 203-16 (1996).
- Hathout, E. H., Elmendorf, E. & Bartley, J. Hemifacial microsomia and abnormal chromosome 22. *Am J Med Genet* **76**, 71-3 (1998).
- Herbrand, H., Pabst, O., Hill, R. & Arnold, H. H. Transcription factors Nkx3.1 and Nkx3.2 (Bapx1) play an overlapping role in sclerotomal development of the mouse. *Mech Dev* **117**, 217-24 (2002).
- Higashijima, S. *et al.* Dual Bar homeobox genes of Drosophila required in two photoreceptor cells, R1 and R6, and primary pigment cells for normal eye development. *Genes Dev* **6**, 50-60 (1992).
- Hudson, C. D. & Witkop, C. J. Autosomal dominant hypodontia with nail dysgenesis. Report of twenty-nine cases in six families. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **39**, 409-23 (1975).
- Ingham, P. W. & Martinez Arias, A. Boundaries and fields in early embryos. *Cell* **68**, 221-35 (1992).
- Jagla, K., Bellard, M. & Frasch, M. A cluster of Drosophila homeobox genes involved in mesoderm differentiation programs. *Bioessays* **23**, 125-33 (2001).
- Johnson, J. P., Poskanzer, L. S. & Sherman, S. Three-generation family with resemblance to Townes-Brocks syndrome and Goldenhar/oculoauriculovertebral spectrum. *Am J Med Genet* **61**, 134-9 (1996).
- Johnson, R. L., Laufer, E., Riddle, R. D. & Tabin, C. Ectopic expression of Sonic hedgehog alters dorsal-ventral patterning of somites. *Cell* **79**, 1165-73 (1994).
- Jones, B. & McGinnis, W. A new Drosophila homeobox gene, bsh, is expressed in a subset of brain cells during embryogenesis. *Development* **117**, 793-806 (1993).
- Jones, P. A. & Takai, D. The role of DNA methylation in mammalian epigenetics. *Science* **293**, 1068-70 (2001).
- Jongbloet, P. H. Goldenhar syndrome and overlapping dysplasias, in vitro fertilisation and ovopathy. *J Med Genet* **24**, 616-20 (1987).

- Josifova, D. J., Patton, M. A. & Marks, K. Oculoauriculovertebral spectrum phenotype caused by an unbalanced t(5;8)(p15.31;p23.1) rearrangement. *Clin Dysmorphol* **13**, 151-3 (2004).
- Kelberman, D. *et al.* Hemifacial microsomia: progress in understanding the genetic basis of a complex malformation syndrome. *Hum Genet* **109**, 638-45 (2001).
- Kim, D. W. & Lassar, A. B. Smad-dependent recruitment of a histone deacetylase/Sin3A complex modulates the bone morphogenetic protein-dependent transcriptional repressor activity of Nkx3.2. *Mol Cell Biol* **23**, 8704-17 (2003).
- Kim, Y. & Nirenberg, M. Drosophila NK-homeobox genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 7716-20 (1989).
- Kleinjan, D. A. & van Heyningen, V. Long-range control of gene expression: emerging mechanisms and disruption in disease. *Am J Hum Genet* **76**, 8-32 (2005).
- Kmita, M. & Duboule, D. Organizing axes in time and space; 25 years of colinear tinkering. *Science* **301**, 331-3 (2003).
- Knudson, A. G., Jr., Hethcote, H. W. & Brown, B. W. Mutation and childhood cancer: a probabilistic model for the incidence of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **72**, 5116-20 (1975).
- Kobrynski, L. *et al.* Trisomy 22 and facioauriculovertebral (Goldenhar) sequence. *Am J Med Genet* **46**, 68-71 (1993).
- Kohlhase, J. *et al.* Molecular analysis of SALL1 mutations in Townes-Brocks syndrome. *Am J Hum Genet* **64**, 435-45 (1999).
- Kondo, Y., Shen, L. & Issa, J. P. Critical role of histone methylation in tumor suppressor gene silencing in colorectal cancer. *Mol Cell Biol* **23**, 206-15 (2003).
- Krause, U. The syndrome of Goldenhar affecting two siblings. *Acta Ophthalmol (Copenh)* **48**, 494-9 (1970).
- Kurdistani, S. K. & Grunstein, M. Histone acetylation and deacetylation in yeast. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**, 276-84 (2003).
- Kurihara, Y. *et al.* Elevated blood pressure and craniofacial abnormalities in mice deficient in endothelin-1. *Nature* **368**, 703-10 (1994).
- Kwon, J. M. *et al.* Assignment of a second Charcot-Marie-Tooth type II locus to chromosome 3q. *Am J Hum Genet* **57**, 853-8 (1995).
- Lambert, J. C. *et al.* Familial occurrence of a syndrome with branchial dysplasia, mental deficiency, club feet, and inguinal herniae. *J Med Genet* **19**, 214-5 (1982).
- Lammer, E. J. *et al.* Retinoic acid embryopathy. *N Engl J Med* **313**, 837-41 (1985).
- Langner, K. D., Vardimon, L., Renz, D. & Doerfler, W. DNA methylation of three 5' C-C-G-G 3' sites in the promoter and 5' region inactivate the E2a gene of adenovirus type 2. *Proc Natl Acad Sci U S A* **81**, 2950-4 (1984).
- Lefebvre, V., Huang, W., Harley, V. R., Goodfellow, P. N. & de Crombrughe, B. SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* **17**, 2336-46 (1997).
- Lefebvre, V., Li, P. & de Crombrughe, B. A new long form of Sox5 (L-Sox5), Sox6 and Sox9 are coexpressed in chondrogenesis and cooperatively activate the type II collagen gene. *Embo J* **17**, 5718-33 (1998).

