

Aus dem Humangenetischen Institut
der
Universität des Saarlandes
Leitung: Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese

Identifizierung und Charakterisierung von neuen Genen der autosomal rezessiven mentalen Retardierung

Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität des Saarlandes

Vorgelegt von
Andrea Vera Khaled
geboren am 01.12.1990 in Ansbach

2017

Betreuer:
Priv.-Doz. Dr. med. Rami Abou Jamra
Prof. Dr. rer. nat. Eckart Meese

Inhaltsverzeichnis

1	Zusammenfassung.....	3
2	Abstract	5
3	Einleitung	7
3.1	Mentale Retardierung	7
3.1.1	Nicht-genetische Ursachen der mentalen Retardierung.....	9
3.1.2	Genetische Ursachen der mentalen Retardierung	9
3.2	Strategien zur Identifizierung der Kandidatengene bei ARID	11
3.2.1	Homozygotie-Kartierung bei konsanguinen Familien	11
3.2.2	Next Generation Sequencing (NGS)	12
3.2.3	Vorarbeiten	13
3.3	Ziel der Arbeit.....	14
4	Untersuchungskollektiv, Material und Methoden	15
4.1	Untersuchungskollektiv	15
4.1.1	Familie MR134.....	16
4.1.2	Familie MR139.....	17
4.1.3	Familie MR140.....	17
4.1.4	Familie MR141.....	19
4.1.5	Familie MR142.....	21
4.1.6	Familie MR143.....	22
4.1.7	Familie MR39.....	23
4.2	Material	24
4.2.1	Verbrauchsmaterialien	24
4.2.2	Geräte	24
4.2.3	Chemikalien	25
4.2.4	Lösungen, Puffer	26
4.2.5	Reaktionssysteme	27
4.2.6	Längenstandards	27
4.2.7	Enzyme	28
4.2.8	Antikörper.....	28
4.2.9	Software, Datenbanken	28
4.3	Methoden	29
4.3.1	Patienten-DNA.....	29
4.3.2	Homozygotie-Kartierung	30
4.3.3	Next Generation Sequencing (NGS)	31

4.3.4	Filterungsschritte.....	34
4.3.5	Expressionsanalyse mittels qPCR (Real Time Quantitative PCR)	37
4.3.6	Western Blot	39
4.3.7	Primerdesign, PCR, Elektrophorese, PCR-Aufreinigung	42
4.3.8	Sanger-Sequenzierreaktion, Aufreinigung, Analyse	45
4.3.9	In silico-Analyse von gefundenen Varianten.....	46
5	Ergebnisse	48
5.1.1	Familie MR134.....	48
5.1.2	Familie MR139.....	48
5.1.3	Familie MR140.....	49
5.1.4	Familie MR141.....	50
5.1.5	Familie MR142.....	52
5.1.6	Familie MR143.....	53
5.1.7	Familie MR39.....	54
6	Diskussion.....	56
6.1	PTEN in Familie MR141.....	56
6.2	FUCA1 in Familie MR140	59
6.3	STX1A in Familie MR39.....	60
6.4	CSTF2 in Familie MR142.....	61
6.5	Weitere Varianten	62
7	Ausblick.....	63
8	Danksagung	64
9	Abbildungs-, Tabellen-, Abkürzungsverzeichnis	65
9.1	Abbildungsverzeichnis	65
9.2	Tabellenverzeichnis	65
9.3	Abkürzungsverzeichnis	66
10	Referenzen.....	68
11	Anhang.....	74
11.1	Verwendete Primer	74
11.2	PCR mit Wintaq: MasterMix und Cyler-Programm.....	76
11.3	PCR mit Invitrogen: MasterMix und Cyler-Programm	77
11.4	Sequenzierreaktion: MasterMix und Cyler-Programm	77
11.5	cDNA Herstellung: MasterMix und Cyler-Programm.....	78
11.6	quantitative PCR: MasterMix und Cyler-Programm	79
11.7	Verwendete Antikörper	80

1 Zusammenfassung

Hintergrund: Die mentale Retardierung ist weiterhin ein ungelöstes gesundheitliches und soziales Problem, welches die gesamte Gesellschaft betrifft und insbesondere für die Angehörigen der Betroffenen eine große Herausforderung darstellt. Derzeit wird angenommen, dass ein Großteil der Fälle auf Punktmutationen mit autosomal dominanter oder rezessiver Vererbung zurückzuführen ist. Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung genetischer Grundlagen für autosomal-rezessive mentale Retardierung.

Vorgehen: Im Rahmen dieser Arbeit wurden sieben Familien mit insgesamt fünfzehn betroffenen Kindern untersucht. Fünf Familien waren konsanguin und hatten mehrere betroffene Kinder (MR39, MR140, MR141, MR142, MR143). Eine Familie (MR134) war nicht konsanguin und hatte zwei betroffene Kinder und eine Familie (MR139) war nicht konsanguin und hatte ein betroffenes Kind. Bei jeweils einem betroffenen Familienmitglied wurde eine Exomsequenzierung mit der *SOLiD* Plattform oder dem *HiSeq2500* System durchgeführt. Die identifizierten Varianten wurden nach Position, Prävalenz in verschiedenen Datenbanken und Einfluss auf die Proteinfunktion priorisiert. Die Validierung und Segregation der jeweiligen Varianten erfolgte anhand der Sanger-Sequenzierung. Daraufhin wurden manche der identifizierten Varianten funktionell weiter charakterisiert.

Ergebnisse und Diskussion: Es wurde eine wahrscheinlich krankheitsverursachende, homozygote Variante in Familie MR141 (konsanguin, zwei Betroffene) in *PTEN* an Position p.Leu182Ser identifiziert und in Kooperation funktionell weiter charakterisiert. Dadurch konnte für Varianten in *PTEN* der Phänotyp auf milde MR und ausgeprägte Makrozephalie ohne weitere Auffälligkeiten und die Vererbung auf autosomal rezessive Formen erweitert werden. Zudem wurde in dieser Arbeit eine homozygote Variante an einer kanonischen Spleißstelle in *STX1A* in Familie MR039 (konsanguin, zwei Betroffene) identifiziert. Analysen mittels RT-qPCR zeigten einen Effekt dieser Variante auf die mRNA. *STX1A* kodiert für Syntaxin 1a, welches in den Vesikeltransport an Synapsen des zentralen Nervensystems involviert ist. RT-qPCR an mRNA von lymphoblastoiden Zelllinien von heterozygoten Familienmitgliedern ergab, dass kein, jedenfalls schnelles, Non-Mediated Decay stattfindet. Trotzdem bleibt diese Variante ein plausibler Kandidat als kausale Ursache und bedarf weiterer Analysen. Bei Familie MR140 (konsanguin, ein Betroffener) konnte eine homozygote Variante an einer kanonischen Spleißstelle in *FUCA1* identifiziert werden. Mutationen in diesem Gen führen zu der Stoffwechsel-Krankheit Fucosidose, welche durch

eine schwere mentale Retardierung und weitere körperliche Einschränkungen charakterisiert ist.

Als möglicherweise krankheitsverursachende Variante bei Familie MR143 (konsanguin, zwei Betroffene) wurde eine Missense-Variante in *CSTF2* identifiziert. Das kodierte Protein wird als Cleavage stimulation factor 64 kDa subunit bezeichnet. In Kooperation konnte jedoch kein Effekt dieser Variante auf die Proteinfunktion nachgewiesen werden.

In den restlichen Familien konnten keine oder wenig überzeugende Varianten identifiziert werden.

Schlussfolgerung: In dieser Arbeit konnten in drei von sieben Familien sichere oder sehr überzeugende kausale Varianten identifiziert werden. Die Ergebnisse sind somit mit der aktuellen Literatur vergleichbar. Weitere Arbeiten sind notwendig, wobei mittlerweile eher die ganze Familie untersucht wird, als nur der Indexpatient, um alle möglichen Erbgänge analysieren zu können.

2 Abstract

Background: Mental retardation still remains an unresolved problem in the healthcare-system and in society, especially for the relatives of the affected people. At present the majority of the cases is supposed to be caused by point mutations with autosomal dominant or recessive inheritance. The aim of this work is the identification and characterization of genetical origins for the autosomal recessive form of mental retardation.

Procedure: In this thesis seven families with a total of 15 affected children were examined. Consanguinity between the parents was present in five of these families (MR39, MR140, MR141, MR142, MR143). One family (MR134) was non-consanguine and had two affected children and another non-consanguine family (MR139) had one affected child. Respectively in one affected family member exome sequencing using the *SOLiD* platform or the *HiSeq2500* System was performed. The identified variants were selected according to their position, prevalence in different databases and their influence on protein function. The variants were validated and segregated by Sanger sequencing. According to the results some of these variants have been further functionally analyzed.

Results and discussion: Variant p.Leu182Ser in *PTEN* identified in family MR141 (consanguine, two affected patients) as a possibly pathogenic variant has been functionally analyzed. Thereby the phenotype and the inheritance of *PTEN*-variants could be broadened by a mild MR and an extensive macrocephaly without any further conspicuities and the inheritance could be broadened by an autosomal recessive form. Further we identified a splice variant in *STX1A* in family MR39 (consanguine, two affected patients). By performing the RT-qPCR we detected that the mutated variant showed effects on the expression of mRNA. Syntaxin 1a is involved in the vesicle transport in synapses of the central nerve system. RT-qPCR of mRNA of lymphoblastoid cell-lines of heterozygous family members showed that there was no Non-Mediated-Decay and that the mutated allele was spliced in total. Nevertheless this variant still remains a potential candidate gene and needs to be further analyzed. In family MR140 (consanguine, one affected patient) we identified the splice-variant *FUCA1*. Mutations in this gene lead to the metabolic disorder fucosidosis, which is characterized by a severe mental retardation and further physical restrictions. In family MR143 (consanguine, two affected patients) we identified the variant in *CSTF2*. The protein is called Cleavage stimulation factor 64 kDa subunit. In cooperation with other teams there hasn't been detected an effect of this variant on the protein function.

In the remaining families, no promising candidate variant was identified so far.

Conclusion: In this study secure or convincingly causative variants were identified in three out of seven families. This result represents the results of the actual literature. Further research is necessary, whereby instead of examining only the index patient, the whole family needs to be examined for analyzing every possible mode of inheritance.

3 Einleitung

3.1 Mentale Retardierung

Die mentale Retardierung ist „eine sich in der Entwicklung manifestierende, stehengebliebene oder unvollständige Entwicklung der geistigen Fähigkeiten, mit besonderer Beeinträchtigung von Fertigkeiten, die zum Intelligenzniveau beitragen, wie z.B. Kognition, Sprache, motorische und soziale Fähigkeiten“ (Definition des ICD-10). Der Umgang der Gesellschaft mit dieser Störung zeigte im Laufe der Geschichte verschiedene Tendenzen. In der Arbeit von Syed im Jahr 2002 wurde gezeigt, dass wichtige Behandlungsansätze bereits im achten Jahrhundert gewonnen wurden (Syed 2002). So erklärt er, dass zu dieser Zeit die ersten Krankenhäuser in Bagdad, Fez und Kairo entstanden, die sich auf die Therapie von Menschen mit geistigen Störungen und psychischen Krankheiten konzentrierten. Hierbei erhielten die Patienten unter anderem Bäder, Medikamente und Musiktherapien. Im Jahr 1270 wurden ähnliche Konzepte auch in Damaskus und Aleppo praktiziert (Syed 2002). Im Gegensatz dazu wurden zur Zeit des Mittelalters in Europa Menschen mit mentaler Retardierung oft im Rahmen der Hexenprozesse getötet (Meyer 1983). Unter einem anderen Vorwand zeigte sich eine ähnliche Behandlung von Menschen mit geistiger Störung auch in der jüngeren Geschichte. Im November 1939 erklärte der Neurologe und Psychiater Hermann Pfannmüller im Rahmen seiner Tätigkeit als T4-Gutachter, dass zur Entlastung der Heilanstalten sogenanntes „lebensunwertes Leben“ beendet werden müsste (Klee 1983). Erst seit den 1960er Jahren entwickelten sich Eingliederungsversuche und Sonderschulen. Heutzutage gibt es vor allem in der westlichen Bevölkerung viele verschiedene Ansätze und Möglichkeiten, um die Betroffenen zu fördern und einzugliedern und auch ihre Angehörigen zu unterstützen. In der westlichen Bevölkerung sind etwa 1,5-2 % der Menschen von mentaler Retardierung betroffen (Leonard and Wen 2002).

Die *American Association on Intellectual and Developmental Disabilities* (AAIDD) unterteilt Intelligenz nach drei Hauptkriterien. Hierzu zählen die konzeptionellen Fähigkeiten, wie Sprechen, Lesen, Rechnen und das Verständnis von Zeit, Zahlen und Geld. Der zweite Aspekt der Intelligenz besteht aus den sozialen Fähigkeiten. Darunter werden unter anderem die interpersonellen Fähigkeiten, soziale Problembewältigung und die Fähigkeit, Regeln zu befolgen, verstanden. Als drittes Hauptkriterium gelten die praktischen Fähigkeiten, die zum Beispiel die Bewältigung des alltäglichen Lebens, Gesundheitspflege und den Umgang mit Geld beinhalten. Diese drei Grundpfeiler werden im Rahmen der *Diagnostic Adaptive Behavior Scale* gemessen. Der Test sollte im Alter zwischen vier und 21 Jahren durchgeführt werden. Die AAIDD bezeichnet einen Intelligenzquotient (IQ) von 70 als begrenzte

intellektuelle Funktionsfähigkeit. Zusätzlich muss die mentale Retardierung vor dem 18. Lebensjahr vorliegen. Zur Berechnung des Intelligenzquotienten stehen verschiedene Tests zur Verfügung. Diese sind unter anderem der *Wechsler Adult Intelligence Scales* (WAIS) oder der *Wechsler Intelligence Scales for Children* (WICS) (Ropers 2010).

Die mentale Retardierung kann anhand des IQs in verschiedene Schweregrade unterteilt werden. Daran kann ein bestimmtes Verteilungsmuster beobachtet werden. Ein Beispiel zur Unterteilung der mentalen Retardierung wird anhand der Klassifikation der mentalen Retardierung nach ICD-10-GM in Tabelle 1 gezeigt.

Klassifikation	IQ	Intelligenzalter bei Erwachsenen	Anmerkung
Leichte MR	69-50	9-11 Jahre	Lernschwierigkeiten in der Schule
Mittelgradige MR	49-35	6-8 Jahre	deutliche Entwicklungsstörungen, ausreichende Kommunikationsfähigkeit
Schwere MR	34-20	3-5 Jahre	andauernde Unterstützung notwendig
Schwerste MR	<20	unter 3 Jahre	eigene Versorgung, Kontinenz, Kommunikation und Beweglichkeit hochgradig beeinträchtigt
Dissoziierte MR	-	-	große Diskrepanz (mind. 15 IQ-Punkte) zwischen einzelnen Teilleistungsbereichen
Andere MR	-	-	Einteilung MR mithilfe der üblichen Verfahren nicht möglich (aufgrund körperlicher oder sensorischer Behinderung)
Nicht näher bezeichnete MR			keine ausreichenden Informationen bezüglich der mentalen Retardierung vorhanden

Tabelle 1: Klassifikation MR nach ICD-10-GM Version 2013 (WHO DIMDI 1994 - 2013)

Des Weiteren besteht unter Berücksichtigung weiterer Symptome die Aufteilung in syndromale und nicht-syndromale Formen (Arolt, Reimer et al. 2011). Die Unterscheidung zwischen syndromaler und nicht-syndromaler mentaler Retardierung zeichnet sich durch das Vorhandensein zusätzlicher klinischer und morphologischer Auffälligkeiten aus. Dies bedeutet, dass mit einer syndromalen mentalen Retardierung z.B. verschiedene Fehlbildungen, Organanomalien oder stoffwechsel-spezifische Störungen einhergehen. Die nicht-syndromale mentale Retardierung präsentiert sich mit unspezifischen Symptomen, wie Verhaltensauffälligkeiten oder Epilepsie. Eine Differenzierung dieser beiden Formen ist teilweise schwierig und der Übergang kann fließend sein (Ropers 2006, Kaufman, Ayub et al. 2010, Abou Jamra, Wohlfart et al. 2011).

Bezüglich der Pathogenese für mentale Retardierung wird zwischen nicht-genetischen und genetischen Ursachen unterschieden. Die genetischen Ursachen teilen sich nach heutigem Wissen in chromosomale Auffälligkeiten, X-gebundene, autosomal dominante und autosomal rezessive Erbgänge auf.

3.1.1 Nicht-genetische Ursachen der mentalen Retardierung

Nicht-genetische Ursachen stellen exogene Faktoren dar. Häufig sind intrauterine Virusinfektionen, mechanische Faktoren (z.B. Unfälle), vaskuläre Faktoren (z.B. intrazerebrale fetale Blutungen, plazentare Defekte, etc.) oder toxische Expositionen für eine Schädigung des nichtgeborenen Kindes verantwortlich (Russell, Weaver et al. 1984, Bonnemann and Meinecke 1990, Moore, Weaver et al. 1990, Rasmussen, Frias et al. 1990, DeJonge and Poulik 1997, Gabis, Gelman-Kohan et al. 1997, Bellini, Massocco et al. 2000, Gautam and Phadke 2000, Corona-Rivera, Corona-Rivera et al. 2001). Eine Studie im Jahre 2006 in Südisrael ergab, dass eine Häufung an Fehlbildungen bei Kindern von Beduinen auftrat, wenn deren Mütter während der Schwangerschaft in einem Umkreis von 20 km eines Industriegebietes lebten (Brender, Zhan et al. 2006). In den westlichen Nationen hingegen stellt insbesondere die Alkoholexposition einen wichtigen exogenen Faktor dar. Die Alkoholembryopathie ist die häufigste nicht-genetische Ursache für mentale Retardierung (Ropers 2010). Die Inzidenz hierfür ist weitestgehend unbekannt (Mattson and Riley 2011). Hauptsächlich wird das zentrale Nervensystem des Embryos geschädigt, was folglich bei dem Kind zu Lernschwäche, Störungen der Kognition, motorischen Störungen und Verhaltensauffälligkeiten führt (Kelly, Day et al. 2000, Riley and McGee 2005, Mattson and Riley 2011). Die Ausprägung der Symptomatik korreliert nachweislich mit der konsumierten Alkoholmenge während der Schwangerschaft (Hepper, Dornan et al. 2012).

3.1.2 Genetische Ursachen der mentalen Retardierung

3.1.2.1 Chromosomale Aberrationen

Aneuploidien und chromosomale Rearrangements stellen eine häufige Ursache für mentale Retardierung dar. Schätzungsweise 0,9 % aller Lebendgeburten sind von mikroskopisch sichtbaren Aneuploidien und chromosomalen Aberrationen betroffen (Cunningham, Gant et al. 2003). Als bekanntestes Beispiel ist die Trisomie 21 bzw. das Down-Syndrom zu nennen. Sind die chromosomalen Aberrationen nicht lichtmikroskopisch zu erkennen, können weitere

Methoden hilfreich sein. In der Arbeit der Gruppe um Anita Rauch wurden verschiedene diagnostische Methoden bei der Untersuchung von ungeklärter Entwicklungsverzögerung und mentaler Retardierung miteinander verglichen. Es zeigte sich, dass die molekulare Karyotypisierung mit einem 10 K SNP Array hierbei einen Großteil abdeckt. Für die Diagnostik empfiehlt Rauch in ihrer Arbeit eine bestimmte Vorgehensweise. Zunächst sollte eine klinische Untersuchung erfolgen. Falls diese Untersuchung zu keinem Ergebnis führt, wird die Durchführung von konventioneller Karyotypisierung, eines X-Inaktivierungsscreenings und molekularer Karyotypisierung empfohlen (Rauch, Hoyer et al. 2006).