- Lengner, C. J. *et al.* Nkx3.2-mediated repression of Runx2 promotes chondrogenic differentiation. *J Biol Chem* **280**, 15872-9 (2005).
- Lettice, L. A. *et al.* Disruption of a long-range cis-acting regulator for Shh causes preaxial polydactyly. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**, 7548-53 (2002).
- Lettice, L. A. *et al.* The mouse bagpipe gene controls development of axial skeleton, skull, and spleen. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**, 9695-700 (1999).
- Lettice, L., Hecksher-Sorensen, J. & Hill, R. The role of Bapx1 (Nkx3.2) in the development and evolution of the axial skeleton. *J Anat* **199**, 181-7 (2001).
- Llano-Rivas, I., Gonzalez-del Angel, A., del Castillo, V., Reyes, R. & Carnevale, A. Microtia: a clinical and genetic study at the National Institute of Pediatrics in Mexico City. *Arch Med Res* **30**, 120-4 (1999).
- Lo, H. S. *et al.* Allelic variation in gene expression is common in the human genome. *Genome Res* **13**, 1855-62 (2003).
- Lohmann, D. R. RB1 gene mutations in retinoblastoma. *Hum Mutat* **14**, 283-8 (1999).
- Lüdecke, H. J. *et al.* Molecular dissection of a contiguous gene syndrome: localization of the genes involved in the Langer-Giedion syndrome. *Hum Mol Genet* **4**, 31-6 (1995).
- Luo, J. *et al.* Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell* **107**, 137-48 (2001).
- Maniatis, T., Fritsch, E. F. & Sambrook, J. F. E. F. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. (ed. Edition, n.) (Cold Spring Harbor, New York, 1989).
- Mansour, A. M., Wang, F., Henkind, P., Goldberg, R. & Shprintzen, R. Ocular findings in the facioauriculovertebral sequence (Goldenhar-Gorlin syndrome). *Am J Ophthalmol* **100**, 555-9 (1985).
- Maquat, L. E. Nonsense-mediated mRNA decay: splicing, translation and mRNP dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 89-99 (2004).
- McCandless, S. E. & Robin, N. H. Severe oculocerebrocutaneous (Delleman) syndrome: overlap with Goldenhar anomaly. *Am J Med Genet* **78**, 282-5 (1998).
- McGinnis, W. & Krumlauf, R. Homeobox genes and axial patterning. *Cell* **68**, 283-302 (1992).
- Menasche, G. *et al.* Mutations in RAB27A cause Griscelli syndrome associated with haemophagocytic syndrome. *Nat Genet* **25**, 173-6 (2000).
- Miehlke, A. & Partsch, C. J. Ohrmissbildung, Facialis- und Abducenslähmung als Syndrom der Thalidomidschädigung. *Arch Ohrenheilkd* **181**, 154-174 (1963).
- Miller, C. T., Maves, L. & Kimmel, C. B. *moz* regulates Hox expression and pharyngeal segmental identity in zebrafish. *Development* **131**, 2443-61 (2004).
- Miller, C. T., Yelon, D., Stainier, D. Y. & Kimmel, C. B. Two endothelin 1 effectors, *hand2* and *bapx1*, pattern ventral pharyngeal cartilage and the jaw joint. *Development* **130**, 1353-65 (2003).
- Moeschler, J. & Clarren, S. K. Familial occurrence of hemifacial microsomia with radial limb defects. *Am J Med Genet* **12**, 371-5 (1982).
- Morrison, A. J., Sardet, C. & Herrera, R. E. Retinoblastoma protein transcriptional repression through histone deacetylation of a single nucleosome. *Mol Cell Biol* **22**, 856-65 (2002).
- Morrison, P. J., Mulholland, H. C., Craig, B. G. & Nevin, N. C. Cardiovascular abnormalities in the oculo-auriculo-vertebral spectrum (Goldenhar syndrome). *Am J Med Genet* **44**, 425-8 (1992).

- Mounoud, R. L., Klein, D. & Weber, F. [A case of Goldenhar syndrome: acute vitamin A intoxication in the mother during pregnancy]. *J Genet Hum* **23**, 135-54 (1975).
- Muller, H. J. Types of visible variations induced by X-rays in *Drosophila*. *J Genet* **22**, 299-334 (1930).
- Mullis, K. *et al.* Specific enzymatic amplification of DNA in vitro: the polymerase chain reaction. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **51 Pt 1**, 263-73 (1986).
- Murtaugh, L. C., Chyung, J. H. & Lassar, A. B. Sonic hedgehog promotes somitic chondrogenesis by altering the cellular response to BMP signaling. *Genes Dev* **13**, 225-37 (1999).
- Murtaugh, L. C., Zeng, L., Chyung, J. H. & Lassar, A. B. The chick transcriptional repressor Nkx3.2 acts downstream of Shh to promote BMP-dependent axial chondrogenesis. *Dev Cell* **1**, 411-22 (2001).
- Naora, H. *et al.* Transgenic mouse model of hemifacial microsomia: cloning and characterization of insertional mutation region on chromosome 10. *Genomics* **23**, 515-9 (1994).
- Neu, K. W., Friedmann, J. M. & Howard-Peebles, P. M. Hemifacial Microsomia in Cri du Chat (5p-) Syndrome. *J Craniofac Genet Dev Biol* **2**, 295-298 (1982).
- Newman, C. S. & Krieg, P. A. The *Xenopus* bagpipe-related homeobox gene *zampogna* is expressed in the pharyngeal endoderm and the visceral musculature of the midgut. *Dev Genes Evol* **209**, 132-4 (1999).
- Newman, C. S. & Krieg, P. A. *Xenopus* bagpipe-related gene, *koza*, may play a role in regulation of cell proliferation. *Dev Dyn* **225**, 571-80 (2002).
- Newman, C. S., Grow, M. W., Cleaver, O., Chia, F. & Krieg, P. *Xbap*, a vertebrate gene related to bagpipe, is expressed in developing craniofacial structures and in anterior gut muscle. *Dev Biol* **181**, 223-33 (1997).
- Ng, H. H. & Bird, A. DNA methylation and chromatin modification. *Curr Opin Genet Dev* **9**, 158-63 (1999).
- Ng, L. J. *et al.* SOX9 binds DNA, activates transcription, and coexpresses with type II collagen during chondrogenesis in the mouse. *Dev Biol* **183**, 108-21 (1997).
- Nieminen, P. *et al.* MSX1 gene is deleted in Wolf-Hirschhorn syndrome patients with oligodontia. *J Dent Res* **82**, 1013-7 (2003).
- Opitz, J. M. The developmental field concept in clinical genetics. *J Pediatr* **101**, 805-9 (1982).
- Pastinen, T. *et al.* A survey of genetic and epigenetic variation affecting human gene expression. *Physiol Genomics* **16**, 184-93 (2004).
- Pergolizzi, R. G., Erster, S. H., Goonewardena, P. & Brown, W. T. Detection of full fragile X mutation. *Lancet* **339**, 271-2 (1992).
- Peterson, C. L. & Laniel, M. A. Histones and histone modifications. *Curr Biol* **14**, R546-51 (2004).
- Pollard, S. L. & Holland, P. W. Evidence for 14 homeobox gene clusters in human genome ancestry. *Curr Biol* **10**, 1059-62 (2000).
- Polymeropoulos, M. H. *et al.* The gene for the Ellis-van Creveld syndrome is located on chromosome 4p16. *Genomics* **35**, 1-5 (1996).
- Pop, R. *et al.* Screening of the 1 Mb SOX9 5' control region by array CGH identifies a large deletion in a case of campomelic dysplasia with XY sex reversal. *J Med Genet* **41**, e47 (2004).

- Poswillo, D. The pathogenesis of the first and second branchial arch syndrome. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* **35**, 302-28 (1973).
- Pridjian, G., Gill, W. L. & Shapira, E. Goldenhar sequence and mosaic trisomy 22. *Am J Med Genet* **59**, 411-3 (1995).
- Regenbogen, L., Godel, V., Goya, V. & Goodman, R. M. Further evidence for an autosomal dominant form of oculoauriculovertebral dysplasia. *Clin Genet* **21**, 161-7 (1982).
- Rivera-Perez, J. A., Mallo, M., Gendron-Maguire, M., Gridley, T. & Behringer, R. R. Goosecoid is not an essential component of the mouse gastrula organizer but is required for craniofacial and rib development. *Development* **121**, 3005-12 (1995).
- Rodrigo, I., Bovolenta, P., Mankoo, B. S. & Imai, K. Meox homeodomain proteins are required for Bapx1 expression in the sclerotome and activate its transcription by direct binding to its promoter. *Mol Cell Biol* **24**, 2757-66 (2004).
- Rodrigo, I., Hill, R. E., Balling, R., Munsterberg, A. & Imai, K. Pax1 and Pax9 activate Bapx1 to induce chondrogenic differentiation in the sclerotome. *Development* **130**, 473-82 (2003).
- Rodriguez Esteban, C. *et al.* The novel Cer-like protein Caronte mediates the establishment of embryonic left-right asymmetry. *Nature* **401**, 243-51 (1999).
- Rollnick, B. R. & Kaye, C. I. Hemifacial microsomia and variants: pedigree data. *Am J Med Genet* **15**, 233-53 (1983).
- Rollnick, B. R., Kaye, C. I., Nagatoshi, K., Hauck, W. & Martin, A. O. Oculoauriculovertebral dysplasia and variants: phenotypic characteristics of 294 patients. *Am J Med Genet* **26**, 361-75 (1987).
- Rosenal, T. H. Aplasia-hypoplasia of the otic labyrinth after thalidomide. *Acta Radiol* **3**, 225-236 (1965).
- Ruest, L. B. *et al.* dHAND-Cre transgenic mice reveal specific potential functions of dHAND during craniofacial development. *Dev Biol* **257**, 263-77 (2003).
- Ruiz-Perez, V. L. *et al.* Mutations in a new gene in Ellis-van Creveld syndrome and Weyers acrodermal dysostosis. *Nat Genet* **24**, 283-6 (2000).
- Ryan, C. A., Finer, N. N. & Ives, E. Discordance of signs in monozygotic twins concordant for the Goldenhar anomaly. *Am J Med Genet* **29**, 755-61 (1988).
- Satokata, I. & Maas, R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet* **6**, 348-56 (1994).
- Schneider, A. *et al.* The homeobox gene NKX3.2 is a target of left-right signalling and is expressed on opposite sides in chick and mouse embryos. *Curr Biol* **9**, 911-4 (1999).
- Schweckendiek, W., Hillig, U., Kruse, E., Rodeck, G. & Wendt, G. G. HMC syndrome in identical twins. *Hum Genet* **33**, 315-8 (1976).
- Sekiya, I. *et al.* SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* **275**, 10738-44 (2000).
- Sensi, A. *et al.* Branchio-oto (BO) syndrome and oculo-auriculo-vertebral phenotype: overlapping clinical findings in a child from a BO family. *Clin Genet* **49**, 300-2 (1996).
- Setzer, E. S., Ruiz-Castaneda, N., Severn, C., Ryden, S. & Frias, J. L. Etiologic heterogeneity in the oculoauriculovertebral syndrome. *J Pediatr* **98**, 88-90 (1981).
- Smahel, Z. Craniofacial changes in hemifacial microsomia. *J Craniofac Genet Dev Biol* **6**, 151-70 (1986).