3.1.2.2 X-gebundene mentale Retardierung

Es wird vermutet, dass 0,18 % aller Männer von X-gebundener mentaler Retardierung betroffen und 0,24 % aller Frauen Trägerinnen für eine X-gebundene mentale Retardierung sind (Hamel and Poppelaars 2000). Die X-gebundene mentale Retardierung wird in eine syndromale und eine nicht-syndromale Form unterteilt (Ropers and Hamel 2005). Die häufigste der syndromalen X-gebundenen mentalen Retardierungen ist das Fragile-X-Syndrom (Martin and Bell 1943). Es wird angenommen, dass das Fragile-X-Syndrom die häufigste vererbte mentale Retardierung und insgesamt die zweithäufigste mentale Retardierung nach dem Down-Syndrom ist.

3.1.2.3 Autosomal dominante mentale Retardierung

Ein autosomal dominanter Erbgang bei mentaler Retardierung über mehrere Generationen in einem Familienstammbaum ist selten zu finden. Die Betroffenen pflanzen sich selten fort (Ropers 2010). Aus diesem Grund wird angenommen, dass eine autosomal dominante mentale Retardierung meist auf einer *de novo* Variante basiert. In der Arbeit von Rauch und Kollegen im Jahre 2012 wurde nach *de novo* Varianten bei Individuen mit sporadischer nicht-syndromaler mentaler Retardierung gesucht (Rauch, Wieczorek et al. 2012). Hierbei wurden 51 Patienten mit einer nicht-spezifischen mentalen Retardierung untersucht. Es wurden 16 *de novo* Varianten in Genen gefunden, die bereits mit mentaler Retardierung assoziiert waren. Bei 16 % der Patienten wurden *de novo* Varianten in *SYNGAP1*, *STXBP1*, und *SCN2A* gefunden. Die Arbeit von Anita Rauch ergab, dass die mentale Retardierung bei 45-55 % der Patienten durch *de novo* Varianten verursacht sein könnte. Die Ergebnisse ihrer

Arbeit zeigten, dass *de novo* Punktmutationen und kleine InDels mit großer Wahrscheinlichkeit einen Großteil der Fälle von schwerer, sporadischer, nicht-syndromaler mentaler Retardierung ausmachen. X-gebundene und autosomal rezessive Erbgänge scheinen in einer nicht-konsanguinen Ehe mit betroffenen Kindern einen wesentlich geringeren Anteil bezüglich der Vererbung von nicht-syndromaler mentaler Retardierung darzustellen. Die Arbeit zeigte zudem, dass im Vergleich zur Sanger-Sequenzierung, Exom-Sequenzierung geeigneter ist, um die Ursache für mentale Retardierung zu finden. So erklärt Rauch in ihrer Arbeit, dass in Zukunft die Exom-Sequenzierung als Standard-Methode in der Diagnostik von ungeklärter mentaler Retardierung verwendet werden sollte.

3.1.2.4 Autosomal rezessive mentale Retardierung

Die autosomal rezessive mentale Retardierung stellt in den Industrienationen aufgrund der Kleinfamilien ein schwer erforschbares Gebiet dar. Anders verhält sich dies in weiten Bereichen des Mittleren Ostens und in einigen Teilen Indiens, wo der Anteil von konsanguinen Ehen groß ist und die Familien kinderreicher sind. Dies führt zu der erhöhten Prävalenz von autosomal rezessiv vererbten Krankheiten in diesen Bevölkerungsgruppen (Najmabadi, Hu et al. 2011). Unter anderem durch die Entwicklung neuer Methoden, wie *Next Generation Sequencing* (NGS), konnte eine Vielzahl an autosomal rezessiv vererbten Varianten entdeckt werden (Musante and Ropers 2014). Der Großteil von autosomal rezessiv vererbten Varianten bleibt noch unbekannt (Ropers 2010). Das klinische Bild von autosomal rezessiver mentaler Retardierung ist sehr heterogen. Es kann mit weiteren psychiatrischen und neurologischen Krankheitsbildern assoziiert sein (Musante and Ropers 2014).

3.2 Strategien zur Identifizierung der Kandidatengene bei ARID

3.2.1 Homozygotie-Kartierung bei konsanguinen Familien

Eine konsanguine Ehe bezeichnet die Ehe zwischen zwei Personen, die Cousin und Cousine zweiten Grades oder näher miteinander verwandt sind (Bittles 2001). Diese Form der Eheschließung ist im Mittleren Osten, Nordafrika und Teilen Indiens weit verbreitet und mit einem erhöhten Risiko für die Vererbung von autosomal rezessiven Krankheiten vergesellschaftet (Hamamy, Antonarakis et al. 2011). Zur positionellen Klonierung von autosomal rezessiven Genen kann unter der Annahme einer *Identical By Descent* Variante

die Homozygotie-Kartierung angewandt werden. *Identical By Descent* (IBD) bedeutet, dass beide Allele auf denselben Vorfahren zurückzuführen sind. Diese Methode bezeichnet man auch als Autozygotie-Kartierung. Es besteht allerdings die Möglichkeit, dass bei einem Kind eine Homozygotie auftritt, dessen Eltern nicht verwandt sind und bei denen auch kein gemeinsamer Vorfahre bekannt ist. Diesen Sachverhalt bezeichnet man als *Identical By State* (IBS) (Strachan and Read 2011). Zunächst werden im Rahmen der Autozygotie-Kartierung genomweite positionelle Kartierungen mit Mikrosatelliten oder SNPs durchgeführt (Gibbs and Singleton 2006). Die Segmente, die als zusammenhängende homozygote Abschnitte vorliegen, bezeichnet man als *Runs Of Homozygosity* (ROHs). Wenn diese ROHs nur bei den erkrankten Familienmitgliedern zu finden sind, ist anzunehmen, dass dort die krankheitsverursachende Variante zu finden ist (Gibbs and Singleton 2006).

Im Rahmen der Homozygotie-Kartierung wurde bei dieser Arbeit der *HomozygosityMapper* genutzt. Dieser ist eine online zugängliche Plattform. Dieses Programm arbeitet unabhängig von den Familienstrukturen, sodass bereits die Daten eines einzelnen betroffenen Individuums für eine Analyse ausreichend sind (Seelow, Schuelke et al. 2009).

In der Arbeit von Alkuraya von 2010 wurden die Vorteile der Homozygotie-Kartierung anhand von klinischen Beispielen veranschaulicht. So wurde gezeigt, dass man mithilfe der Homozygotie-Kartierung die Anwendung von spezialisierten biochemischen Methoden im Zusammenhang mit Stoffwechselstörungen verhindern und somit die dadurch anfallenden Kosten reduzieren kann. Zudem kann durch Homozygotie-Kartierung die Notwendigkeit, eine Vielzahl an Genen zu sequenzieren, reduziert werden. Es können mit dieser Methode zuvor nicht erwartete Varianten aufgedeckt werden. Diese Aspekte wurden auch in dieser Arbeit bei der Wahl der Methode berücksichtigt (Alkuraya 2010).

Diese Kartierungsmethode ist allerdings für andere Vererbungsmodi nicht geeignet.

3.2.2 Next Generation Sequencing (NGS)

Unter *Next Generation Sequencing* (NGS) versteht man eine massive parallele Sequenzierung von DNA. Es sind verschiedene NGS-Systeme, die nach unterschiedlichen Prinzipien arbeiten, verfügbar. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die Systeme *SOLiD* (*support oligonucleotide ligation detection*) von Applied Biosystems und *HiSeq2500* (Illumina, San Diego, CA, USA) verwendet. In beiden Fällen wurde die DNA der Patienten vorab präpariert, um passende Fragmenten-Bibliotheken zu erstellen. Hierbei wurden die kodierenden Bereiche, die Exons, angereichert, um effizienter zu arbeiten. Varianten in den intronischen

und intergenischen Bereichen können derzeit kaum interpretiert werden. Die Anwendung von NGS bietet den Vorteil, dass parallel eine große Anzahl an Genen sequenziert werden kann und dies mittlerweile mit einem geringen Kostenaufwand verbunden ist (Illumina 2016). Der Nachteil ist, dass bei dieser Methode Sequenzierungsfehler auftreten können, sodass die interessanten Varianten weiterhin mithilfe der Sanger Sequenzierung validiert werden müssen. Eine genauere Beschreibung dieser Methode findet sich unter Punkt 4.3.3. Bei jeder Exom-Sequenzierung wurden zahlreiche, häufig über 50.000 Varianten identifiziert. Diese Varianten wurden mittels der Kartierungsinformationen, sowie mittels der öffentlich zugänglichen Informationen über die Frequenz der Varianten, der Konservierung, der Prädiktionsprogramme sowie der bekannten Genfunktionen priorisiert. Ein Beispiel aus dieser Arbeit (Familie MR140) ist in Abbildung 1 dargestellt. Genauere Erläuterung zu den einzelnen Filterungsschritten sind in dem Abschnitt 4.3 Methoden beschrieben.

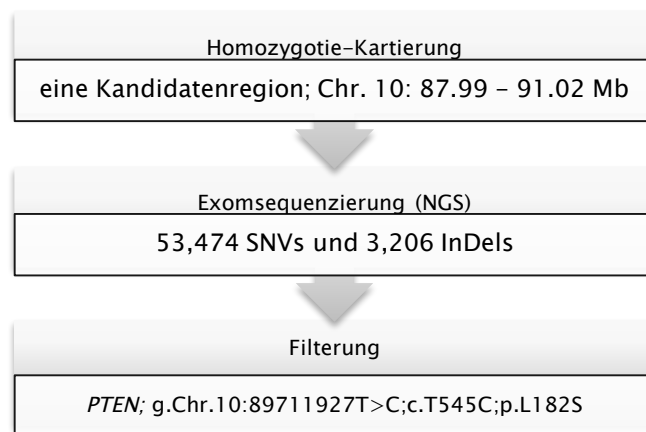


Abbildung 1: Arbeitsschritte zur Identifizierung des Kandidatengenes am Beispiel von Familie MR140

3.2.3 Vorarbeiten

Im Rahmen der Vorarbeiten mussten geeignete Familien rekrutiert werden. Hierzu nahm Herr PD Dr. med. Abou Jamra unter anderem Kontakt mit betreuenden Pädiatern in verschiedenen Regionen Syriens auf. Es wurde in diesem Rahmen von allen Patienten bzw. deren Eltern deren Einverständnisse eingeholt. Die Patienten wurden in Syrien von ihm untersucht. Der Schwerpunkt lag insbesondere auf der Suche nach neurologischen, ophthalmologischen und dermatologischen Auffälligkeiten. Verbale und motorische Fähigkeiten wurden geprüft. Die Eltern wurden bezüglich Komplikationen in der peri-, post- und neonatalen Phase und bezüglich der Krankheitsgeschichte befragt. Ein Stammbaum

wurde erstellt. Blutproben wurden von den Familienmitgliedern entnommen. Daraus wurde die DNA isoliert. Ein Patient in jeder Familie wurde auf das Fragile-X-Syndrom getestet und alle Mütter bezüglich ihres X-Inaktivierungsstatus geprüft. Zusätzlich wurden Patienten aus Deutschland und aus anderen Ländern rekrutiert. Die Arbeitsgruppe erhielt dadurch Blutproben oder bereits isolierte DNA von Patienten und deren Familienmitgliedern aus Australien, Brasilien und von türkisch-stämmigen Familien aus Deutschland. Die betreuenden Ärzte stellten ihm eine detaillierte Anamnese der Patienten, Stammbäume und zusätzliches Untersuchungsmaterial, z.B. MRT-Bilder oder andere Untersuchungsergebnisse, zur Verfügung.

3.3 Ziel der Arbeit

Ziel dieser Arbeit ist die Identifizierung und Charakterisierung von neuen Genen, die im Zusammenhang mit der autosomal-rezessiven mentalen Retardierung stehen.

4 Untersuchungskollektiv, Material und Methoden

4.1 Untersuchungskollektiv

Tabelle 2 zeigt eine Übersicht der untersuchten Familien.

Familie	Fam.mitglied	Geschlecht	betroffen	Konsanguinität	Herkunftsland
MR134-01	Index	m	ja	nicht bekannt	Brasilien (São Paulo)
MR134-02	Vater	m	nein		
MR134-03	Mutter	w	nein		
MR134-04	Bruder	m	ja		
MR134-05	Schwester	w	ja		
MR139-01	Index	w	ja	nicht bekannt	Australien
MR139-02	Vater	m	nein		
MR139-03	Mutter	w	nein		
MR140-01	Index	m	ja	ja	Syrien
MR140-02	Vater	m	nein		
MR140-03	Mutter	w	nein		
MR141-01	Index	w	ja	ja	Türkei
MR141-02	Vater	m	nein		
MR141-03	Mutter	w	nein		
MR141-04	Bruder	m	ja		
MR142-01	Index	f	ja	ja	Türkei
MR142-02	Vater	m	nein		
MR142-03	Mutter	f	nein		
MR142-04	Schwester	f	ja		
MR142-05	Schwester	f	ja		
MR142-06	Bruder	m	ja		
MR142-07	Schwester	f	nein		
MR143-01	Index	m	ja	ja	Türkei
MR143-02	Vater	m	nein		
MR143-03	Mutter	f	nein		
MR143-04	Bruder	m	ja		
MR39-01	Index	m	ja	ja	Syrien
MR39-02	Vater	m	nein		
MR39-03	Mutter	f	nein		
MR39-04	Schwester	f	nein		
MR39-05	Bruder	m	ja		
MR39-06	Schwester	f	nein/ja		
MR39-07	Schwester	f	nein		
MR39-08	Bruder	m	nein		
MR39-09	Schwester	f	nein		
MR39-10	Schwester	f	nein		
MR39-11	Bruder	m	nein		

Tabelle 2: Übersicht der Familien

4.1.1 Familie MR134

Die brasilianische Familie MR134 hat drei Kinder mit mentaler Retardierung. Sowohl die beiden Söhne (MR134-01, -04) als auch die Tochter (MR134-05) zeigten im Rahmen der Vorstellung bei dem untersuchenden Arzt in Brasilien spastische Paraplegien, eine moderate mentale Retardierung, ein von dem untersuchenden Arzt als „fröhliche Persönlichkeit“ beschriebenes Verhalten, eine milde faziale Auffälligkeit und eine Gehirnatrophie.

Bis auf eine leicht erhöhte Laktat-Konzentration befanden sich alle metabolischen Parameter zum Zeitpunkt der Untersuchung im Normalbereich. Eine Muskelbiopsie von Patient MR134-01 zeigte keine mitochondriale Fehlfunktion. Die Elektromyographie und die Untersuchung der Nervenleitungsgeschwindigkeit waren bei allen Geschwistern unauffällig. Die Eltern sind nicht verwandt, stammen jedoch beide aus demselben kleinen Dorf im Südosten Brasiliens, mit hauptsächlich portugiesisch-stämmigen Bewohnern. Der Stammbaum der Familie wird in Abbildung 2 dargestellt.

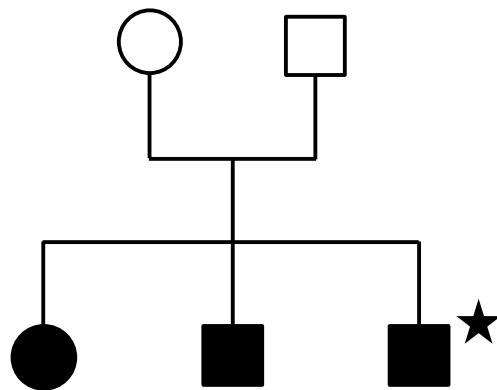


Abbildung 2: Stammbaum der Familie MR134; *- Index-Patient

4.1.2 Familie MR139

Die ratsuchenden Eltern stellten sich in einer Humangenetischen Klinik in Australien vor. Bei ihrem einzigen Kind (MR134-01) wurde eine nicht-spezifische mentale Retardierung mit Mikrozephalie festgestellt. Die gesunden Eltern sind nicht verwandt. Der untersuchende Arzt erklärte in seinem Brief, dass im Rahmen eigener Analysen zwei lange homozygote Regionen (ROHs) auf Chromosom 6 identifiziert wurden und dass der Verdacht auf eine autosomal-rezessive Vererbung bestehe. Mit der Bitte um weitere Abklärung konsultierte er Herrn PD Dr. med. Rami Abou Jamra. Der Stammbaum der Familie wird in Abbildung 3 dargestellt.

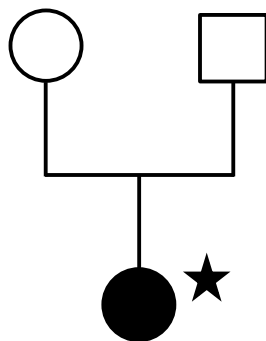


Abbildung 3: Stammbaum der Familie MR139; * = Index-Patient

4.1.3 Familie MR140

Die syrische Familie MR140 hat ein Kind mit mentaler Retardierung. Abgesehen von einer kurzen Infektion im siebten Monat verlief die Schwangerschaft unauffällig. Während der Schwangerschaft wurden keine abnormalen Bewegungen des Feten registriert. Die Geburt ereignete sich spontan und im errechneten Zeitraum. Es fanden bereits früh Augenkontakt, Lächeln und Händeklatschen statt. Zu keinem Zeitpunkt waren freies Sitzen und das Greifen nach Gegenständen möglich. Innerhalb des ersten Lebensjahres verschlechterte sich die Sehfähigkeit. Im Alter von einem Jahr wurden bereits erlernte Fähigkeiten wieder verlernt. Es entwickelte sich nach einer Bronchitis eine linksseitige Muskelschwäche mit im MRT darstellbarer Leukodystrophie. Ophthalmoskopisch waren zu diesem Zeitpunkt bilaterale papilläre Ödeme mit atrophischen Spots in der Retina zu erkennen. Nach einem Krampfanfall im Alter von einem Jahr und acht Monaten erfolgte eine Lumbalpunktion, die keine pathologischen Auffälligkeiten zeigte. Im zweiten Lebensjahr verringerte sich die Häufigkeit der Infektionen. Ein zunehmend vergrößerter Kopfumfang, sowie Hepato- und

Splenomegalie wurden erstmals registriert. Die Familie floh mit dem zu dem Zeitpunkt zweijährigen Patienten von Syrien nach Philadelphia. Die Eltern sind Cousin und Cousine ersten Grades und Angehörige einer ethnischen Minderheit. Eine der Tanten des Patienten ist an Trisomie 21 erkrankt. Der Vater leidet an familiärem Mittelmeerfieber. In der körperlichen Untersuchung präsentierte sich ein vom untersuchenden Arzt als „freundlich“ beschriebener Junge. Der Kopfumfang lag zum Zeitpunkt der Untersuchung bei 47 cm. Augenkontakt und Reaktionen auf visuelle Stimuli fehlten. Er zeigte übermäßige Schreckreaktionen auf akustische Stimuli. Zudem fielen ein Nävus auf der rechten Hüfte (Durchmesser: 0,5 cm), eine stark ausgeprägte Hepatosplenomegalie (Leber 5 cm unter dem Rippenbogen, Milz 3 cm unter dem Rippenbogen), ein aufgeblähtes Abdomen und Pilzinfektionen des Nagels auf. Während der Untersuchung zeigte sich eine geringe Interaktion des Patienten mit der Umwelt. Jegliche Produktion von Wörtern oder Lauten fehlte. Es fand eine langsame Augenbewegung mit Fixierung in der Ferne statt. Der Patient war nicht fähig zu schlucken, zu saugen, frei zu sitzen oder zu rollen. Es wurde nur eine geringe Kopfkontrolle beobachtet. Das Greifen nach Objekten war nicht möglich. Es wurden beide Hände zu Fäusten verschlossen. Es war eine stärkere Flexion linksseitig (Arm und Bein), eine starke Hypertonie der Extremitäten und eine Hypotonie des Rumpfes festzustellen. Die Laborwerte zeigten einen normalen Vitamin B12-Spiegel und erhöhte Ammoniak-Werte. Das Schädel-MRT zeigte einen starken Verlust der Myelinisierung, vor allem in den supratentoriellen Regionen. Des Weiteren zeigten sich eine verminderte Ausbildung des Corpus Callosum und ödematös geschwollen wirkende Basalganglien. Der Stammbaum der Familie wird in Abbildung 4 dargestellt.