- Splendore, A. *et al.* High mutation detection rate in TCOF1 among Treacher Collins syndrome patients reveals clustering of mutations and 16 novel pathogenic changes. *Hum Mutat* **16**, 315-22 (2000).
- Srivastava, D. *et al.* Regulation of cardiac mesodermal and neural crest development by the bHLH transcription factor, dHAND. *Nat Genet* **16**, 154-60 (1997).
- Stanojevic, M., Stipoljev, F., Koprcina, B. & Kurjak, A. Oculo-auriculo-vertebral (Goldenhar) spectrum associated with pericentric inversion 9: coincidental findings or etiologic factor? *J Craniofac Genet Dev Biol* **20**, 150-4 (2000).
- Stoll, C., Viville, B., Treisser, A. & Gasser, B. A family with dominant oculoauriculovertebral spectrum. *Am J Med Genet* **78**, 345-9 (1998).
- Summitt, R. Familial Goldenhar syndrome. *Birth Defects* **5**, 106-109 (1969).
- Sutter, D. & Doerfler, W. Methylation of integrated adenovirus type 12 DNA sequences in transformed cells is inversely correlated with viral gene expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**, 253-6 (1980).
- Svensson, M. E. & Haas, A. Evolutionary innovation in the vertebrate jaw: A derived morphology in anuran tadpoles and its possible developmental origin. *Bioessays* **27**, 526-32 (2005).
- Tasse, C. *et al.* Oculo-auriculo-vertebral spectrum (OAVS): clinical evaluation and severity scoring of 53 patients and proposal for a new classification. *Eur J Med Genet* **48**, 397-411 (2005).
- Teber, O. A. *et al.* Genotyping in 46 patients with tentative diagnosis of Treacher Collins syndrome revealed unexpected phenotypic variation. *Eur J Hum Genet* **12**, 879-90 (2004).
- Tellier, A. L. *et al.* CHARGE syndrome: report of 47 cases and review. *Am J Med Genet* **76**, 402-9 (1998).
- ter Haar, B. Oculo-auriculo-vertebral dysplasia (Goldenhar's syndrome). Concordant in identical twins. *Acta Med Genet (Roma)* **21**, 116-124 (1972).
- Thiel, C. T., Rosanowski, F., Kohlhase, J., Reis, A. & Rauch, A. Exclusion of TCOF1 mutations in a case of bilateral Goldenhar syndrome and one familial case of microtia with meatal atresia. *Clin Dysmorphol* **14**, 67-71 (2005).
- Townes, P. L. & Brocks, E. R. Hereditary syndrome of imperforate anus with hand, foot, and ear anomalies. *J Pediatr* **81**, 321-6 (1972).
- Treacher Collins Collaborative Group Positional cloning of a gene involved in the pathogenesis of Treacher Collins syndrome. The Treacher Collins Syndrome Collaborative Group. *Nat Genet* **12**, 130-6 (1996).
- Tribioli, C. & Lufkin, T. Molecular cloning, chromosomal mapping and developmental expression of BAPX1, a novel human homeobox-containing gene homologous to *Drosophila* bagpipe. *Gene* **203**, 225-33 (1997).
- Tribioli, C. & Lufkin, T. The murine Bapx1 homeobox gene plays a critical role in embryonic development of the axial skeleton and spleen. *Development* **126**, 5699-711 (1999).
- Tribioli, C., Frasch, M. & Lufkin, T. Bapx1: an evolutionary conserved homologue of the *Drosophila* bagpipe homeobox gene is expressed in splanchnic mesoderm and the embryonic skeleton. *Mech Dev* **65**, 145-62 (1997).
- Tucker, A. S., Watson, R. P., Lettice, L. A., Yamada, G. & Hill, R. E. Bapx1 regulates patterning in the middle ear: altered regulatory role in the transition from the proximal jaw during vertebrate evolution. *Development* **131**, 1235-45 (2004).

- Tufarelli, C. *et al.* Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat Genet* **34**, 157-65 (2003).
- Van Meter, T. D. & Weaver, D. D. Oculo-auriculo-vertebral spectrum and the CHARGE association: clinical evidence for a common pathogenetic mechanism. *Clin Dysmorphol* **5**, 187-96 (1996).
- Vandesompele, J. *et al.* Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* **3**, research0034.1-0034.11 (2002).
- Vardimon, L., Neumann, R., Kuhlmann, I., Sutter, D. & Doerfler, W. DNA methylation and viral gene expression in adenovirus-transformed and -infected cells. *Nucleic Acids Res* **8**, 2461-73 (1980).
- Verhoeven, K. *et al.* Mutations in the small GTP-ase late endosomal protein RAB7 cause Charcot-Marie-Tooth type 2B neuropathy. *Am J Hum Genet* **72**, 722-7 (2003).
- Wieczorek, D. *et al.* Unexpected high frequency of de novo unbalanced translocations in patients with Wolf-Hirschhorn syndrome (WHS). *J Med Genet* **37**, 798-804 (2000).
- Winter, R. M. What's in a face? *Nat Genet* **12**, 124-9 (1996).
- Wise, C. A. *et al.* TCOF1 gene encodes a putative nucleolar phosphoprotein that exhibits mutations in Treacher Collins Syndrome throughout its coding region. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 3110-5 (1997).
- Yamada, G. *et al.* Targeted mutation of the murine gooseoid gene results in craniofacial defects and neonatal death. *Development* **121**, 2917-22 (1995).
- Yan, H. *et al.* Small changes in expression affect predisposition to tumorigenesis. *Nat Genet* **30**, 25-6 (2002).
- Yoshiura, K. I. & Murray, J. C. Sequence and chromosomal assignment of human BAPX1, a bagpipe-related gene, to 4p16.1: a candidate gene for skeletal dysplasia. *Genomics* **45**, 425-8 (1997).
- Zeng, L., Kempf, H., Murtaugh, L. C., Sato, M. E. & Lassar, A. B. Shh establishes an Nkx3.2/Sox9 autoregulatory loop that is maintained by BMP signals to induce somitic chondrogenesis. *Genes Dev* **16**, 1990-2005 (2002).

PCR Ansätze

TCOF1

Exon 1*		Exon 2-25, 6A+16A	
„template“ (50ng/µl)	1,0µl	„template“ (50ng/µl)	4,0µl
„forward“ Primer (5µM)	2,0µl	„forward“ Primer (5µM)	2,0µl
„reverse“ Primer (5µM)	2,0µl	„reverse“ Primer (5µM)	2,0µl
5x PCR Puffer	5,0µl	10x PCR Puffer	2,5µl
dNTPs	0,5µl	10x dNTPs	2,5µl
GC-Melt	2,5µl		
Polymerase Mix	0,5µl	AmpliTaq-Polymerase	0,5µl
H ₂ O	ad 25µl	H ₂ O	ad 25µl

EYA1

Exon 0+9		Exon 1-8, 10-16	
„template“ (50ng/µl)	6,0µl	„template“ (50ng/µl)	4,0µl
„forward“ Primer (5µM)	2,0µl	„forward“ Primer (5µM)	2,0µl
„reverse“ Primer (5µM)	2,0µl	„reverse“ Primer (5µM)	2,0µl
10x PCR Puffer	2,5µl	10x PCR Puffer	2,5µl
10x dNTPs	2,5µl	10x dNTPs	2,5µl
AmpliTaq-Polymerase	0,5µl	AmpliTaq-Polymerase	0,5µl
H ₂ O	ad 25µl	H ₂ O	ad 25µl

RAB28

Exon 1-8	
„template“ (50ng/µl)	2,5µl
„forward“ Primer (20µM)	0,5µl
„reverse“ Primer (20µM)	0,5µl
10x PCR Puffer	5µl
10x dNTPs	2,5µl
Polymerase Mix	0,5µl
H ₂ O	ad 50µl

BAPX1

Exon 1+2		PAX6/MEOX+3'-UTR		5'-UTR	
„template“ (50ng/µl)	8µl	„template“ (50ng/µl)	6µl	„template“ (50ng/µl)	6µl
„forward“ Primer (5µM)	2µl	„forward“ Primer (5µM)	2µl	„forward“ Primer (5µM)	2µl
„reverse“ Primer (5µM)	2µl	„reverse“ Primer (5µM)	2µl	„reverse“ Primer (5µM)	2µl
10x PCR Puffer	2,5µl	10x PCR Puffer	2,5µl	10x PCR Puffer	2,5µl
10x 60% 7-Deaza-dGTP-dNTPs	2,5µl	10x dNTPs	2,5µl	10x 60% 7-Deaza-dGTP-dNTPs	2,5µl
Betain (5M)	0,5µl			Betain (5M)	0,5µl
AmpliTaq-Polymerase	1µl	AmpliTaq-Polymerase	0,5µl	AmpliTaq-Polymerase	1µl
H ₂ O	ad25µl	H ₂ O	ad25µl	H ₂ O	ad25µl

ACTB

RT-PCR	
„template“	6µl
„forward“ Primer (5µM)	2µl
„reverse“ Primer (5µM)	2µl
10x PCR Puffer	2,5µl
10x dNTPs	2,5µl
AmpliTaq-Polymerase	0,5µl
H ₂ O	ad 25µl

BAPX1

bis PCR Bereich 0-2		bis PCR Bereich 2-5	
bis DNA	2,5µl	bis DNA	5µl
„forward“ Primer (20µM)	1,25µl	„forward“ Primer (20µM)	1,25µl
„reverse“ Primer (20µM)	1,25µl	„reverse“ Primer (20µM)	1,25µl
10x PCR Puffer	2,5µl	10x PCR Puffer	2,5µl
10x dNTPs	2,5µl	10x dNTPs	2,5µl
AmpliTaqGold-Polymerase	1µl	AmpliTaqGold-Polymerase	1µl
H ₂ O	ad 25µl	H ₂ O	ad 25µl

*mit dem „Advantage™-GC 2 PCR Kit (BD Biosciences) durchgeführt

TCOF1

<i>TCOF1</i> Exon 1	95°C/2'; 30 Zyklen 95°C/15'', 69°C/30'', 68°C/30''; 68°C/7'
<i>TCOF1</i> Exon 2+3, 5-25	95°C/2'; 15 Zyklen 95°C/20'', 63°C/1', 72°C/2'; 20 Zyklen 95°C/20'', 56°C/1', 72°C/2'; 72°C/5'
<i>TCOF1</i> Exon 4	95°C/2'; 15 Zyklen 95°C/20'', 65°C/1', 72°C/2'; 20 Zyklen 95°C/20'', 58°C/1', 72°C/2'; 72°C/5'
<i>TCOF1</i> Exon 6A+16A	96°C/5'; 35 Zyklen 96°C/30'', 61°C/30'', 72°C/30''; 72°C/7'

EYA1

<i>EYA1</i> Exon 0+9	96°C/2'; 15 Zyklen 94°C/30'', 61°C/30'', 72°C/1'; 20 Zyklen 94°C/30'', 55°C/30'', 72°C/1'; 72°C/7'
<i>EYA1</i> Exon 1, 2, 10-16	96°C/2'; 35 Zyklen 94°C/30'', 55°C/30'', 72°C/1'; 72°C/7'
<i>EYA1</i> Exon 3	96°C/2'; 15 Zyklen 94°C/30'', 62°C/30'', 72°C/1'; 20 Zyklen 94°C/30'', 56°C/30'', 72°C/1'; 72°C/7'
<i>EYA1</i> Exon 4-8	96°C/2'; 35 Zyklen 94°C/30'', 56°C/30'', 72°C/1'; 72°C/7'

RAB28

<i>RAB28</i> Exon 1	95°C/2'; 10 Zyklen 95°C/15'', 60°C/15'', 72°C/30''; 25 Zyklen 95°C/15'', 56°C/15'', 72°C/30''; 72°C/7'
<i>RAB28</i> Exon 2-5, 8	95°C/2'; 35 Zyklen 95°C/15'', 55°C/15'', 72°C/30''; 72°C/7'
<i>RAB28</i> Exon 6	95°C/2'; 35 Zyklen 95°C/15'', 53°C/15'', 72°C/30''; 72°C/7'