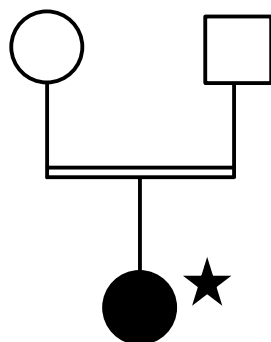


Abbildung 4: Stammbaum der Familie MR140; * = Index-Patient

4.1.4 Familie MR141

Die türkische Familie MR141 hat zwei Kinder mit milder mentaler Retardierung. Die Eltern der beiden betroffenen Personen sind verwandt. Die erste Schwangerschaft der Mutter endete mit einer Totgeburt kurz vor dem geplanten Geburtstermin. Während dieser Schwangerschaft waren außer einem Gestationsdiabetes keine Auffälligkeiten vermerkt.

Zum Zeitpunkt der Geburt war die Tochter 52 cm lang (P 90), wog 3500 g (P 90-97) und hatte einen Kopfumfang von 35,3 cm (P 90). Die Wachstumskurven ihres Kopfumfanges stiegen stark an und kreuzten die Perzentilen. Die Entwicklungsmeilensteine wurden verzögert erreicht. Sie fing mit zwölf Monaten an zu laufen und sprach ihre ersten Worte mit 24 Monaten. Beide Kinder wurden bilingual aufgezogen. Als Kind litt sie gehäuft an obstruktiven Bronchitiden. Aufgrund einer Adenoidhypertrophie und einem Serotympanon beidseits wurden eine Adenoidektomie und eine Parazentese vorgenommen. Zusätzlich litt sie an Ösophagusreflux, Staetorrhö, gesteigerter Transpiration und Schlafstörungen. Mehrere Intelligenztests wurden bei ihr durchgeführt. Diese führten stets zu einem inhomogenen Ergebnis, da sie einerseits keine oder geringe Defizite im auditiven Gedächtnis oder deduktiven Denken, andererseits starke Einschränkungen im Bereich des visuellen Kurzzeitgedächtnisses und der motorischen Reproduktion aufwies. Im *Beery-Buktenica Entwicklungstest* zur Analyse der visuell-motorischen Integration, der bei ihr im Alter von sieben Jahren durchgeführt wurde, erreichte sie 68 Punkte. Dies entspricht einem Alter von 4,7 Jahren. Im Alter von 15 Jahren ergab der *HAWIK* einen IQ-Wert von 57 Punkten. Dieser Wert steht für eine milde mentale Retardierung. Nachdem sie einen integrativen Kindergarten und eine Sonderschule besuchte, begann sie mit einer Ausbildung. Während sie problemlos in zwei unterschiedlichen Sprachen liest und schreibt, weist sie große Defizite bezüglich ihrer mathematischen Fähigkeiten und des zeitlichen Vorstellungsvermögens auf.

Eine erneute Untersuchung der beiden Patienten erfolgte durch Herrn Dr. PD Abou Jamra und Andrea Vera Khaled im November 2013. Zum Zeitpunkt der Untersuchung war die Patientin 18 Jahre alt, 166 cm groß (P 25-50), wog 60 kg (P 50-75) und hatte einen Kopfumfang von 63 cm (6 cm über der 97. Perzentile bzw. +5,9 Standardabweichung). Auffällig waren ihre längliche Kopfform, wie auch ihre hohe, prominente Stirn, die an Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Patienten erinnerte. Fragen wurden von ihr freundlich, interaktiv und adäquat beantwortet. Es fielen keine autistischen Merkmale auf.

Der betroffene Sohn wurde in der 35. Schwangerschaftswoche geboren. Er war zum Zeitpunkt seiner Geburt 49 cm lang (P 75), wog 2500 g (P 25-50) und hatte gemäß den Angaben der Eltern einen normalen Kopfumfang. Bekannt ist, dass sein Kopfumfang im Alter von zwei Monaten auf der 50. Perzentile lag. Da sich in seinen ersten Lebenswochen Anpassungsstörungen zeigten, musste er in dieser Zeit in einem Inkubator bleiben. Wie

bereits zuvor bei seiner Schwester, stieg auch bei ihm die Wachstumskurve seines Kopfumfanges stark an und kreuzte die Perzentilen. Auch er begann erst im Alter von 19 Monaten zu laufen und sprach seine ersten Worte mit 27 Monaten. Sein Skelettalter war im Alter von 16 Monaten deutlich verzögert. Er erhielt ab dem Alter von 18 Monaten eine Physiotherapie. Bei einer Untersuchung im Alter von drei Jahren stellte der untersuchende Arzt verminderte propriozeptive Reflexe, eine Schwäche der Extremitäten und ein reduziertes Muskelrelief fest. Zu dieser Zeit zeigte ein MRT seines Kopfes erweiterte Virchow-Robin-Räume, Dilatationen der weißen Substanz und eine pharyngeale Zyste, die jedoch keinen Krankheitswert besaß. Zudem zeigte ein pathologisches Wach-EEG intermittierende langsame Wellen auf der rechten zentralen Seite. Dies lieferte jedoch keinen Hinweis auf epileptische Episoden. Dennoch ereigneten sich in diesem Zeitraum innerhalb von drei Monaten zwei epileptische Anfälle. Bei Untersuchungen, die ein Jahr später erfolgten, fielen sein tapsiger und breitbeiniger Gang, ein grober Pinzettengriff, reduzierte spontane Bewegungen, sowie eine verminderte Konzentrationsfähigkeit auf. Seine zeitliche und räumliche Orientierung waren stark beeinträchtigt. Mit zwölf Jahren wurde auch bei ihm der *HAWIK* durchgeführt. Dieser ergab einen IQ-Wert von 54, der ebenfalls einer milden

mental Retardierung entspricht. Er besuchte denselben Kindergarten und dieselbe Schule wie seine Schwester. Bezüglich seiner sprachlichen Fähigkeiten erbringt er schwächere Leistungen als seine Schwester. Er weist starke Defizite in Bezug auf abstraktes logisches Denken, Rechnen und zeitlicher Vorstellung auf. Zum Zeitpunkt seiner Untersuchung war er 180,5 cm groß (P 90-97), wog 80 kg (6 kg über der 97. Perzentile), und hatte einen Kopfumfang von 64 cm (6 cm über der 97. Perzentile bzw. +5,5 Standardabweichung). Er war sozial integriert, zeigte keinerlei autistische Merkmale und keine Kontaktängste.

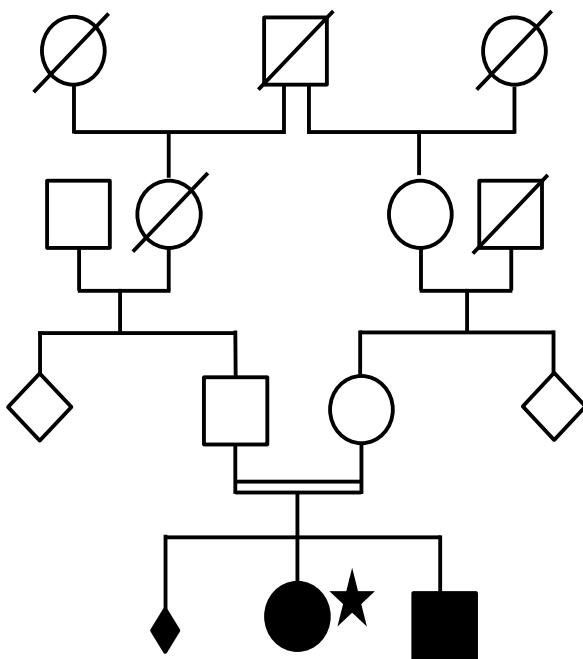


Abbildung 5: Stammbaum der Familie MR141; * = Index-Patient

Beide Elternteile waren gesund und hatten keine Tumoren. Die Mutter des Vaters starb im Alter von 57 Jahren aufgrund wiederholt auftretender Schlaganfälle. In der Verwandtschaft zeigten sich keine weiteren auffälligen Symptome oder Erkrankungen. Der Stammbaum der Familie wird in Abbildung 5 dargestellt.

4.1.5 Familie MR142

Die türkische Familie MR142 hat vier betroffene Kinder und eine gesunde Tochter (MR142-07). Die drei erkrankten Töchter waren zum Zeitpunkt der Untersuchung 34 (MR142-01), 32 (MR142-05) und 30 (MR142-04) Jahre alt. Der Sohn (MR142-06) war 24 Jahre alt. Alle vier Patienten arbeiteten zum Zeitpunkt der Untersuchung, nachdem sie eine Förderschule besucht hatten, in einer Behindertenwerkstatt. Bei keinem der betroffenen Personen waren Auffälligkeiten der inneren Organe erkennbar. Auch innerhalb der näheren Verwandtschaft waren keine schweren Erbkrankheiten, Malformationen oder sonstige Behinderungen bekannt. Die Eltern erklärten, dass sie Cousin und Cousine ersten Grades seien. Die Familie stammt aus der Türkei und lebt in Deutschland. Die Chromosomenanalyse und die Untersuchung auf das Fragile-X-Syndrom bei den Eltern und den vier Patienten waren unauffällig. SNP-Array-Analysen ergaben bei den Betroffenen zwei gemeinsame LOH (*Loss of Heterozygosity*)-Regionen mit darin enthaltenen interessanten Genen. Der Stammbaum der Familie wird in Abbildung 6 dargestellt.

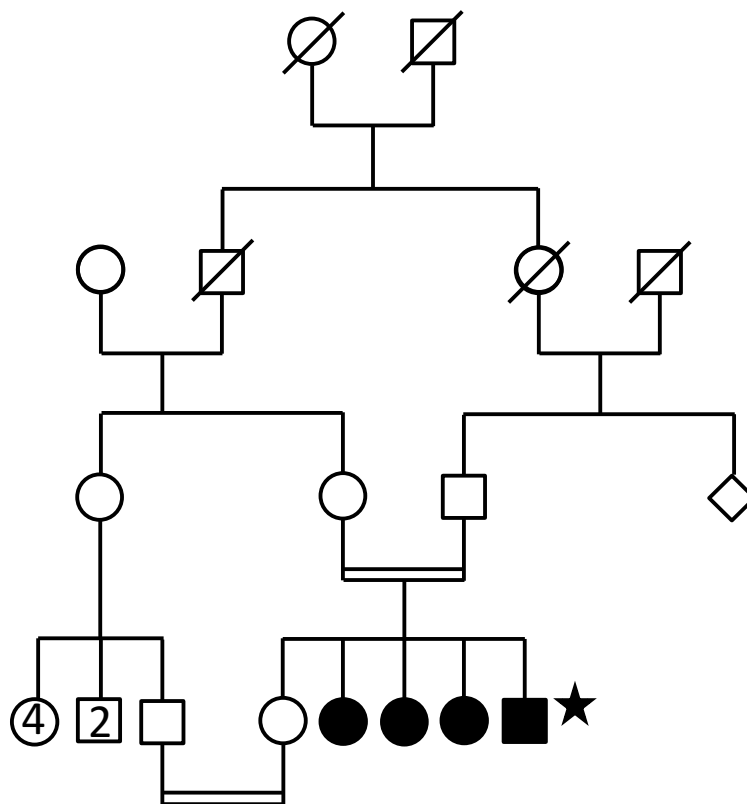


Abbildung 6: Stammbaum der Familie MR142; * = Index-Patient

4.1.6 Familie MR143

Die türkische Familie MR143 hat zwei Söhne mit mentaler Retardierung (MR143-01, -04). Während beide Elternteile keine Symptome aufwiesen, ließen sich bei den beiden Kindern ein atypischer Autismus, eine kombinierte Entwicklungsstörung, wahrscheinlich eine isolierte prämatüre Pubarche, leicht akzelerierte Skelettreifung und ein pathologisches Wach-EEG feststellen. Die Eltern sind Cousin und Cousine ersten Grades. Die Familie stammt aus der Türkei und lebt in Deutschland. Der Stammbaum der Familie wird in Abbildung 7 dargestellt.

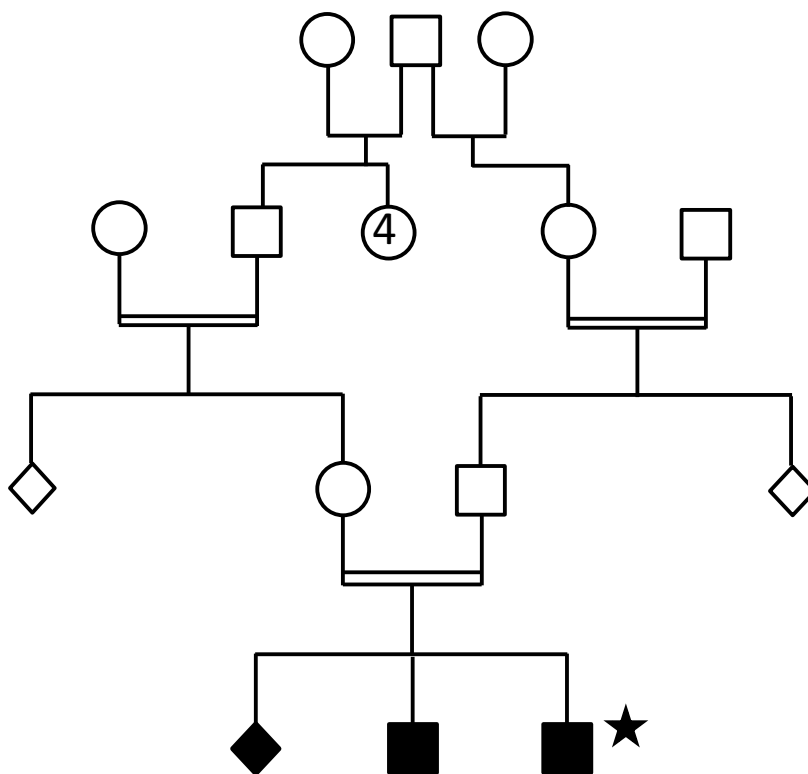


Abbildung 7: Stammbaum der Familie MR143; * = Index-Patient

4.1.7 Familie MR39

Die syrische Familie MR39 hat zehn Kinder. Die Eltern sind Cousin und Cousine ersten Grades. Die Familie lebt in Syrien. Zwei der Kinder leiden an einer mentalen Retardierung. Diese beiden Brüder wiesen zum Zeitpunkt der Geburt größere Geburtsmaße und eine Hypotonie auf. Sie erlernten das Laufen im Alter von drei Jahren und die Sprachentwicklung war verzögert. Die Kopfumfänge der beiden Patienten waren zum Zeitpunkt der Untersuchung normal. Der jüngere Bruder, 1989 geboren, zeigte aggressives Verhalten, während sein älterer Bruder, 1985 geboren, schwach und passiv war. Des Weiteren bestand die Möglichkeit, dass eine Schwester, 1990 geboren, betroffen sein könnte, da auch ihre Entwicklung verlangsamt stattfand. Die Symptome der Brüder waren jedoch wesentlich stärker ausgeprägt. Der Stammbaum der Familie wird in Abbildung 8 dargestellt.

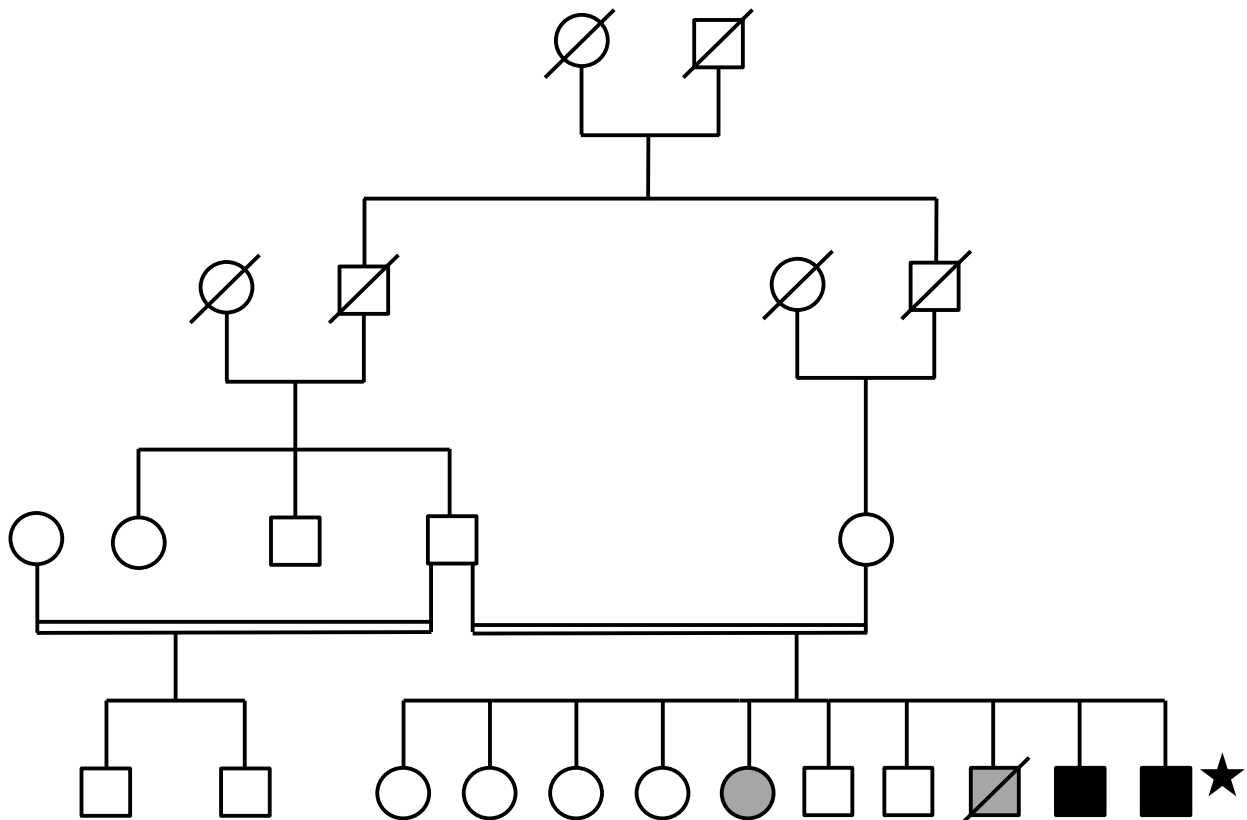


Abbildung 8: Stammbaum der Familie MR39, * = Index-Patient

4.2 Material

4.2.1 Verbrauchsmaterialien

96-Well Deep-Well Platten	Greiner Bio-one GmbH (Frickenhausen)
Desinfektionsspray Apesin	Tana-Chemie GmbH (Mainz)
Falcon (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen)
Frischhaltefolie alio	Wentus Kunststoff GmbH (Höxter)
Handschuhe	Semperit Technische Produkte GmbH (Wien), HARTMANN (Heidenheim)
MicroAmp. Optical 384 Well Reaction Plate with Barcode	Applied Biosystems by Life Technologies GmbH (Foster City, USA)
Microseal B Adhesive Seal	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf)
Nitrocellulosemembran	Whatman GmbH (Dassel)
NuPAGE® Novex Bis-Tris Gele	Invitrogen (Karlsruhe)
PCR 96 Well Microplate Sealing Tape	Costar Corning Inc. (Chorges, New York)
Pipettenspitzen	Biozym Scientific GmbH (Oldendorf), Eppendorf (Hamburg), Greiner Bio-One GmbH (Frickenhausen), Sarstedt (Nürnbrecht)
Reaktionsgefäß 0,2 ml	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Reaktionsgefäß 1,5 ml, 2,0 ml	Josef Peske GmbH (Aindling)
Thermowell 96 Well Platten	Costar Corning Inc. (Bodenheim, New York)