BAPX1

PAX6/MEOX	(1) 96°C/5'; 35 Zyklen 96°C/20'', 60°C/30'', 72°C/1'; 72°C/5' (2) 96°C/5'; 35 Zyklen 96°C/30'', 57°C/30'', 72°C/45''; 72°C/5'
<i>BAPX1</i> 5'-UTR	96°C/5'; 35 Zyklen 96°C/30'', 62°C/30'', 72°C/2'; 72°C/7'
<i>BAPX1</i> Exon 1.1	96°C/3'; 10 Zyklen 96°C/30'', 65°C/30'', 72°C/1'; 10 Zyklen 96°C/30'', 61°C/30'', 72°C/1'; 20 Zyklen 96°C/30'', 57°C/30'', 72°C/1'; 72°C/5'
<i>BAPX1</i> Exon 1.2	96°C/3'; 5 Zyklen 96°C/30'', 62°C/30'' (-1°C/Zyklus), 72°C/1'; 30 Zyklen 96°C/30'', 57°C/30'', 72°C/1'
<i>BAPX1</i> Exon 2	96°C/3'; 40 Zyklen 96°C/30'', 68°C/30'', 72°C/2'; 72°C/10'
<i>BAPX1</i> 3'-UTR	96°C/5'; 35 Zyklen 96°C/30'', 64°C/30'', 72°C/30''; 72°C/5'

ACTB

<i>ACTB</i> RT-PCR	96°C/2'; 30 Zyklen 94°C/30'', 56°C/30'', 72°C/1', 72°C/7'
--------------------	---

BAPX1

bis PCR Bereich 0-2	96°C/8'; 40 Zyklen 96°C/30'', 62°C/15'', 72°C/30'', 72°C/5'
bis PCR Bereich 2-5	96°C/8'; 45 Zyklen 96°C/30'', 54°C/15'', 72°C/30'', 72°C/5'

	Forward primer (5'→3')		Reverse primer (5'→3')	
<u>TCOF1</u>				
TCOF1 Exon 1	TCSi1se	AAGTGGGGCGCGGAGGT	TCSi1as	CACACGGCCCACGAACGCTT
TCOF1 Exon 2	TCSi2se	CCAAAAAGACCTCTTCTGA	TCSi2as	TATCCCAGCTTATTCCAAGC
TCOF1 Exon 3	TCSi3se	AGTTGTTCTGTCACCCAGTTG	TCSi3as	CTCCCCAGGGTCTTTTAGGT
TCOF1 Exon 4	TCSi4se2	GCATCACAGAGCTCATTCCCT	TCSi4as2	GTGGGGCAATTACTCACAAAC
TCOF1 Exon 5	TCSi5se	AGTTCACCATGCCATACCAG	TCSi5as	TTCCAGAAATGTCCAGAAC
TCOF1 Exon 6	TCSi6se2	CTTTGATGAGCAGCTGGTTT	TCSi6as2	ACCCTACCACAGTTGCTGAA
TCOF1 Exon 6A	TCSi6Ase	CAGAACCTTAGGGGAAACAG	TCSi6Aas	TAGTCCTCCCTCTCCCCAAC
TCOF1 Exon 7-13	TCSi7se	AAGGCCCTGGACTTTATCC	TCSi13as	CAGTCAAGCCCCATCCTCA
	TCSi8se	GTGTCCCTGTGCTCCTCAC		
	TCSi10se	ACTCCCTCCCTAATCTTGTC		
	TCSi11se	CTCTCCCGATCCTGTGTATC	TCSi10as	GAAAGAGCCTTACAGGAAGG
TCOF1 Exon 14-16	TCSi14se	ATCTCACCTTCTCCCTCCTT	TCSi16as	CCGTTCTGAGGAGTGAGTGT
	TCSi15se2	GGAGTGGGACCTGAAAGAAT		
TCOF1 Exon 16A	TCSi16Ase	CCGACCACGTGCTTATCC	TCSi16Aas	ATGGCGAGATTTTCCCTATG
TCOF1 Exon 17-18	TCSi17se	ACCCTTTGCCTTGAAAAACA	TCSi18as	CATCAGCACATGTGGGTAAGT
			TCSi17as	AGCTTCTAGCCACTGGTCTG
	TCSi18se	CCAGAGCAGCCATTTGAG		
TCOF1 Exon 19-22	TCSi19se	GAGTAGTGGGGCCTAAGCTG	TCSi22as	ATCTTCAGGTCCAATGCAAG
			TCSi20as	TCTGAGATATGGAGCTGAGG
	TCSi21se	GGACCTGCAGAGAGACCAG		
TCOF1 Exon 23	TCSi22se	ACCCACTCTGCACTGATAGG	TCSi23as	TACATGGGAGGAATGAGACC
TCOF1 Exon 24	TCSi23se	AGATCTGTCCCCAACTCTC	TCSi24as	CAGGTCTGGGTGTGTAGGAG
TCOF1 Exon 25	TCSi24se	GTTGTGATGGCTTCTGGTG	TCSi25as	CCTGAATGCTCAGGAATGAT
	TCSi25se	CAGGGCCTCAGCTGTATTTA		
<u>EYA1</u>				
EYA1 Exon 0	EYA1_E0_for	GGGACTTTTGTGCAAGTGTG	EYA1_E0_rev	GACAACCTGAAATCATAACCAC
EYA1 Exon 1	EYA1_E1_for	CACTGAAGCAGAGTAACAACA	EYA1_E1_rev	CCAACAGAGGCTGTTACTATT
EYA1 Exon 2	EYA1_E2_for	TTATGATATATGTTGAGTTAGGG	EYA1_E2_rev	CATACACAGGGACATTACATG
EYA1 Exon 3	EYA1_E3_for	CGCAGGTCACAAAGACCAAA	EYA1_E3_rev	AGATGGAACATGTGGGCACA
EYA1 Exon 4	EYA1_E4_for	GTGATGTGGTTGTTAATCGGT	EYA1_E4_rev	ACACAGAAGGTGACAACACGT
EYA1 Exon 5	EYA1_E5_for	GAGATAAGATTGGGGAAGCAT	EYA1_E5_rev	CCAATCCAGTTGCCATCATC
EYA1 Exon 6	EYA1_E6_for	GCTATTTTCTGTACCCACATT	EYA1_E6_rev	GAAAGCTCTCACTTATAAACAG
EYA1 Exon 7	EYA1_E7_for	GGCTCAGAAACCCAAACATAC	EYA1_E7_rev	GTGCAACCACTGCATGAATAT
EYA1 Exon 8	EYA1_E8_for	AGGCTAATCTTGGCACCATGG	EYA1_E8_rev	CACTGCTGTTTACGTAGCAGG
EYA1 Exon 9	EYA1_E9_for	TGAATAACAGCTTTTCTCAGCC	EYA1_E9_rev	GACTATATAGTTCTTCTCCATTT
EYA1 Exon 10	EYA1_E10_for	CTTTCAGCCCTCTCCCAATGC	EYA1_E10_rev	ACCAACAAACTCCTGTCTCAC
EYA1 Exon 11-12	EYA1_E11_for	ACCTACTGATTGACATAGTTGA	EYA1_E12_rev	ATGAAACTGCCCAAATAGAAGC
	EYA1_E12_for	GTGACCATCTCCCTTTTATAGT		
EYA1 Exon 13-14	EYA1_E13_for	AAATCTGGAGGCTGGTATTC	EYA1_E14_rev	TGCTTTATGTTTCTCTTACGTC
	EYA1_E14_for	GCAATGCTCGTGCTTGTTTCAT		
EYA1 Exon 15	EYA1_E15_for	TGCTGTGGCACATACAACCC	EYA1_E15_rev	AGAGTACTGCACATATTCATCA
EYA1 Exon 16	EYA1_E16_for	AGCTGGCATTTCATGATACT	EYA1_E16_rev	GTGGCAGACACATAACGCTG