4.2.2 Geräte

5500 SOLiD™ System	Applied Biosystems by Life Technologies GmbH (Foster City, USA)
Eismaschine	Ziegra (Isernhagen)
Elektrophoresekammern	MWG Biotech (Ebersberg)
Geldokumentationsanlage: UVstar 31 nm	Biometra GmbH (Göttingen)
Gelträger, Gelkämme für Agarose-Gele	Peqlab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
HiSeq2500 System	Illumina (San Diego, CA, USA)

Kühl- und Gefrierschränke: (4 °C) Electronic comfort (-20 °C) ProfiLine (-80 °C) LegaciTM Laborwaage	Siemens (Erlangen) Liebherr-International AG (Bulle) Thermo Scientific Revco (Waltham, USA) Sartorius AG (Göttingen)
LI-COR C-DiGit® Blot Scanner	LI-COR Biosciences – GmbH (Lincoln, USA)
Mastercycler pro vapo.protect	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowelle	Panasonic (Osaka, Japan)
Monochromator Infinite 200 NanoQuant	TECAN Group Ltd. (Männedorf)
Pipetten	Dunn Labortechnik GmbH (Asbach), Eppendorf (Hamburg), Gilson (Middleton, USA)
Pipettierroboter Biomek®NXP	Beckman Coulter Inc (Brea, USA)
Quant Studio 12K Flex	Applied Biosystems by Life Technologies GmbH (Foster City, USA)
Sequenzierer: ABI3730 DNA Analyser	Applied Biosystems by Life Technologies GmbH (Foster City, USA)
Spannungsgeber	Biorad (Hercules, California, USA)
Gelelektrophorese:POWERPac 300	
Thermomixer compact	Eppendorf (Hamburg)
Vortex	Janke & Kunkel GmbH und Co. KG (Breisgau)
Wasseraufbereitungsanlage PURELAB plus	USF-ELGA/ Veolia Water Solutions andTechnologies (Paris, Frankreich)
Zentrifugen: miniSpin Centrifuge 5415D Centrifuge 5810	Eppendorf (Hamburg)

4.2.3 Chemikalien

Agarose	Roth (Karlsruhe)
AMPure® Kit	Agencourt Bioscience Corporation (Bernried)
Betain 5 M	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)
Big DyeTerminator v1.1, v3.1 5x Sequencing Buffer	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Bromphenolblau	Sigma Chemicals (Perth, Australien)
CleanSEQ® Kit	Agencourt Bioscience Corporation (Bernried)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck (Darmstadt)
dNTP Mix (2,5 mM)	Invitrogen (Karlsruhe)
EDTA	Roth (Karlsruhe)

Ethanol	Roth (Karlsruhe)
Ethidiumbromid	Roth (Karlsruhe)
Glycerin	Roth (Karlsruhe)
Isopropanol	Roth (Karlsruhe)
Kaliumchlorid (KCl)	Sigma- Aldrich (Taufkirchen)
Kaliumdihydrogenphosphat (KH₂PO₄)	Roth (Karlsruhe)
Magermilchpulver	Saliter (Obergünzburg)
Magnesiumchlorid (MgCl₂)	Merck (Darmstadt)
Methanol	Roth (Karlsruhe)
MOPS	Roth (Karlsruhe)
Natriumchlorid (NaCl)	Roth (Karlsruhe)
NuPAGE® Antioxidanz	Invitrogen (Karlsruhe)
NuPAGE® LDS Sample Buffer (4x)	Invitrogen (Karlsruhe)
Ponceau S Solution	Sigma- Aldrich (Taufkirchen)
Primer (s. Anhang 13.1)	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)
Random Primer	Invitrogen (Karlsruhe)
SuperSignal® West Femto Maximum Sensitivity Substrate	Thermo Scientific (Rockford, USA)
Trihydroxymethylaminomethan (TRIS)	Roth (Karlsruhe)
Triton® X 100	Sigma- Aldrich (Taufkirchen)
Tween® 20	Sigma- Aldrich (Taufkirchen)

4.2.4 Lösungen, Puffer

Entwicklerlösung	0,5 l Entwicklerkonzentrat 1,75 l Aqua dest.
Ethidiumbromidlösung	50 ml Aqua dest. 2 µl 1 % Ethidiumbromid
Fixiererlösung	0,4 l Fixiererkonzentrat 1,6 l Aqua dest.
Ladepuffer (6x)	30 ml 100 % Glycerin 0,25 g Bromphenolblau 0,25 g Xylencyanol 70 ml Aqua dest.
Lysepuffer (Proteinlysate) 100 ml	0,121 g Tris Base 0,877 g NaCl

	1 ml Triton X100
Magermilchlösung (Blockierungslösung)	5 % Magermilchpulver Lösen in TBS-Tween
20x MOPS Puffer 500 ml	104,6 g MOPS 60,6 g Tris Base 10 g SDS 3 g EDTA
10x PBS	0,137 M NaCl 2,7 mM KCl 1,15 mM KH ₂ PO ₄ 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ autoklaviert
10x TBE Puffer	1,0 M Tris 0,83 M Borsäure 0,01 M EDTA
10x TBS Puffer	88 g NaCl 2 g KCl 30 g Tris-Base (pH 7,4) 5 ml Tween
1x Transfer-Puffer	20 ml Transferpuffer 20x 40 ml Methanol 340 ml USF-Wasser 250 µl Antioxidanz
20x Transfer-Puffer	10,2 g Bicine 13,08 g Bis-Tris 0,75 g EDTA
10x WinTaq-Puffer	500 mM KCl 10 mM Tris-HCl (pH 8,3) 15 mM MgCl ₂
Lysepuffer von Watanabe und Katayama (Watanabe, Katayama et al. 2013)	100 mM HEPES 100 EGTA 1 M NaCl 1% Triton X-100

4.2.5 Reaktionssysteme

Big Dye® Terminator v3.1 5x Cycle Sequencing RR-100 Kit	Applied Biosystems (Foster City, USA)
Qiagen, Hilden RNeasy® Mini Kit	Qiagen (Hilden)
Superscript II	Invitrogen (Karlsruhe)
SYBR®Green Master Mix	Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA)

4.2.6 Längenstandards

SeeBlue® Plus2 Pre-Stained Standard	Invitrogen (Karlsruhe)
MagicMark™ XP Western Protein Standard (20-220 kDa)	Invitrogen (Karlsruhe)

4.2.7 Enzyme

Win Taq DNA Polymerase (1U/μl)	AG Winterpacht (im Haus)
GOLD Taq	Roche (Mannheim)
GC-rich Enzymmix	Roche (Mannheim)
RNaseOUT Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen (Karlsruhe)
SuperscriptIII Reverse Transkriptase	Invitrogen (Karlsruhe)

4.2.8 Antikörper

Maus-anti STX1A	Synaptic Systems (Göttingen) Monoklonaler Antikörper Konzentration 1:3000
Hase-anti HA	Abcam (Cambridge, UK) Polyklonaler Antikörper Konzentration 1:3000
Ziege-anti-Maus	Applied Biosystems by Life Technologies GmbH (Foster City, USA) Polyklonaler Antikörper Konzentration 1:30.000
Ziege-anti-Hase	Applied Biosystems by Life Technologies GmbH (Foster City, USA) Polyklonaler Antikörper Konzentration 1:30.000

4.2.9 Software, Datenbanken

EndNote X5	Thomson Reuters
Ensembl Variant Effect Predictor	http://www.ensembl.org/tools.html
ExonPrimer	http://ihg.helmholtz-muenchen.de/cgi-bin/primer/ExonPrimerUCSC.pl?db=hg19&acc=uc001qbx.2
GeneDistiller	http://www.genedistiller.org/
HomozygosityMapper	http://www.homozygositymapper.org/
Microsoft Office 2011	Microsoft Corporation
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
NCBI (National Center for Biotechnology Information)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/

OMIM (<i>Online Mendelian Inheritance in Man</i>)	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sites/entrez?db=PubMed
SeqMan™II	DNA Star Inc.
Sequencing Analysis 5.1.1	Applied Biosystems
UCSC (<i>University of California, Santa Cruz</i>)	http://genome.ucsc.edu/

4.3 Methoden

4.3.1 Patienten-DNA

4.3.1.1 Konzentrationsmessung

Die Messung von DNA und RNA erfolgte in einem Photometer, in welchem die Probe mit ultraviolettem Licht der Wellenlänge 260 nm belichtet wurde. Mithilfe eines Detektors wurde die transmittierende Strahlung gemessen. Die Konzentration der Probe wurde anhand des Lambert-Beer'schen-Gesetzes berechnet. Für diese Arbeit wurden die Konzentrationen von verschiedenen DNA-Proben mithilfe des *Infinite® 200 NanoQuant* von Tecan ermittelt. Die Proben wurden dafür auf eine Platte mit mehreren Messfeldern pipettiert. Nach dem Zudecken der Platte konnten die Proben in das Gerät geschoben werden. Anschließend berechnete das Gerät die genaue DNA-Konzentration unter Berücksichtigung des Lambert-Beer'schen-Gesetzes.

4.3.1.2 Genomweite Amplifikation der DNA

Um die Gefahr, die vorhandene Patienten-DNA aufzubrechen, zu umgehen, kann diese mithilfe des *GenomiPhi V2 DNA Amplification Kits* von GE Healthcare Life Science amplifiziert werden. Dies ist besonders relevant für die Patienten-DNA der syrischen Familien, da es mittlerweile aufgrund der sozialpolitischen Situation in Syrien schwierig ist, Patienten-Material von Syrien nach Deutschland liefern zu lassen. Gemäß dem Hersteller-Protokoll wurde empfohlen 1 µl der zu amplifizierenden DNA mit 9 µl Sample Puffer, welcher unspezifische Primer (randomisierte Hexamere) enthielt, in ein Tube zu geben, um es bei 95 °C für 3 min zu hitzedenaturieren. Damit die Primer an die DNA binden konnten, musste der Ansatz auf 4 °C abgekühlt werden. Danach wurden 10 µl Mastermix hinzugegeben.

Dieser setzte sich aus 1 µl Enzymmix und 9 µl Reaction Puffer, bestehend aus weiteren Primern und dNTPs, zusammen. Die isotherme Amplifikation erfolgte bei 30 °C innerhalb von 105 min und wurde durch Hitzeinaktivierung des Enzyms bei 65 °C beendet. Als letzten Schritt fand die Verdünnung mit 80 µl USF-Wasser statt. Um zu überprüfen, ob die Amplifikation erfolgreich war, wurde im Anschluss eine PCR mit validierten Primern durchgeführt.

4.3.2 Homozygotie-Kartierung

Die Homozygotie-Kartierung ist eine Methode, um Krankheitsloci aufzudecken (Lander and Botstein 1987). Diese kann mithilfe des online verfügbaren Programms *HomozygotieMapper* durchgeführt werden. Die SNP-Arrays der konsanguinen MR-Familien wurden anhand des online verfügbaren Programmes *HomozygotieMapper* analysiert (Seelow, Schuelke et al. 2009). Im Rahmen der Arbeit von PD Dr. med. Rami Abou Jamra wurde auf dieser Internet-Plattform ein Account angelegt, sodass alle Projekte unter diesem Account gespeichert werden konnten. Für die einzelnen Familien wurden jeweils die genomweiten Genotyp-Daten, die mit *Affymetrix* generiert wurden, auf die Internet-Plattform geladen. Zum Hochladen der SNP-Dateien wurde der verwendete Chip angegeben. Während des Importierens der Daten wurden alle Proben auf Homozygotie gescreent. Der jeweilige Genotyp wurde anhand eines Balkendiagrammes visualisiert. Ein Homozygotiescore von über 80% wurde rot dargestellt. Ein Beispiel hierfür zeigt Abbildung 9. Die verwendeten Proben wurden als Fälle oder Kontrollen gekennzeichnet.

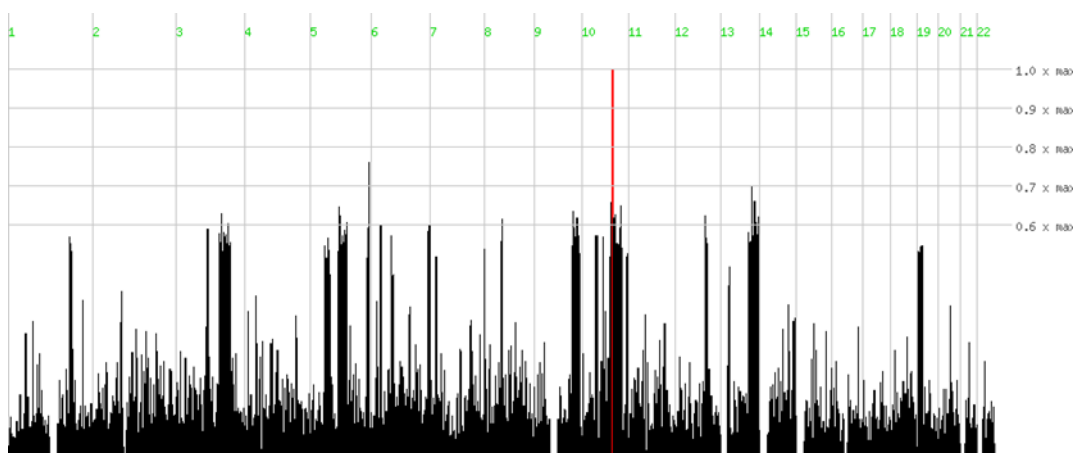


Abbildung 9: Ergebnis der Homozygotie-Kartierung der Familie MR141

4.3.3 Next Generation Sequencing (NGS)

Nachdem die Homozygotie-Kartierung durchgeführt wurde, fand die Exomsequenzierung der Patienten statt. Die DNAs wurden mit dem *SureSelect Human All Exon Kit version 5* (Agilent, Santa Clara, CA, USA) angereichert. Für diese Arbeit wurde hauptsächlich das *SOLiD (support oligonucleotide ligation detection)* System von Applied Biosystems (Santa Clara, CA, USA) benutzt. Die mit *SOLiD* produzierten Daten wurden mit der *LifeScope™* Software von Life Technologies (Foster City, CA, USA) verarbeitet. Die Exomsequenzierung läuft in nachfolgend beschriebenen Schritten ab. Nach dem Fragmentieren der DNA wird sie an Beads (Kügelchen) gebunden. Die Emulsions-PCR dient dazu, die Fragmente zu vervielfachen. Die DNA-Fragmente werden auf der Oberfläche von 1 µm großen, magnetischen Kügelchen amplifiziert. Bei dem nächsten Schritt werden alle Beads, die keine Fragmente gebunden haben, verworfen (Housby and Southern 1998). Das 3'Ende der DNA-Matrize ist so modifiziert, dass eine kovalente Anlagerung der DNA-Kügelchen an die Oberfläche einer beschichteten Glasscheibe innerhalb einer Durchflusszelle ermöglicht wird. Als nächstes bindet ein Sequenzier-Primer, der komplementär zu der Adaptersequenz ist, an die DNA-Matrize. Für die Sequenzierreaktion werden verschiedene fluoreszenz-markierte, oktamere Oligonukleotide benötigt (Anderson and Schrijver 2010). Die spezifischen, fluoreszierenden Oktamere lagern sich an die Matrize an und die DNA-Ligase verbindet das entsprechende Oktamer mit dem Primer. Die fünfte Base dieser Oktamere ist durch eine angehängte, fluoreszierende Gruppe markiert. Auf jede Ligation folgt eine Fluoreszenz-Detektion. Danach findet ein Regenerationsschritt statt, in dem die letzten drei Basen von dem gebundenen Oktamer, inklusive der Fluoreszenz-Gruppe, entfernt werden und gleichzeitig der verlängerte Primer für einen weiteren Ligationszyklus vorbereitet wird. Dieser Zyklus wird siebenmal wiederholt. Es wird der neu entstandene Strang entfernt und ein neuer Primer angelagert, der allerdings ein Nukleotid weniger besitzt als der erste Primer ursprünglich besaß. Es folgt erneut die Ligation der Oktamere wie zuvor für weitere sieben Durchgänge. Der neue Primer wird dann wiederum durch den nächsten ersetzt, der um ein weiteres Nukleotid verkürzt ist. Dieser gesamte Ablauf wiederholt sich fünfmal (Mardis 2008). Der Ablauf ist in Abbildung 10 dargestellt. Die Leselänge der fünf Primer beträgt jeweils bis zu 35 Basen (Anderson and Schrijver 2010). Nach Erhalt der Rohdaten werden diese mit der *BioScope* oder *LifeScope* Software von Life Technologies verarbeitet. Hierbei wird unter anderem die *Coverage* bestimmt. Diese liefert Information darüber, wie oft die entsprechende Position gelesen wurde. Die Software zeigt zudem an, wie oft das Referenzallel und wie oft das Novel Allel gelesen wurde und gleicht die Sequenzen mit Referenzsequenzen ab.

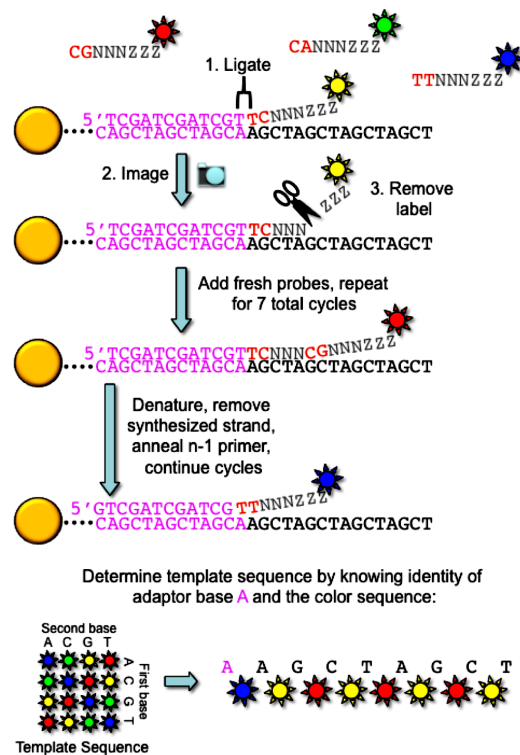


Abbildung 10: SOLiD, Ablauf der Sequenzierung mit Ligation (Anderson and Schrijver 2010)

Der Amplifikationsschritt für den Illumina Genome Analyser startet mit einer Illumina-spezifischen Bibliothek. Dies findet auf einer oligo-derivatisierten Oberfläche einer Durchflusszelle statt und wird von einem automatisierten Apparat durchgeführt. Dieser Apparat wird als Cluster-Station bezeichnet. Die Durchflusszelle erlaubt eine Brückenamplifikation von Fragmenten auf ihrer Oberfläche und nutzt die DNA-Polymerase, um mehrere DNA-Kopien zu produzieren. Mit dem Illumina System wird eine Sequenziermethode genutzt, in der alle vier Nukleotide simultan der Durchflusszelle zugefügt werden. Gleichzeitig wird die DNA-Polymerase hinzugefügt, um die Nukleotide in die oligo-geprimten Cluster-Fragmente einzufügen. Die Nucleotide tragen einen basen-spezifischen Fluoreszenzmarker und ihre 3-OH-Gruppe ist chemisch geblockt, sodass jeder Basen-Einbau einmal stattfinden kann. Nach jedem Basen-Einbau folgt die Bildgebung. Im Anschluss an diesen Schritt wird die blockierende Gruppe entfernt, sodass jeder Strang für einen weiteren Einbau durch die DNA-Polymerase bereit ist. Es entsteht eine durchschnittliche Stranglänge von 100 Basenpaaren. Die jeweiligen Schritte sind in Abbildung 11 veranschaulicht.

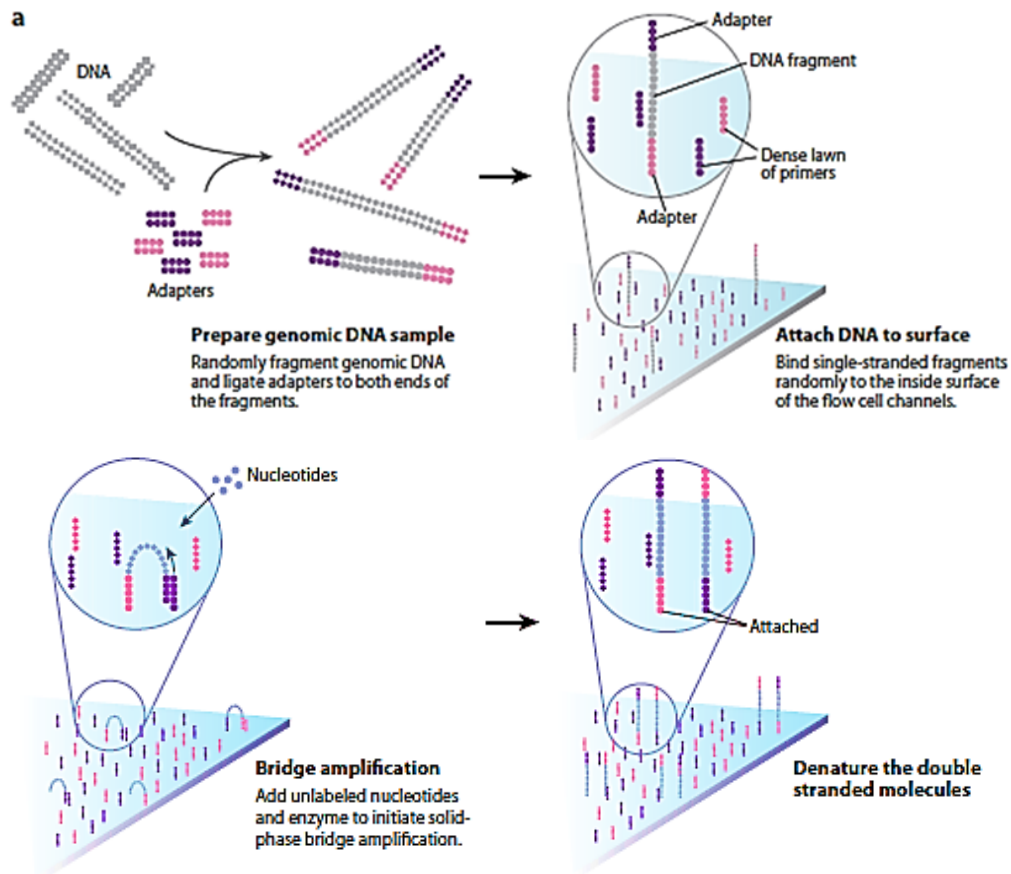


Abbildung 11; Illumina, Ablauf der Sequenzierung mit Brückenamplifikation (Mardis 2008)

Bei dem Index-Patenten der Familie MR141 fand die Paired-end-Sequenzierung mit dem *HiSeq2500 System* (Illumina, San Diego, CA, USA) statt. Die Daten wurden dann mit der *HiSeq instrument control Software* (HCS) verarbeitet. Der Leseabgleich erfolgte jeweils mit *bwa mem* (version 0.7.8) anhand der human genome version hg19 in der NCBI Datenbank (National Center for Biotechnology Information, USA) (Li et al, 2009). Somit konnten bekannte Polymorphismen durch *dbSNP* (*dbSNP* Versionen 132 und 135, NCBI) erkannt werden. Unter Verwendung von *GATK Haplotype Caller*, *GATK Unified Genotyper* (beide version 3.1) und *SNVer* (version 0.5.3) wurden Single-Nukleotid Varianten, Insertionen und Deletionen (InDels) ermittelt (McKenna, Hanna et al. 2010, Wei, Wang et al. 2011).

4.3.4 Filterungsschritte

Um die Anzahl der interessanten Varianten von der großen Anzahl an ermittelten Varianten auf eine übersichtliche Menge zu reduzieren, mussten bestimmte, selbst entwickelte Filterungsschritte durchgeführt werden.

4.3.4.1 Filterung bei bekannter Konsanguinität ohne Kandidatenregionen

Als erster Schritt erfolgte die Grobfilterung. Nachdem alle SNPs aus der Datenbank importiert worden waren, wurden zunächst alle funktionell relevanten Varianten ausgewählt. Dazu zählten alle Varianten, die sich in den Exons befanden, alle Spleiß-Varianten und UTR. Synonyme Varianten wurden zunächst ausgeschlossen. Unter diesen funktionell relevanten Varianten wurden die seltenen Varianten ausgesucht. Dies erfolgte, indem man nach der Häufigkeit, wie oft diese Variante bereits in Datenbanken beschrieben wurde, urteilte. So wurden jene ausgewählt, die bei ESP (*NHLBI Go Exome Sequencing Project*), eine Datenbank mit 5400 Exomen für alle Populationen mit einer Häufigkeit von unter 0,1 % ($ESP < 0,001$) oder bei TG2012feb, 1000Genomes February 2012 (Abecasis, Auton et al. 2012), von unter 1 % vorkamen ($TG2012feb < 0,01$). Zusätzlich wurden alle Varianten aussortiert, die häufiger als fünfmal in der hauseigenen Datenbank, sogenannte „Inhouse“-Kontrollen, beschrieben wurden. Wurden hiervon die MR-Kontrollen ausgeschlossen, wurden alle Varianten aussortiert, die häufiger als dreimal beschrieben wurden ($inhouse < 6/$ außer $MR < 4$). Wenn alle diese Kriterien erfüllt waren, wurden anschließend alle Varianten aussortiert, die in allen drei Datenbanken beschrieben wurden, ungeachtet ihrer Häufigkeit.

Im nächsten Schritt folgte die Filterung bezüglich der Qualität. Hierbei richtete man sich nach den Zahlen von Novel- und Referenz-Allel. Die Zahl des Novel-Allels musste mindestens dreimal so hoch sein wie die Zahl des Referenz-Allels. Bei niedrigen Zahlen mussten weitere Kriterien herangezogen werden (in silico-Analysen, Datenbanken).

Zuletzt wurden die interessanten Varianten gefiltert. Diese waren keinmal bei ESP oder TG2010feb und maximal dreimal in der hauseigenen Datenbank beschrieben. Sie wurden in mindestens zwei in silico-Programmen als pathogen beurteilt. Mittels Literaturrecherche wurde die Funktion des zu untersuchenden Genes ermittelt. Von großem Interesse waren hierbei jene Gene, die vermehrt in neuronalem Gewebe exprimiert wurden oder bereits mit Krankheiten in Verbindung gebracht wurden, die das Nervensystem oder die kognitive Leistungsfähigkeit betrafen. Gene, die eine Rolle in Stoffwechselprozessen spielten, wurden

in Betracht gezogen, da wie bereits zuvor erwähnt, viele Stoffwechselkrankheiten mit mentaler Retardierung einhergehen können. Zur Literaturrecherche wurden verschiedene Datenbanken verwendet. Hierzu zählten unter anderem OMIM, UCSC und PubMed. Einen Überblick über die einzelnen Filterungsschritte gibt Abbildung 12.

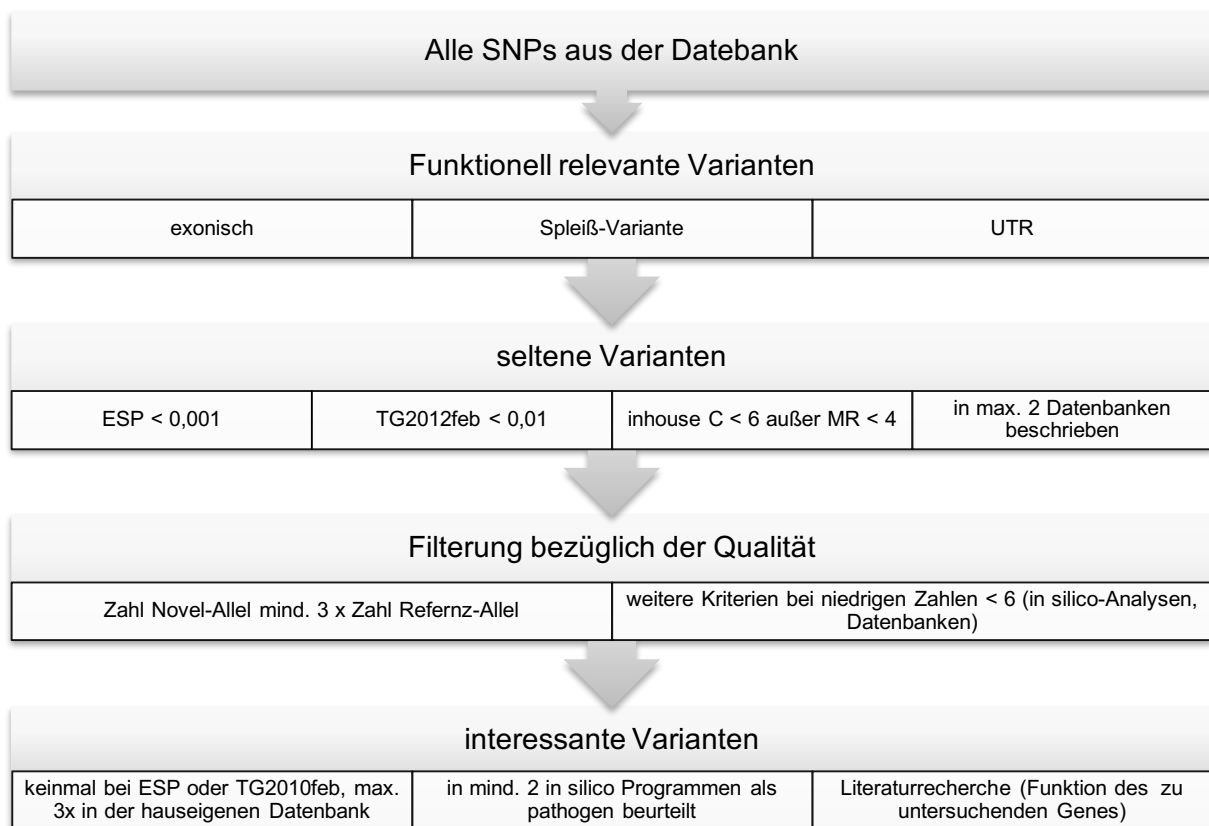


Abbildung 12: Filterung bei bekannter Konsanguinität ohne Kandidatenregionen

4.3.4.2 Filterung bei bekannter Konsanguinität mit Kandidatenregionen

Die Filterung bei bekannter Konsanguinität mit Kandidatenregionen lief nach denselben Kriterien ab, wie die Filterung bei bekannter Konsanguinität ohne Kandidatenregion. Als zusätzlichen Schritt wurden zu Beginn der Feinfilterung nur jene Varianten gewählt, die sich in den zuvor ermittelten Kopplungsregionen befanden.

4.3.4.3 Filterung ohne bekannte Konsanguinität und ohne Kandidatenregionen

Nach Filterung und Analyse der interessanten Gene blieben einige Familien ungeklärt, da sich bei diesen Familien keine der zuvor gefundenen Varianten bestätigen ließ. Auffällig hierbei war, dass vor allem bei jenen Familien keine mögliche krankheitsursächliche Variante gefunden wurde, bei denen keine Konsanguinität bekannt war. Dies ist vermutlich auf die Art der Filterung zurückzuführen, da sie auf autosomal rezessiven Kriterien aufgebaut ist. Aus diesem Grund mussten bei diesen Familien neben einem autosomal rezessiven Erbgang zusätzlich autosomal dominante Erbgänge und autosomal rezessive Erbgänge mit compound heterozygoten Varianten in Erwägung gezogen werden. Aus diesem Grund wurde bei diesen Familien eine erneute Filterung durchgeführt.

Zunächst wurde erneut nach autosomal rezessiv vererbten Varianten mit strengeren Kriterien gesucht. Hierbei wurden alle Varianten verworfen, bei denen die Referenz häufiger als dreimal gelesen wurde. Es blieben jene, bei denen das Verhältnis Referenz-Allel zu Novel-Allel mindestens 1:4 war. Alle UTR und ncRNA wurden aussortiert. Bei der Filterung von autosomal dominanten Varianten wurden jene gewählt, die exonische oder Spleiß-Varianten waren, weder bei ESP, noch bei TG2012feb und in der hauseigenen Datenbank höchsten einmal vorhanden waren. Die Spleißvarianten, die mehr als zwei Nukleotide vor oder nach dem Exon lagen, wurden aussortiert. Alle in silico-Programme mussten für diese Variante einen krankheitsverursachenden Effekt voraussagen und sie musste sich in einer hochkonservierten Region befinden. Zusätzlich bestand die Möglichkeit eines autosomal rezessiven Erbganges mit compound heterozygoten Varianten. Hierbei musste zunächst nach Varianten in demselben Gen, allerdings an unterschiedlichen Stellen auf dem jeweiligen Allel gesucht werden. Diese Tatsache war oft innerhalb der verschiedenen *MUC*- und *HLA*-Gene vorzufinden. Dies spielte jedoch im Rahmen dieser Forschungsarbeit keine Rolle, da diese Gene nicht in Verbindung mit der Funktion von neuronalem Gewebe gebracht werden konnten. Aus diesem Grund wurden diese Varianten aussortiert. Es wurden jene Varianten gewählt, die keinmal in der Datenbank TG2012feb und nur unter 1 % in ESP vorhanden waren. Bei allen gefilterten Varianten erfolgte danach erneut die Literaturrecherche und schließlich die Validierung und Segregierung mittels Sanger-Sequenzierung. Abbildung 13 veranschaulicht die jeweiligen Filterungsschritte.

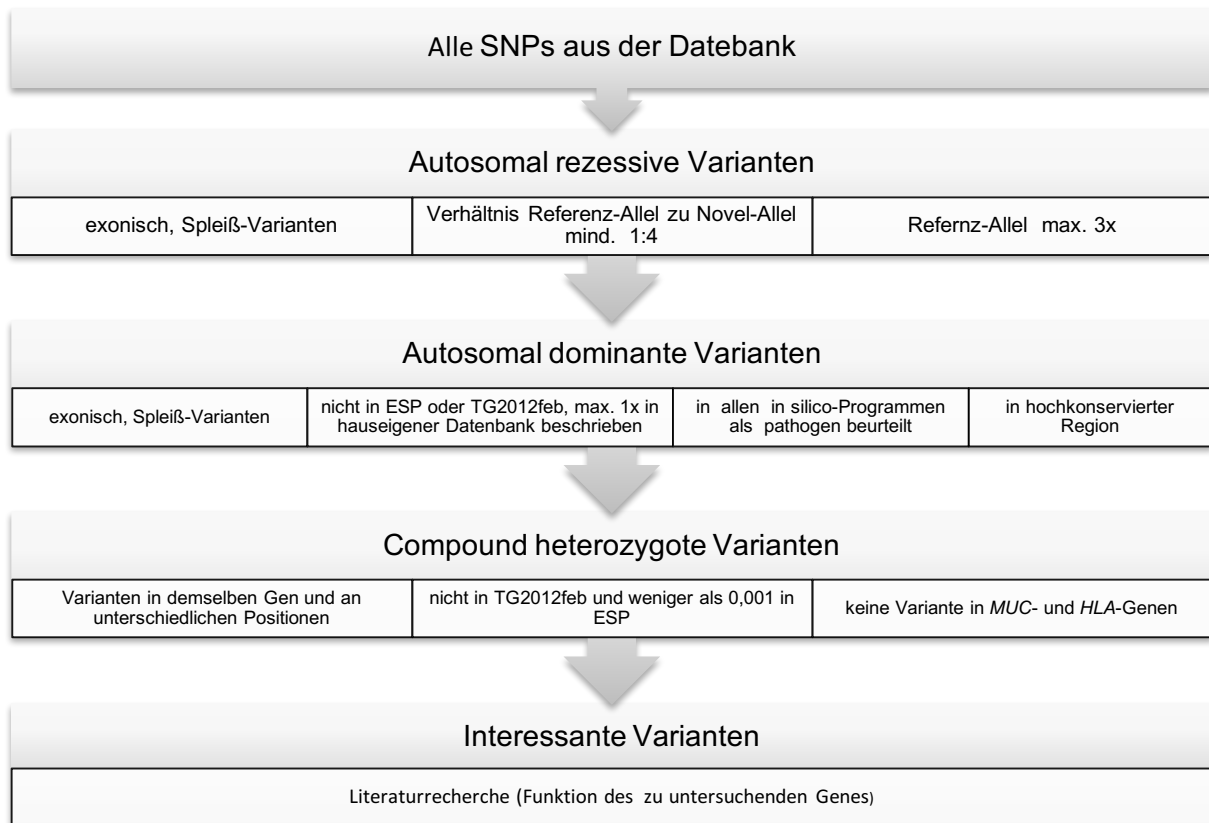


Abbildung 13: Filterung ohne bekannte Konsanguinität ohne Kandidatenregionen

4.3.5 Expressionsanalyse mittels qPCR (Real Time Quantitative PCR)

4.3.5.1 Extraktion der RNA aus lymphoblastoiden Zelllinien

Zur Expressionsanalyse wurde cDNA (intronfreie komplementäre DNA) benötigt. Hierzu wurde RNA aus lymphoblastoiden Zelllinien mithilfe des *RNeasy® Mini Kits* von Qiagen nach Herstelleranweisung extrahiert und anschließend in cDNA umgeschrieben. Bei der RNA-Extraktion wurde das Medium mit den Zellen in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt und für 10 min bei 4 °C und 2000 rpm abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 10 ml PBS resuspendiert. Daraufhin wurde es erneut für 10 min bei 4 °C und 2000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 2 ml PBS resuspendiert und auf zwei 2 ml Reaktionsgefäße verteilt.

4.3.5.2 Reverse Transkription

Nach der RNA-Isolierung konnte die Herstellung der cDNA mittels reverser Transkription durch retrovirale Reverse Transkriptase stattfinden. Zuerst musste hierfür die Sekundärstruktur der RNA durch Denaturierung beseitigt und danach die RNA mit Primern (randomisierte Hexamere; 2,5 mM), Puffer, dNTPs (1 mM), RNase-Inhibitor (24 U) und Reverser Transkriptase (300 U) inkubiert werden. Hierfür wurde *SuperscriptIII* von Invitrogen benutzt.

4.3.5.3 qPCR (Real Time Quantitative PCR)

Für die qPCR wurden spezielle Primer designt. Um das Expressionsmuster der heterozygoten Mutationsträger untersuchen zu können, wurden Primer für den Wildtyp und für die zu untersuchende Variante designt. Diese mussten bestimmte Kriterien erfüllen. Die Primer mussten sich in zwei benachbarten Exons befinden. Das PCR-Produkt musste eine Länge zwischen 80 und 120 bp betragen. Die Primer mussten 18 bis 22 bp lang sein. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 58 °C und 60 °C liegen. Der Temperaturunterschied zwischen den einzelnen Primern eines Primerpaares musste weniger als 1 °C betragen. Am 3' Ende eines Primers sollten sich Guanin oder Cytosin befinden. Die Primeroptimierung erfolgte mittels verdünnter cDNA und einem bereits vorhandenem, gut funktionierendem Primer, in diesem Fall GAPDH. Für die PCR wurde die Wintaq-Polymerase verwendet. Danach wurde die Gelelektrophorese mit 2,5 %igem Agarose-Gel bei 110 V und 400 mA für 30 min durchgeführt. Nach einer erfolgreich durchgeführten PCR erfolgte die qPCR. Zunächst wurde der Mastermix hergestellt. Dieser setzte sich aus den Primern, Wasser und dem Sybgreen-Mix zusammen. Hierzu wurde der *SYBR® Select Master Mix* von Thermo Fisher Scientific verwendet. Der Mastermix wurde für 5 s vorgetext und dann abzentrifugiert. Es wurden 60 µl des Mastermixes und 10 µl cDNA in jedes Well einer 96-Well Platte gegeben. Nach dem Mischen wurden pro Well 15 µl auf eine 384-Well Platte übertragen. Nach dem Abzentrifugieren bei 4000 rpm wurde das Quantstudio mit der 384-Well Platte beladen. Mithilfe des qPCR-Programmes konnten am Computer die Parameter eingestellt werden und der Lauf gestartet werden. Zur gleichen Zeit konnten die Ergebnisse am Computer verfolgt werden. Es wurden drei endogene Kontrollen und sechs Kontroll-cDNAs verwendet. Die Primer der endogenen Kontrollen wurden von der AG Zweier hergestellt und getestet und durften dankenswerterweise für den vorliegenden Versuch benutzt werden. Als endogene Kontrollen wurden B2M, TBP, HPRT verwendet. Das Programm des Quant Studios lief in mehreren Zyklen ab. Der erste Zyklus wurde für 2 min auf eine Temperatur

von 50 °C erhitzt, dann für 10 min auf 95 °C gehalten. Der zweite Zyklus wurde für 15 s auf 95 °C und für eine Minute auf 60 °C erhitzt. Der zweite Zyklus wurde fünfzigmal wiederholt. Eine Schmelzkurve wurde erstellt, indem für 15 s auf 95 °C, dann für eine Minute auf 60 °C und danach wiederum für 15 s auf 95 °C geheizt wurde. Diese Zyklen liefen bei unterschiedlichen Verdünnungen der zu amplifizierenden Substanz ab. Dies wird in Abbildung 14 am Beispiel von PGK1 veranschaulicht.