	Forward primer (5'→3')		Reverse primer (5'→3')	
<u>RAB28</u>				
RAB28 Exon 1	RAB1le	GAGCCTTCATCCTTCCCTTC	RAB1ri	AGGGCTCGGGGTAACGAG
RAB28 Exon 2	RAB2le	TGCTTAAATTTGCTTGTGGGA	RAB2ri	GCAGCCCCAAAATTTTACAC
RAB28 Exon 3	RAB3le	TAAAGGCCAAATTGGGCTCAG	RAB3ri	TGCATTTGGGAGTAGATTTGC
RAB28 Exon 4	RAB4le	TGAAGCATTACGCAAGTATTCATT	RAB4ri	AAACATTCTGTCCACAACAGC
RAB28 Exon 5	RAB5le	GCTGATGTCGAAGCTGGAAT	RAB5ri	TTCAATAGGAATTAATTTGCTCCA
RAB28 Exon 6	RAB6le	TTGAAGATAACTTAAGCATGCCTCT	RAB6ri	TGGGTGAAAATTAATGCCTTG
RAB28 Exon 7	RAB7le	TCATTGAACATACTTTCCATTTTG	RAB7ri	CTGGCAGAGGACCAATTTTT
RAB28 Exon 8	RAB8le	CCTGCTTCATTTATGGTGTCC	RAB8ri	CCCACCCAGAGGTGAAGG
<u>BAPX1</u>				
PAX6/MEOX	hBAPX1for	CAGAAATTCTCCCAAAGATGC	hBAPX1rev	TCTCCCTACAGTTTCGCCG
	hBAPX1_1for		hBAPX1_1rev	
BAPX1 5'-UTR	BAPX1_0034	TGGAACGCAAGGGAAGGAAAGAG	BAPX_EX1_2	AGTCCGAGTCCCAGCCTTC
BAPX1 Exon 1.1	BAPX_EX1_1	CTCGCACACCCAGCTCACT	BAPX_EX1_2	AGTCCGAGTCCCAGCCTTC
BAPX1 Exon 1.2	BAPX_EX2_1	CTCCCGCTGTCTGCTGTT	BAPX_EX2_2	GCAGAACTTCGGGATTTGG
BAPX1 Exon 2	BAP_Ex2_for2	CCGCCCTCCCAGAAGAGGCCTAGAT	BAPrev	TAGAAAAAGGCGCCCCCTCAGGGCAGA
	BAPX_EX3_1	AAGTGTATTTCCGCCCCACT		
	BAPX_EX4_1	GAGCGCCGCTTTAACCAC		
BAPX1 3'-UTR	BAPX1_3'UTR_for	CTCCTGTGTGTGTCAGAGCTAGGG	BAPX1_3'UTR_rev	GGGATCACCTGTTTAAGGGTAAG
BAPX1 RT-PCR	BAPX1_RTPCR1f	AACACCTTGACGTCTTCTCCATC	BAPX1_RTPCR1r	GACAGGTAGCGCTGGTGGTTAAAG
SNaPshot c.126	SNaP_c.126_for	CCCGGGGGCACAGCGGCATC	SNaP_c.247_rev	CGGGCTCTCCGCAGTCC
SNaPshot c.247				
SNaPshot c.292	SNaP_c.292_for	CCTGCTCTCGTTCTCCTCGC	SNaP_c.351_rev	GAGGCTCAAGGATCCCCCGCAAG
SNaPshot c.351				
SNaPshot c.493	SNaP_c.493_for	CCCAAGGACCGAGGAC		
bis PCR Bereich 0-2	BAPX1_2a_se_5'	TTTGTTTAGTAGGGAAGGGGAG	BAPX1_0a_se_3'	CTCCTCTTTCTTATTAATAAATCRCC
bis PCR Bereich 2-5	BAPX1_5b_se_5'	GAGAGAAGGGGTTAAGTTAGATTTTG	BAPX1_2b_se_3'	CCTTCCCTACTAAACAAACTCTTC
<u>ACTB</u>				
ACTB RT-PCR	Actin-F(SF)	TTGCTATCCAGGCTGTGCTA	Actin-R(SF)	AGCACTGTGTTGGCGTACAG
<u>Universalprimer</u>				
	Sp6	ATTTAGGTGACACTATAG		
	T7	AATACGACTCACTATAG		

in kursiv sind die Primer für die Sequenzierung dargestellt

Die Primersequenzen für das *TCOF1*-Gen sind publiziert in Teber *et al.*, 2004

Die Primersequenzen für das *EYA1*-Gen sind publiziert in Abdelhak *et al.*, 1997b

Die Primersequenzen für das *RAB28*-Gen wurden erstellt von Hermann-Josef Lüdecke, Institut für Humangenetik, Essen

Die Primersequenzen für das *PAX6/MEOX* sind publiziert in Rodrigo *et al.*, 2004

Die Primersequenzen für *BAPX1* Exon 1.1, Exon 1.2, Exon 2 wurden erstellt von Hermann-Josef Lüdecke, Institut für Humangenetik, Essen

An dieser Stelle möchte ich danken...