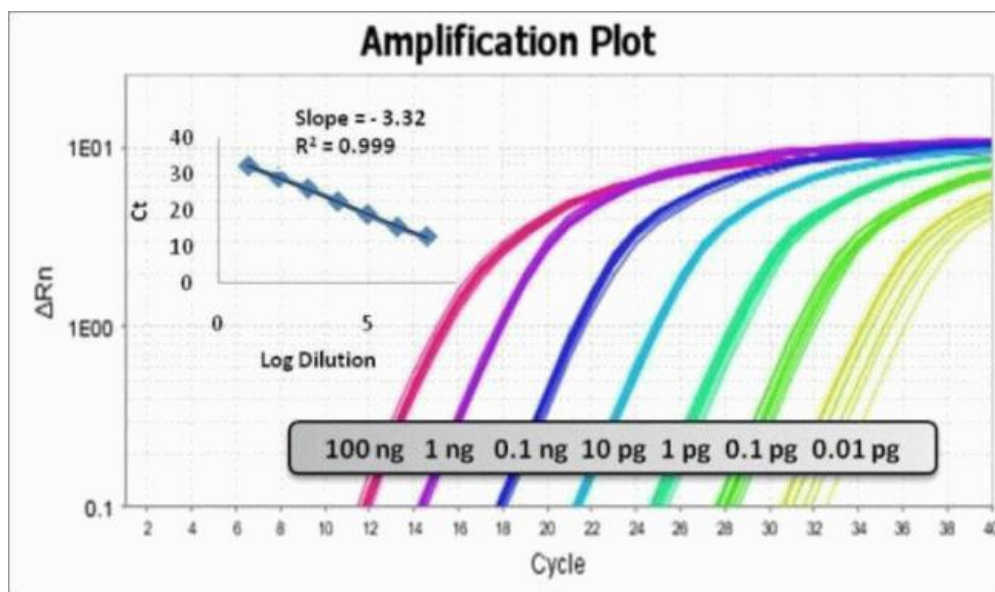


Abbildung 14: Amplifikationsplot am Beispiel von PGK1 mit humaner cDNA (Thermo Fisher 2015)

4.3.6 Western Blot

4.3.6.1 Proteinextraktion

Um die Proteine anhand des Western Blots beurteilen zu können, mussten diese zuvor aus den Zellen extrahiert werden. Verwendet wurden die Zellen folgender Familienmitglieder der Familie MR39: MR39-03, MR39-08, MR39-09, MR39-10. Hierzu mussten zunächst die Zellen in 15 ml Falcons geerntet werden. Daraufhin wurden sie 10 min lang bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert und ihr Überstand danach verworfen. Die Zellen wurden dann mit 10 ml PBS gewaschen und ein weiteres Mal 10 min bei 2000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Erneut wurde der Überstand verworfen. Danach wurden die verbleibenden Pellets in 2 ml PBS gelöst und jeweils 1 ml davon in ein Eppendorf-Tube überführt. Im Anschluss wurden die gefüllten Tubes 5 min bei 1500 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der dadurch entstandene

Überstand wurde abgezogen. Die Zell-Pellets konnten entweder bei -80 °C gelagert oder direkt zur Proteinextraktion verwendet werden.

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen in einem Lysepuffer gelöst, der sich aus 450 µl Lysepuffer und 50 µl Proteaseinhibitor zusammensetzte. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 20 min bei 4 °C auf einem Roller. Um nun die Viskosität der Lösung zu verringern, wurde die DNA mithilfe einer Kanüle geschert. Weiterhin wurde die Proteinkonzentration anhand der Bradford-Messung bestimmt. Die Zelltrümmer wurden abschließend für 15 min bei 4 °C und 2000 rpm abzentrifugiert und die Proteine bei -80 °C gelagert.

4.3.6.2 Western Blot

Um in dieser Arbeit die unterschiedliche Expression des Wildtyps und des mutierten Syntaxin1a zu untersuchen, wurde der Western Blot als geeignetes Experiment gewählt. Dieses Experiment erstreckte sich über zwei Tage. Am ersten Tag erfolgte der Gel-Lauf. Hierzu musste das Proteinlysate mit dem LDS Sample Puffer, DTT und Wasser 5 min lang bei 70 °C inkubiert werden. Um nun die Proteinlysate aufzutrennen, musste ein Tris-Bis-Gel mit diesen Lysaten beladen werden. Hierzu wurden die innere Kammer mit MOPS-Puffer und Antioxidans und die äußere Kammer mit dem restlichen MOPS-Puffer befüllt. Vor dem Beladen der Geltaschen wurden diese zuerst gespült. Danach wurden die Taschen mit den Standards See Blue und Magic Mark und den vorbereiteten Proteinlysaten befüllt. Leere Taschen wurden mit dem LDS Sample Puffer beladen. Durch Anlegen einer Spannung von 200 V für 75 min wurden die Proteinlysate auf dem Gel getrennt. Als nächsten Schritt mussten die aufgetrennten Proteinlysate von dem Tris-Bis-Gel auf eine Nitrocellulose-Membran transferiert werden. Zunächst wurden die Schaumpads und Filterpapiere (Whatman-Papier der Firma Invitrogen) in Transferpuffer eingeweicht und die Membran so zugeschnitten, dass sie deckungsgleich mit dem Tris-Bis-Gel war. Danach wurde der Blot entsprechend Abbildung 15 aufgebaut. Nachdem die Luftblasen gründlich ausgestrichen wurden, konnte der Transfer in der Kammer angebracht werden. Die Kammer wurde mit Eiswasser aufgefüllt. Danach folgte der Blot bei 30 V für 2 h. Um zu überprüfen, ob der Blot erfolgreich war, wurde die Übertragung der Proteine auf die Membran mithilfe der Ponceau-Färbung kontrolliert. Hierbei zeigten sich regelmäßige pinkfarbene Banden, die auf ein positives Ergebnis hindeuteten. Um mögliche unspezifische Bindestellen für Antikörper zu blockieren, wurde die Membran für mindestens 2 h bei 4 °C mit 5 % Magermilch in TBS-T inkubiert. Darauf folgte das Auftragen von Primärantikörpern.

Es wurden anti-STX1A-Antikörper (monoclonal, Maus) in der Verdünnung 1:3.000 und anti-H3 Histone-Antikörper (polyclonal, Hase) in der Verdünnung 1:3.000 mit 5 % Magermilch in TBS-T dazugegeben und über Nacht bei 4 °C auf einem Roller inkubiert. Am zweiten Tag des Experiments erfolgte das viermalige Waschen der inkubierten Membran für jeweils 15 min mit TBS-T. Im Anschluss daran wurden die Sekundärantikörper aufgetragen. Die gewaschene Membran wurde mit dem polyklonalen Goat-anti-mouse-Antikörper in der Verdünnung 1:30.000, dem polyklonalen Goat-anti-rabbit-Antikörper in der Verdünnung 1:30.000 und 5 % Magermilchpulver in TBS-T inkubiert. Danach lief erneut das viermalige Waschen der inkubierten Membran für jeweils 15 min mit TBS-T ab. Um das Ergebnis des Blots sichtbar zu machen, konnten die Proteine nun durch Chemolumineszenz (*enhanced chemoluminescence system*, ECL) nachgewiesen werden. Es wurde dafür jeweils 1 ml der beiden Lösungen (*SuperSignal®West Femto Maximum Sensitivity Substrate*) auf die Membran aufgetragen und diese danach für 5 min inkubiert. Zur Entwicklung wurde die Membran in einer Klarsichtfolie verpackt und in der Dunkelkammer mit einem ECL-Film bedeckt. Nach der Belichtung wurde der Film zuerst in Entwicklerlösung gegeben, danach in Wasser gelegt und zuletzt in Fixierlösung fixiert. Als Alternative zur Entwicklung wurde zusätzlich der Blots scanner verwendet. Hierzu wurde je 1 ml der beiden Lösungen auf den Blots scanner pipettiert, die Membran aufgelegt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Danach erfolgte das Scannen für 12 min bei *High Quality*. Die entstandenen Bilder konnten am Computer bezüglich Helligkeit und Kontrast bearbeitet werden. Der Aufbau des Blots ist in Abbildung 15 dargestellt.

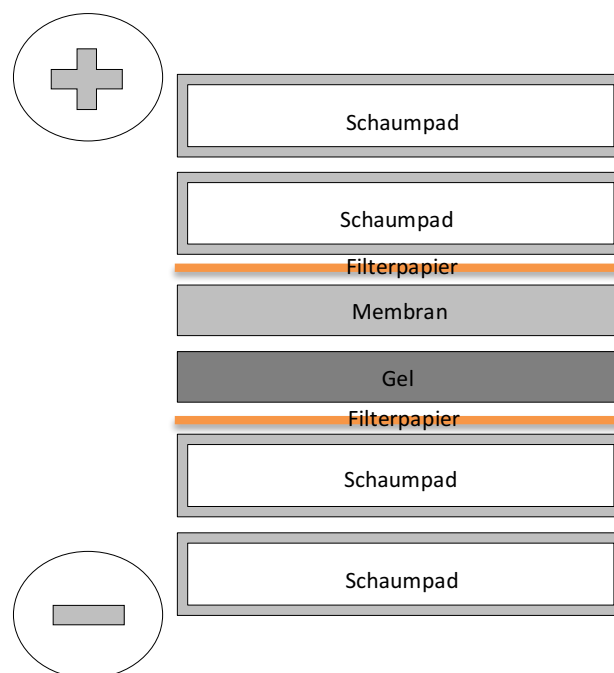


Abbildung 15: Aufbau des Blots

4.3.7 Primerdesign, PCR, Elektrophorese, PCR-Aufreinigung

4.3.7.1 Primer3

Primer3 ist ein im Internet verfügbares Programm, das bei dem Design von Primern behilflich ist. Hierzu werden einige Parameter in diesem Programm festgelegt, sodass daraufhin nach den passenden Primern gesucht wird. Als DNA-Typ ist zunächst „*Human*“ anzugeben. Die Produktlänge liegt zwischen 200 bp und 800 bp. Einer der beiden Primer sollte höchstens 300 bp von der Variante entfernt liegen. Die Wiederholung von einzelnen Basen direkt nacheinander sollte nicht eine Anzahl von drei Basen überschreiten. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 59 °C und 62 °C liegen. Das BC-Clamp sollte zwei betragen und in der Richtung des 3' Endes liegen. Die minimale Primergröße liegt bei 17 bp.

4.3.7.2 Manuelles Primerdesign

War die Primersuche mittels *Primer3* erfolglos, bestand die Möglichkeit, auf das manuelle Primerdesign zurückzugreifen. Für das manuelle Erstellen von Primern gab es Kriterien zu beachten. Empfehlenswert ist eine Primergröße zwischen 19 bp und 25 bp, möglich ist eine Größe zwischen 18 bp und 30 bp. Das AT/GC-Verhältnis sollte bei 40-60 % liegen. Zu vermeiden sind Poly-A oder lange GC-Bereiche, da es sonst zu Fehlhybridisierung bzw. Mispriming und Frameshifts kommen kann. Die Schmelztemperatur sollte zwischen 55 und 63 °C liegen. Hierbei ist darauf zu achten, dass beide Primerpaare eine ähnliche Schmelztemperatur besitzen. Die Sequenz muss möglichst spezifisch für das gesuchte Amplikon sein. Am 3'Ende sollten sich ein bis zwei, höchstens drei G/C-Basen, befinden. Am 5'Ende sollten vor allem A/T-Basen sein. Sie sollten kaum komplementär zueinander am 3'Ende sein, da es sonst zu einer verminderten Amplifikationseffizienz kommt. Dies lässt sich anhand von in silico-Analysen kontrollieren. Die manuell designten Primer können im Anschluss mittels in silico-PCR bei UCSC getestet werden. Hierbei ist darauf zu achten, dass die Primerpaare nicht auf SNPs und nicht komplett oder überwiegend in Repeatregion liegen. Erfüllen die Primer alle Kriterien, können sie bestellt werden.

4.3.7.3 Lösen und Etablieren der Primer

Die designten Primer wurden vom Hersteller in pulverisierter Form als Pellet geliefert und gemäß Herstellerangaben gelöst. Die lyophilisierten Primer wurden vor dem Öffnen abzentrifugiert und mit frischem USF-Wasser auf eine Konzentration von 100 pmol/µl verdünnt. Dies wird als Primer-Stock bezeichnet. Der Primer-Stock wurde vorgetext, abzentrifugiert und danach 1 h auf den Schüttler gelegt. Im Anschluss daran erfolgte die Primer-Verdünnung auf eine Konzentration von 10 pmol/µl. Der Primer-Stock konnte daraufhin in einer Kryobox bei - 20 °C gelagert werden. Die verdünnten Primer wurden im Kühlschrank bei 4 °C gelagert. Das Etablieren der Primer erfolgte mittels verschiedener Enzyme in einer festgelegten Reihenfolge und nach bestimmten Kriterien, wie nachfolgend beschrieben wird.

4.3.7.4 PCR

Anhand der PCR können ausgewählte Nukleotidsequenzen exponentiell vervielfacht werden. Demnach führen n Zyklen zu einer 2ⁿ-fachen Anreicherung (Saiki, Gelfand et al. 1988). Abhängig von der Beschaffenheit der Nukleotidsequenz können unterschiedliche Polymerasen verwendet werden. Zunächst erfolgte stets die PCR unter Verwendung der hauseigenen DNA-Polymerase, der Wintaq-Polymerase. Bei negativen Ergebnissen konnten weitere Optimierungsschritte durchgeführt werden. So wurden Betain und DMSO zugegeben, um eine höhere Spezifität zu erreichen. Blieben auch diese Versuche ohne Erfolg, konnten weitere Protokolle mit anderen Polymerasen (*invitrogen*® *Taq DANN Polymerase*, *ABI AmpliTaq Gold*) oder bei GC-reichen Fragmenten das *GCRich PCR System* (Roche) verwendet werden.

4.3.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um zu überprüfen, ob nach abgelaufener PCR die gewünschten PCR-Produkte entstanden waren, konnte eine Gelelektrophorese durchgeführt werden. Hierzu musste man zunächst Agarose-Gel herstellen. Die Agarose wurde mit 1x-TBE-Puffer in der gewünschten Konzentration vermischt und in einer Mikrowelle zum Aufkochen gebracht. Nach dem Abkühlen im Wasserbad bei 60 °C wurde EtBr dazugegeben (2 µl für 100 ml Gel). Der Gelträger wurde zusammen mit dem getrockneten Gel in eine Elektrophoresekammer gelegt

und die Kammer mit Laufpuffer (1x-TBE-Puffer) befüllt. Die Taschen des Gels wurden dann mit den Proben und dem DNA-Standard aufgefüllt. Der Lauf dauerte 25 bis 35 min bei 100-120 V und 400 mA. Danach wurde das Gel auf einem UV-Transluminator positioniert und das Ergebnis fotografiert und dokumentiert.

4.3.7.6 Magnetische Aufreinigung der PCR-Produkte

Nach abgelaufener PCR und Gel-Elektrophorese wurden die PCR-Produkte aufgereinigt. Hierzu wurden Puffer, unverbrauchte dNTPs, Primer und die Polymerase anhand des Pipettierroboters *Biomek®NX* (Beckman Coulter) und dem *AMPure® Kit* (Agencourt) entfernt. Zunächst wurden die PCR-Fragmente durch *magnetic beads* gebunden und die zu entfernenden Materialien mit 75 %-igem Ethanol gewaschen. Dann wurden die PCR-Fragmente mit Waschpuffer von den *magnetic beads* gelöst, auf eine andere Platte überführt und je nach Bedarf mit Wasser verdünnt. Für die AMPure-Aufreinigung standen zwei installierte Programme zur Verfügung, die mit *norm* oder *no dilution* bezeichnet wurden. *Norm* stellte das Standard-Programm dar, während *no dilution* speziell für schwache PCR-Produkte verwendet wurde, da in diesem Fall der letzte Verdünnungsschritt entfiel (Coulter 2015). Der Prozess der Aufreinigung wird in Abbildung 16 veranschaulicht.

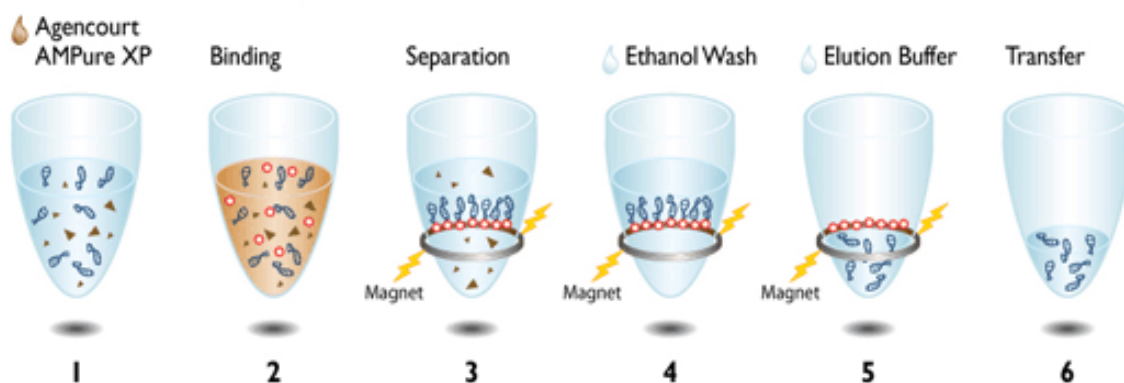


Abbildung 16: Prozess Übersicht der AMPure Aufreinigung (Coulter 2015)

4.3.8 Sanger-Sequenzierreaktion, Aufreinigung, Analyse

4.3.8.1 Sequenzierungsreaktion

Nach der Aufreinigung der PCR-Fragmente erfolgte die Sequenzierreaktion. Dazu wurden die Fragmente mit Primern und dem *BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing RR-100 Kit* (ABI) in der Sequenzierungsreaktion angesetzt. Das Kit bestand aus einem Sequenzierpuffer und einem Mix aus Polymerase, dNTPs und ddNTPs (Didesoxynukleosid-Triphosphate), die je nach Base mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert waren. Die ddNTPs führten zu einem Kettenabbruch, da hieran keine weiteren Nukleotide angebracht werden konnten. Demzufolge entstand eine Mischung unterschiedlich langer Fragmente. Durch Sanger wurde diese Methode als Kettenabbruchsynthese etabliert (Sanger, Nicklen et al. 1977). Abbildung 17 zeigt einen Ausschnitt der Sequenzierung der Familie MR141.

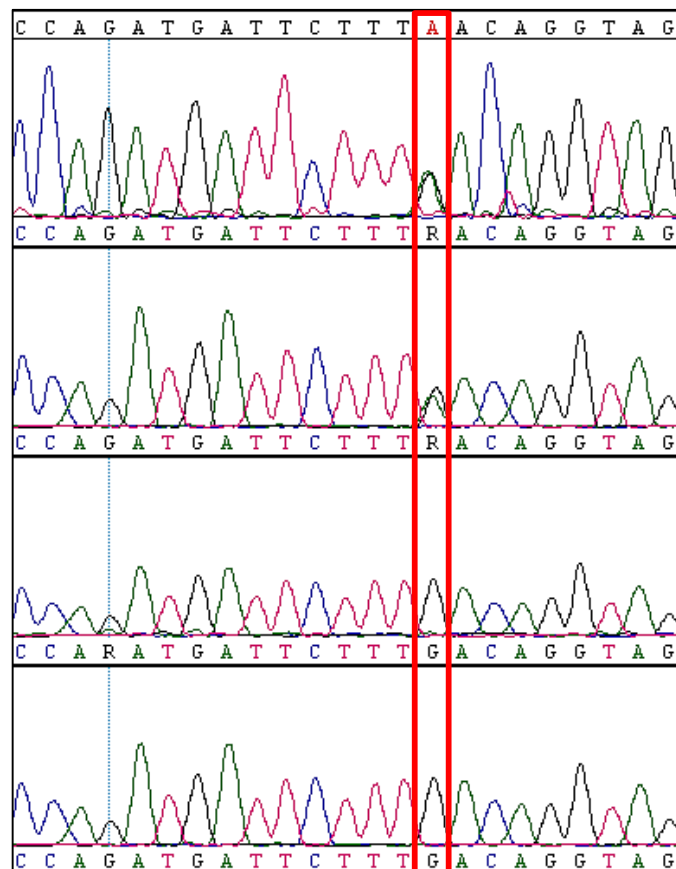


Abbildung 17: Sequenzierung der Variante c.T545C:p.L182S in PTEN bei Eltern und Patienten (von oben nach unten: MR141-02=f, MR141-03=m, MR141-01=l, MR141-04)

4.3.8.2 Magnetische Aufreinigung der Sequenzierungsprodukte

Nach der Sequenzierungsreaktion erfolgte erneut eine Aufreinigung. Wie bereits bei der PCR-Aufreinigung wurden Verunreinigungen entfernt. Bei diesem Schritt wurde jedoch das *CleanSEQ® Kit* (Agencourt) und 85 %-iger Ethanol verwendet (Coulter 2015).

4.3.8.3 Automatische Sequenzierung im ABI 3730 DNA Analyser

Mithilfe der Kapillarelektrophorese wurden letztendlich die aufgereinigten Sequenzierungsprodukte im ABI 3730 DNA Analyser nach ihrer Größe getrennt. Ein Laser regte die ddNTPS an, wodurch abhängig von der Base eine Fluoreszenz mit variabler Wellenlänge emittiert wurde. Diese Fluoreszenz wurde detektiert, um damit ein Chromatogramm zu erstellen. Dieses stellte die DNA-Sequenz dar. In der Regel liefen zwei Reaktionen mit je einem forward und einem reverse Primer ab, da meist die ersten 50 Basen und auch die Basen ab einer Produktlänge von 600 bp fehlerhaft ausgewertet wurden.

4.3.8.4 Auswertung der Ergebnisse mit SeqMan™II

Das Programm *SeqMan™II* ermöglichte es, die Sequenzen mit der Referenzsequenz hg19 aus UCSC zu vergleichen. Dadurch konnten schnell und unkompliziert mittels der Blat-Funktion von UCSC bereits vorhandene SNPs oder InDels, die mit rs-Nummer registriert waren, erkannt werden. Lagen nicht annotierte Varianten vor, konnten diese auf ein krankheitsverursachendes Potenzial mithilfe von in silico-Analysen untersucht werden.

4.3.9 In silico-Analyse von gefundenen Varianten

Wie bereits zuvor erwähnt, spielen die Ergebnisse der in silico-Analysen eine wichtige Rolle bei der Wahl der Varianten, die im Anschluss mittels Sanger Sequenzierung untersucht werden sollen. Hierfür stehen verschiedene in silico-Programme zur Verfügung, die nun im Einzelnen erläutert werden. Anzumerken ist für jedes dieser Programme, dass keine komplette Fehlerfreiheit besteht und es somit gegebenenfalls auch zu falschen Annahmen kommen könnte.

4.3.9.1 MutationTaster

Der *MutationTaster* ist ein Internetprogramm mit dessen Hilfe man sowohl intronische als auch exonische Sequenzvarianten beurteilen kann. Es liefert eine Aussage darüber, ob die Variante krankheitsverursachend sein könnte (Schwarz, Rodelsperger et al. 2010). Das Programm arbeitet mithilfe des *Bayes-Klassifikators*. Im Rahmen eines Testsatzes von über 40.000 bekannten pathogenen Varianten und über 500.000 Polymorphismen wurde der *Bayes-Klassifikator* getestet und trainiert.

4.3.9.2 SIFT

Durch das Programm *SIFT* wird die untersuchte Variante mit homologen Sequenzen verglichen. Zusätzlich wird der Konservierungsgrad berücksichtigt (Ng and Henikoff 2003). Im Gegensatz zum *MutationTaster* kann *SIFT* lediglich exonisch gelegene Varianten analysieren. Ensembl erstellte den *Variant Effect Predictor (VEP)*. Mithilfe des *VEPs* können die Analysen mit *SIFT* durchgeführt werden (McLaren, Pritchard et al. 2010).

4.3.9.3 PolyPhen2

Auch *PolyPhen2* (polymorphism phenotyping) analysiert lediglich exonische Varianten. Neben des Konservierungsgrades werden zusätzliche Effekte auf Struktur und Funktion des Proteins beachtet (Ramensky, Bork et al. 2002). Als weitere Parallele zu *SIFT* benutzt *PolyPhen2* ebenfalls den *Variant Effect Predictor (VEP)* von Ensembl (McLaren, Pritchard et al. 2010).

5 Ergebnisse

5.1.1 Familie MR134

Das Exom des Patienten MR134-01 wurde angereichert und sequenziert. Dabei wurden 56.146 SNVs und 3.404 InDels identifiziert. Durch Filterung der Daten blieben insgesamt fünf homozygote single nucleotide variants (SNVs) und eine homozygote Deletion, die laut in silico-Analysen krankheitsursächlich hätten sein können und sich an einer hochkonservierten Stelle befanden. Diese Varianten wurden mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Keine dieser Varianten ließ sich bestätigen. Es handelte sich um methodisch bedingte Artefakte.

Daher wurden erneute Filterungsschritte hinsichtlich eines autosomal dominanten Erbgangs durchgeführt. Hierbei wurden sechs SNVs, welche eine autosomal dominant vererbte Erkrankung verursachen könnten, gefunden. Davon konnten fünf Varianten nicht bestätigt werden. Die sechste Variante, NM_002923:c.T356C:p.F119S in *RGS2*, wurde aufgrund der Priorisierung anderer Arbeiten nicht weitergehend untersucht.

Im Rahmen der Filterung bezogen auf einen autosomal rezessiven Erbgang mit compound heterozygoten Varianten blieben drei Varianten-Paare. Zwei davon ließen sich nicht bestätigen. Bei dem dritten Paar konnte die Variante NM_018842:c.A209G:p.E70G in *BAIAP2L1* validiert werden und es zeigte sich eine heterozygote Variante bei der Mutter und ein homozygoter Wildtyp bei dem Vater. Die Variante NM_018842:c.C242T:p.T81I in *BAIAP2L1* konnte aufgrund erfolgloser PCR-Optimierung und Priorisierung anderer Arbeiten ebenfalls nicht weiter untersucht werden. Die Varianten NM_018842:c.C242T:p.T81I und NM_018842:c.A209G:p.E70G in *BAIAP2L1* lassen einen autosomal rezessiven Erbgang mit compound heterozygoten Varianten vermuten, der allerdings noch nicht endgültig bestätigt werden konnte. Eine andere Bezeichnung für *BAIAP2L1* ist *IRTKS*. Das Protein bindet an den Insulin-Rezeptor und spielt vermutlich eine Rolle bei der Bündelung von Aktin-Filamenten (Millard, Dawson et al. 2007).

5.1.2 Familie MR139

Bei Familie MR139 wurde eine genomweite Genotypisierung durchgeführt. Das Exom des Patienten MR139-01 wurde angereichert und sequenziert. Insgesamt wurden dabei 53.933 SNV und 3.188 InDels identifiziert.

Da bei dieser Familie keine Kandidatenregionen durch Homozygotie-Kartierung vorlagen, wurden durch eine strenge Filterung ohne Berücksichtigung von möglichen Kandidatenregionen vier homozygote single nucleotide variants (SNVs), die sich in einer

hochkonservierten Region befanden und laut in silico-Analysen krankheitsverursachend sein könnten, gefunden. Diese Varianten wurden mittels Sanger-Sequenzierung untersucht. Keine dieser Varianten ließ sich bestätigen, sodass erneute Filterungsschritte hinsichtlich eines autosomal dominanten und eines compound heterozygoten Erbganges durchgeführt wurden.

Hierbei wurden sechs SNVs bezüglich einer autosomal dominanten Genese gefunden, wovon vier Varianten nicht bestätigt werden konnten. Eine Variante im *CACNA1B*-Gen konnte aufgrund einer erfolglosen PCR-Optimierung und Priorisierung anderer Arbeiten nicht weiter untersucht werden. *CACNA1B* kodiert für die $\alpha 1B$ -Untereinheit des N-Typ-Calcium-Kanals. Eine weitere Variante im *ADSL*-Gen kodiert für das Enzym Adenylosuccinase.

Im Rahmen der Filterung bezogen auf einen autosomal rezessiven Erbgang mit compound heterozygoten Varianten blieb ein Varianten-Paar im *QRFPR*-Gen. Dieses konnte validiert werden. Eine Segregationsanalyse war allerdings nicht möglich, da nicht mehr ausreichend DNA der Eltern zur Verfügung stand. *QRFPR* kodiert für das Protein QRFPR (pyroglutamylated RFamide peptide receptor). Die Funktion von QRFPR ist noch weitgehend unbekannt. In einer Arbeit von Fukusumi zeigte sich jedoch ein Zusammenhang mit der motorischen Aktivität und der Menge der Nahrungsaufnahme (Fukusumi, Fujii et al. 2006).

5.1.3 Familie MR140

Das Exom des Patienten MR140-01 wurde angereichert und sequenziert. Dabei wurden 53.009 SNVs und 3.212 InDels identifiziert. Da auch bei dieser Familie keine Kandidatenregionen durch Homozygotie-Kartierung vorlagen, wurden durch eine strenge Filterung ohne Berücksichtigung von möglichen Kandidatenregionen 17 möglicherweise krankheitsursächliche SNVs und keine InDels gefunden.

Durch Literaturrecherche und unter Berücksichtigung des klinischen Bildes des Patienten wurde die Spleiß-Variante NM_000147:exon5:c.768+1G>A in *FUCA1* als krankheitsursächlich vermutet. Die Variante NM_000147:exon5:c.768+1G>A in *FUCA1* ist eine Spleiß-Variante, die durch fehlerhaftes Spleißen vermutlich zu einem Frameshift führt. Das Protein alpha-L-Fucosidase baut Glycoproteine und -lipide, die Fucose enthalten, ab (Occhiodoro, Beckmann et al. 1989). Ein Mangel an diesem Protein führt zu der Speicherkrankheit Fucosidose. Aus diesem Grund wurde die alpha-L-Fucosidase-Aktivität in den Lymphozyten des Patienten gemessen. Hierbei ergab sich, dass keinerlei Enzymaktivität nachweisbar war. Es wurde somit die Diagnose Fucosidose klinisch-chemisch und genetisch gestellt.

5.1.4 Familie MR141

Bei Familie MR141 wurde durch genomweite Genotypisierung und Kopplungsanalysen eine Kopplungsregion auf dem Chromosom 10 zwischen 87,99 und 91,02 Mb detektiert. Das Exom des Patienten MR141-02 wurde angereichert und sequenziert. Insgesamt wurden dabei 53.474 SNV und 3.206 InDels identifiziert. Nachdem eine strenge Filterung mit Berücksichtigung der Ergebnisse der Homozygotie-Kartierung durchgeführt wurde, ergaben sich neun SNVs, die sich in einer hochkonservierten Region befanden und laut in silico-Analysen möglicherweise krankheitsverursachend waren. Diese wurden anhand Sanger-Sequenzierung sequenziert. Dadurch konnte lediglich die Variante p.Leu182Ser in *PTEN* validiert werden. Eine erneute Filterung ohne Berücksichtigung der Kandidatenregionen ergab ausschließlich die Variante NM_000314:c.T545C:p.L182S in *PTEN*. Durch einen Segregationstest wurde bewiesen, dass beide Elternteile an dieser Stelle heterozygote Mutationsträger waren. Um weitere Varianten auszuschließen, wurden die Exome der Patienten MR141-01 und MR141-02 mit einer neuen Version des Agilent exome enrichment kit und Illumina *HiSeq2500* sequenziert. Zudem wurde nach compound heterozygoten Varianten gesucht. Als einziges Ergebnis bei beiden Patienten blieb ausschließlich die Variante in *PTEN*.

Die Variante NM_000314:c.T545C:p.L182S in *PTEN* ist eine homozygote Missense-Variante, die durch den Austausch von Thymin gegen Cytosin zur Bildung von Leucin statt Serin führt. Die Variante befindet sich an einer hochkonservierten Aminosäure-Position. Die Programme *SIFT* und *MutationTaster* sagen für diese Variante einen krankheitsverursachenden Wert voraus, während das Programm *PolyPhen2* diese Variante als möglicherweise krankheitsverursachend wertet. Hinsichtlich der Funktion des Proteins spricht dies ebenfalls dafür, dass diese Variante krankheitsverursachend sein könnte. *PTEN* phosphoryliert Lipide und Proteine, um somit den Zellzyklus, Zellmigration und Apoptose in verschiedenen Zellarten zu regulieren. Im zentralen Nervensystem beeinflusst *PTEN* die Neurogenese unter anderem durch Regulation des Axonwachstums (Luo and Park 2012) und der Synapsen-Bildung über den AKT-mTOR-Signalweg (Kim, Duan et al. 2009).

In Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Holm Uhlig an der Universität von Oxford wurden funktionelle Analysen durchgeführt. Hierbei untersuchte man den Einfluss der Variante auf die PI3K-Signalkaskade. Es wurden EBV-transformierte B-lymphoblastoide Zelllinien der gesamten Familie mit Kontrollen verglichen. Bei den heterozygoten Varianten zeigte sich eine Erhöhung der phospho-AKT und phospho-S6 Level. Eine noch stärkere Erhöhung zeigte sich bei den homozygoten Varianten. Die Ergebnisse dieser Arbeiten wurden am 7. Oktober 2015 im *European Journal of Human Genetics* publiziert (Schwerd, Khaled et al. 2015).

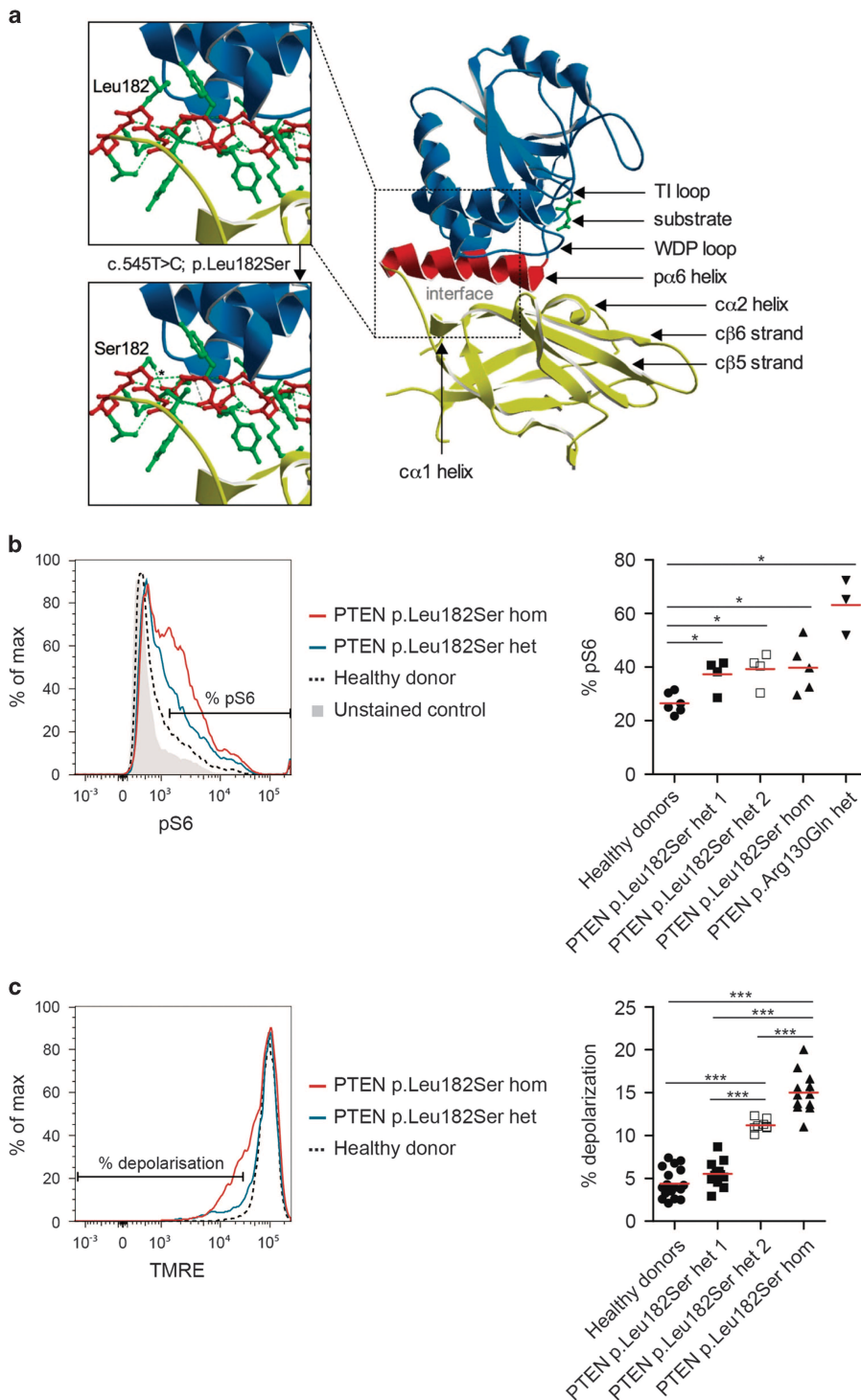


Abbildung18: Die dargestellten Daten wurden am 7. Oktober 2015 im *European Journal of Human Genetics* veröffentlicht (Schwerd, Khaled et al. 2015). (a) Molekulare Modellierung von Norman Händel. Gezeigt wird die Position der Variante p.LEU182Ser in Bezug zum katalytischen Zentrum (grün) (b) Funktionelle Analyse von Tobias Schwerd. Auswirkung der Variante auf die S6 Phosphorylierung in EBV-transformierten LCLs. Die Zellen wurden von PTEN c545T4C homozygoten Patienten, PTEN c545T4C heterozygoten Eltern und von Kontrollen generiert. Die S6-Phosphorylierung wurde anhand von Durchflusszytometrie und Messung der Fluoreszenz-Intensität festgestellt (c) Messung der mitochondrialen Fitness der LCLs mit TMRE (Tetramethylrhodamin) die relative mitochondriale Depolarisierung Signifikanz wurde durch gepoolte Datensets festgestellt und anhand des Mann-Whitney U tests analysiert.