... **Herrn Prof. Benno Horsthemke** für die Möglichkeit an Deinem Institut diese äußerst interessante Arbeit anfertigen zu dürfen. Danke für Dein stetes Vertrauen in das Projekt, Dein scheinbar unerschöpflichen Ideenreichtum, die wertvollen und lehrreichen wissenschaftlichen Diskussionen mit Dir und die angenehme Atmosphäre, in der man mit Dir arbeiten kann.

... **Frau PD Dr. Dagmar Wieczorek** für Deine sichere klinische Hand in diesem Projekt und Deine wissenschaftliche und persönliche Unterstützung in unzähligen Momenten.

... der OAVS-Crew, insbesondere **Herrn Dr. Hermann-Josef Lüdecke** und **Frau Gabriele Gillessen-Kaesbach** für Dein/Ihr engagierten Einsatz für das gute Gelingen des Projekts und damit auch das Gelingen dieser Arbeit.

... **Melanie Trommler**, für Deine Geduld mit mir und meinem Chaos und für die vielen tausend Sequenzen (ich weiß, TRPS ist einfacher ;o)).

... **Regina Kubica**, für Deine inzwischen dreistelligen Überstunden, die Du in Kauf genommen hast, um Unsere Fibros zu hegen und zu pflegen.

... **Dr. Stefan Böhringer**, für Deine unverzichtbaren statistischen Berechnungen, Deine Bemühungen, alles unter 0,05 zu berechnen und die lustigen Tagungen.

... **allen aktuellen und ehemaligen Mitarbeitern des Instituts** für die familiäre und angenehme Atmosphäre, in der es sich hervorragend arbeiten ließ und lässt (ein ganz besonderer Dank geht an **Frau Ansburger** und **Herrn Maßhöflich** (ihr seid einfach Gold!)).

... **Frau Dr. Claudia Walter** für einen großen Teil der *RAB28*-Mutationsanalyse.

... **Herrn Dr. Frank Lyko** (DKFZ Heidelberg) und **PD Dr. Jürgen Kohlhase** (Freiburg) für die Kooperation

... **Julia**, für einfach alles!

... meiner Familie, allen voran **meinem Bruder Kai**, **meiner Mam**, **Angelika**, **Johannes**, **Laurenz** und **Felix** für die vielen Momente der Freude, des Aufbauens, der Ablenkung...

... vielen Freunden, die ich hier vergessen habe (dich nicht **Timmi!**).

... **mir!**

Erklärung:

Hiermit erkläre ich gemäß §6 Abs. 2, Nr. 7 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 der Universität Duisburg-Essen zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich das Arbeitsgebiet, dem das Thema

„Molekulargenetische Untersuchung des Okulo-Aurikulo-Vertebralen Spektrums (OAVS)“

zuzuordnen ist, in Forschung und Lehre vertrete und den Antrag von Herrn Sven Fischer befürworte.

(Ort, Datum)

(Prof. Dr. Bernhard Horsthemke)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich gemäß §6 Abs. 2, Nr. 6 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 der Universität Duisburg-Essen zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und mich keiner anderen als der angegebenen Hilfsmittel bedient habe.

(Ort, Datum)

(Sven Fischer)

Erklärung:

Hiermit erkläre ich gemäß §6 Abs. 2, Nr. 8 der Promotionsordnung der Fachbereiche 6 bis 9 der Universität Duisburg-Essen zur Erlangung des Dr. rer. nat., dass ich keine anderen Promotionen bzw. Promotionsversuche in der Vergangenheit durchgeführt habe und dass diese Arbeit von keiner anderen Fakultät abgelehnt worden ist.

(Ort, Datum)

(Sven Fischer)

Curriculum vitae

Sven Fischer

Diplom-Biochemiker
*19.07.1975 in Essen

Rellinghauser Str. 129
45128 Essen

verheiratet seit 09/2003 mit Dr. rer.nat. Julia Fischer, geb. Teuber

Schulausbildung

1982 - 1986

Grundschule: Käthe-Kollwitz Schule in Essen

1986 - 1988

Realschule: Bertha-von-Suttner Schule in Essen

1988 - 1995

Gymnasium: Helmholtzgymnasium in Essen

Abschluss: Abitur, Abiturnote: 3,4

Zivildienst

1995 - 1996

Rettungssanitäter beim Arbeiter-Samariter-Bund e.V.

Studium

Oktober 1996 - September 1997

Grundstudium der Oecotrophologie an der

Christian-Albrechts-Universität Kiel

Oktober 1997 - Juni 2002

Studium der Biochemie an der Ruhr-Universität Bochum

Abschluss: Diplom, Diplomnote: gut

Diplomarbeit in der AG Molekulare Zellbiochemie: Enhancer-

Studien zum Geruchsrezeptor Or43a aus *Drosophila melanogaster*

Diplomarbeitsnote: sehr gut

Promotion

November 2002 - August 2006

Promotion im Fach Biologie im Institut für Humangenetik,
Universität Duisburg-Essen

Titel der Dissertation: Molekulargenetische Untersuchung des
Okulo-Aurikulo-Vertebralen Spektrums (OAVS)

Abschluss des Promotionsverfahrens mit der

Disputation am 16.08.2006

Gesamtnote: summa cum laude

Weiterbildung

Januar 2003

Seminar „IPR Consultants“ zu Patenten und Patentverwaltung,
PROvendis GmbH

Essen, August 2006