5.1.5 Familie MR142

Bei Familie MR142 wurden durch genomweite Genotypisierung und Homozygotie-Kartierung Kandidatenregionen auf den Chromosomen 5 zwischen 73.851.778 und 79.163.127 bp und zwischen 97.042.577 und 109.244.919 bp und 10 zwischen 1.247.022 und 2.639.732 bp identifiziert. Das Exom des Patienten MR142-06 wurde angereichert und sequenziert. Dabei wurden 55.333 SNVs und 3.313 InDels identifiziert.

Die Filterung ohne Berücksichtigung der Kandidatenregionen ergab fünf SNVs und eine Basenpaar-Deletion. Hiervon ließ sich lediglich die Variante NM_152625:c.C334T:p.L112F in *ZNF366* validieren. Die anschließende Segregationsanalyse zeigte, dass die Variante in den Patienten homozygot und in den gesunden abwesend oder heterozygot ist.

Die Variante NM_152625:c.C334T:p.L112F in *ZNF366* ist eine Missense-Variante, die durch den Austausch von Guanin gegen Adenin zur Bildung von Leucin statt Phenylalanin führt. Die Variante befindet sich an einer hochkonservierten Aminosäure-Position. Die Programme *SIFT* und *MutationTaster* sagen für diese Variante einen krankheitsverursachenden Wert voraus, während das Programm *PolyPhen2* diese Variante als möglicherweise krankheitsverursachend wertet. *ZNF366* reguliert Glukokortikoidrezeptoren in dendritischen Zellen. Eine weitere Bezeichnung für *ZNF366* ist *DC-SCRIPT* (Hontelez, Karthaus et al. 2013). Abbildung 19 zeigt die Homozygotie-Kartierung der Familie MR142.

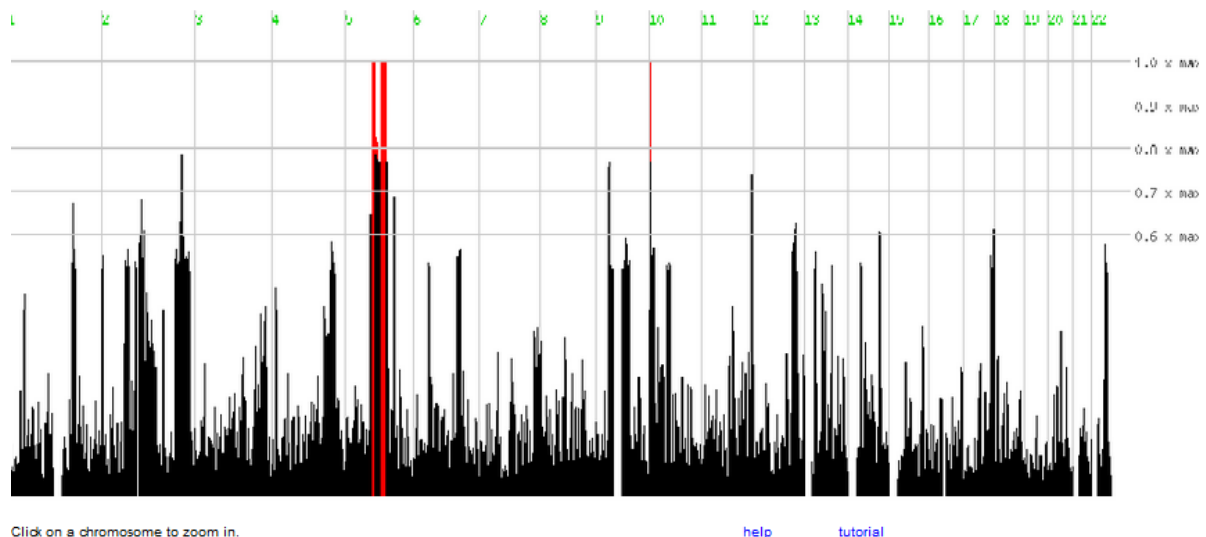


Abbildung19: Homozygotie- Kartierung der Familie MR142

5.1.6 Familie MR143

Bei Familie MR143 wurden durch genomweite Genotypisierung und Homozygotie-Kartierung Kandidatenregionen auf den Chromosomen 1 zwischen 85.905.427 und 88.481.774 bp, 2 zwischen 222.156.270 und 224.662.848 bp, 3 zwischen 26.423.469 und 32.398.024 bp, 11 zwischen 2.300.181 und 21.829.293 bp, 12 zwischen 45.207.864 und 52.656.967 bp, 13 zwischen 36.487.547 und 53.609.860 bp und 18 zwischen 73.858.536 und 77.405.731 bp identifiziert. Das Exom des Patienten MR143-01 wurde angereichert und sequenziert. Dabei wurden 54.067 SNVs und 3.399 InDels identifiziert.

Die Filterung ergab fünf SNVs und eine Deletion. Diese wurden mit Sanger sequenziert. Dadurch konnten lediglich die Varianten NM_001325:c.C1484A:p.P495H in *CSTF2* und in *RPS13* validiert werden. Die weiteren Analysen bestätigten mit der Segregation der Familie das Krankheitsbild. Während sich die Variante in *RPS13* innerhalb einer Kandidatenregion befand, lag die Variante in *CSTF2* auf dem Chromosom X und somit außerhalb von Kandidatenregionen, denn auf eine X-Vererbung wurde nicht kartiert. Abbildung 20 zeigt die Homozygotie-Kartierung der Familie MR143.

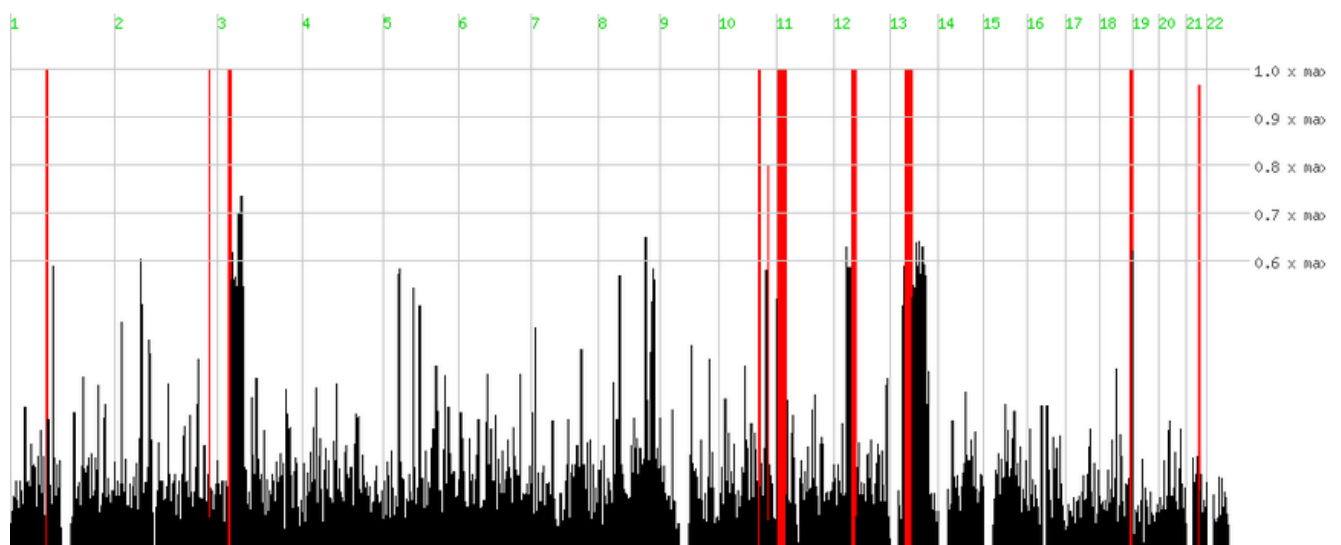


Abbildung20: Homozygotie-Kartierung der Familie MR143

Die Variante NM_001325:c.C1484A:p.P495H in *CSTF2* ist eine Missense-Variante, die durch den Austausch von Cytosin gegen Adenin zur Bildung von Prolin statt Histidin führt. Die Variante befindet sich an einer hochkonservierten Aminosäure-Position. Die Programme *SIFT*, *MutationTaster* und *PolyPhen2* sagen für diese Variante einen krankheitsverursachenden Wert voraus. Das von *CSTF2* kodierte Protein wird als CSTF-64

bezeichnet. CSTF-64 reguliert durch Beteiligung an der Bildung des RNA-3'-Endes die Gen-Expression (Hockert, Yeh et al. 2010). Eine aktuelle Studie zeigte, dass eine Unterform von CSTF-64, beta-CSTF-64, ausschließlich im zentralen und peripheren Nervensystem exprimiert wird und somit dort vermutlich eine wichtige Rolle spielt (Shankarling and MacDonald 2013). Aus diesem Grund wurde Dr. C. MacDonald in Texas kontaktiert. Im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. C. MacDonald wurde mithilfe eines SLAP-Assays (stem-loop luciferase assay for polyadenylation) die CSTF-abhängige Polyadenylierung untersucht (Hockert and Macdonald 2014). Weitere Untersuchungen der Variante zeigten jedoch, dass diese Variante keinen Einfluss auf die Proteinfunktion hatte. Die Variante NM_001017:c.G398A:p.R133Q in *RPS13* ist eine Missense-Variante, die durch den Austausch von Cytosin gegen Thymin zur Bildung von Arginin statt Glutamin führt. Die Variante befindet sich an einer hochkonservierten Aminosäure-Position. Die Programme *PolyPhen2* und *MutationTaster* sagen für diese Variante einen krankheitsverursachenden Wert voraus, während das Programm *SIFT* diese Variante als tolerabel wertet. *RPS13* bildet eine Komponente der ribosomalen 40S Einheit.

5.1.7 Familie MR39

Bei Familie MR39 wurde bereits im Vorfeld durch Genotypisierung, Homozygotie-Kartierung, Exomsequenzierung und Filterung die Variante NM_001165903:exon6:c.284-1G>A in *STX1A* validiert. Die weiteren Analysen bestätigten mit der Segregation der Familie das Krankheitsbild. Die Variante wurde durch diese Arbeit als einziges Kandidatengen bestätigt.

Die Variante NM_001165903:exon6:c.284-1G>A in *STX1A* ist eine Spleiß-Variante, die zu einem Frameshift führt. Hierdurch kommt es aufgrund der Mutation zu einem Leserasterverschub des Gens auf der DNA. Die Funktion des Proteins lässt die Variante in *STX1A* als Krankheitsursache vermuten. Das Protein Syntaxin 1a ist involviert in den Vesikeltransport zwischen Synapsen des Zentralen Nervensystems (Watanabe, Katayama et al. 2013).

Die Expression des Gens wurde in lymphoblastoiden Zelllinien mittels RT-qPCR untersucht. Diese zeigte, dass auch bei den heterozygoten Familienmitgliedern die Variante von *STX1A* ähnlich wie bei den homozygoten Wildtyp-Familienmitgliedern exprimiert wird. Dies lässt darauf schließen, dass die mRNA, die die Variante trägt, nicht frühzeitig abgebaut wird. Sollte dennoch ein Non-Mediated Decay stattfinden, erfolgt dies erst zu einem späten Zeitpunkt. Somit ist nicht von einem schnellen Non-Mediated Decay auszugehen. Es konnten keine Untersuchungen der Zellen der betroffenen, homozygoten Familienmitglieder

durchgeführt werden, da von ihnen das benötigte Material fehlte. Das Expressionsmuster des gesunden Familienmitgliedes, das ebenfalls untersucht wurde, ähnelte dem der Kontrollen. Um die Expression auf Proteinebene zu untersuchen, erfolgte die Analyse anhand eines Western Blots. Die Antikörper funktionierten, was anhand des Lysats von Neuroblastoma-Zelllinien festgestellt werden konnte. Bei der Untersuchung der lymphoblastoiden Zelllinien der Familie wurde jedoch kein Ergebnis erzielt, da vermutlich das Protein Syntaxin 1 nur sehr gering in lymphoblastoiden Zelllinien exprimiert wird.

Einen Überblick über die Ergebnisse der ersten und zweiten Filterung gibt Tabelle 3.

Familie	Erbgang	Gen	Chr	Pos.	Funktion.	Anmerkung
MR139	AR, comp. het.	<i>QRFPR-1</i>	4	122.301.597	unbekannt	Valid.
	AR, comp. het.	<i>QRFPR-1</i>	4	122.301.595		Valid.
	AD	<i>CACNA1B-45</i>	9	141.015.260	α 1B-Untereinheit des N-Typ-Calcium-Kanals	Keine Validierung, da DNA-Material fehlt
	AD	<i>ADSL-2</i>	22	40.745.944	De-Novo-Purin-Metabolismus	
MR134	AR, comp. het.	<i>BAIAP2L1-4</i>	7	97.949.583	Bündelung von Aktin-Filamenten	fehlt
	AR, comp. het.	<i>BAIAP2L1-3</i>	7	97.984.359		valid., M heteroz., F homoz.
	AD	<i>RGS2-4</i>	1	192.780.192	Signaltransduktion	fehlt
MR140	AR, homo	<i>FUCA1a</i>	1	24.186.287	Abbau von Glykoproteinen und – lipiden, die Fucose enthalten	Valid., Segr., Spleißvariante
MR141	AR, homo	<i>PTEN</i>	10	89.711.927	Lipid- und Proteinphosphorylierung, Regulation von Zellmigration, Zellzyklus, Apoptose	Valid., Segr.
MR142	AR, homo	<i>ZNF366</i>	5	71.756.990	Repression der Transkriptionsaktivität	Valid., Segr.
MR143	AR, homo	<i>CSTF2</i>	X	100.088.445	Fkt. unbekannt; beta-CSTF-64-Untereinheit ausschließlich in neuronalem Gewebe exprimiert	Valid., M heterozygot, F hemizygot WT
	AR, homo	<i>RPS13</i>	11	17.096.668	Komponente der ribosomalen 40S Untereinheit	Valid., Segr.

Tabelle 3: Ergebnisse der ersten (Gene bei bekannter Konsanguinität und mit Kandidatenregion) und zweiten Filterung, (Gene bei nicht bekannter Konsanguinität und ohne Kandidatenregionen)

6 Diskussion

6.1 PTEN in Familie MR141

Die homozygote pathogene Variante in *PTEN* p.L128S wird aus zwei Gründen als krankheitsursächlich angenommen. Zum einen sprechen die klinischen Erscheinungsbilder der beiden betroffenen Personen für eine Variante in *PTEN*. So lässt sich die Diagnose PHTS (PTEN Hamartoma Tumor Syndrome) aufgrund der ausgeprägten Makrozephalie, der mentalen Retardierung, der penilen Pigmentierung und der adenoiden Vegetation stellen. Auch die Arbeitsgruppe um Prof. Dr. med. Christoph Härtel aus Lübeck, die die Familie bereits zuvor untersuchte, zog das Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom als mögliche Differentialdiagnose in Erwägung. Diese Überlegung wurde jedoch aufgrund des autosomal rezessiven Erbganges verworfen (Hartel, Bachmann et al. 2005). PHTS stellt einen Sammelbegriff an Krankheitsbildern dar, die mit einer Variante in *PTEN* und zusätzlich bestimmten Symptomen einhergehen (Mester and Eng 2013). Dazu gehören zum Beispiel das Cowden-Syndrom, das Proteus-like-Syndrom und auch das Bannayan-Riley-Ruvalcaba-Syndrom (Teresi, Zbuk et al. 2007, Tan, Mester et al. 2011). Auch der Risikoberechner für die Wahrscheinlichkeit einer Variante in *PTEN* bei MR141-01 (Tan, Mester et al. 2011) und die Cleveland Clinic Pediatric Clinical Criteria für *PTEN* bei MR141-04 wiesen darauf hin, dass es sich hierbei um PHTS handeln könnte. Abbildung 21 zeigt die Gen-Struktur, die Phosphatase- und die C2-Domäne mit der p.Leu182Ser Variante.

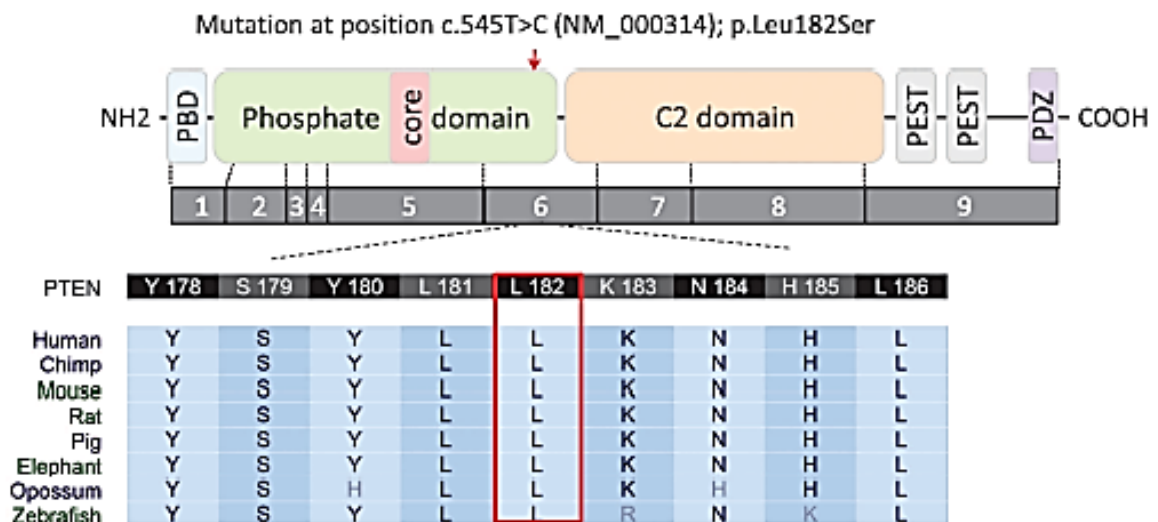


Abbildung 21: *PTEN* Gen-Struktur; Phosphatase-Domäne und C2-Domäne mit der p.Leu182Ser Variante; darunter die genomische Struktur von *PTEN* und die Konservierung von L182 (Schwerd, Khaled et al. 2015)

Um andere Varianten auszuschließen, wurde bei der Index-Patientin die Exom-Sequenzierung wiederholt und zusätzlich der zweite betroffene Patient exom-weit sequenziert. Dies führte erneut zur Identifizierung der Variante in *PTEN* als einzige Kandidatenmutation. Die Missense-Variante NM_000314.4: chr10:g.89711927T4C verursacht den Aminosäuren-Austausch p.Leu182Ser in der $\alpha 6$ Helix. Diese bildet die Verbindung zwischen der Phosphatase und der C2-Domäne. Einige heterozygote Varianten von *PTEN*, die ebenfalls die Verbindung zwischen der Phosphatase und der C2-Domäne betreffen, wurden bereits in Cleveland Clinic Paediatric Clinical Criteria for *PTEN* beschrieben. Von diesen wurde ebenfalls angenommen, dass diese funktionelle Veränderung PHTS verursachen könnte. Um diesen Effekt zu untersuchen, wurden anhand von LCLs der Betroffenen, ihren Eltern und von Kontrollen funktionelle Analysen von Tobias Schwerd in Oxford durchgeführt. In diesem Rahmen wurde der PI3K-Signalweg anhand einer Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei zeigte sich, dass in den LCLs der Betroffenen signifikant erhöhte Phospho-S6-Level messbar waren. Diese waren jedoch niedriger als die Phospho-S6-Level von einem betroffenen Individuum mit einer heterozygoten Missense-Variante p.Arg130Gln, die das katalytische Zentrum betraf. Diese Beobachtung unterstützt die Annahme, dass die Variante p.L128S in *PTEN* bei den beiden untersuchten Betroffenen krankheitsursächlich ist. So ist zu vermuten, dass die Höhe des Phospho-S6-Levels mit der Ausprägung der Symptome korreliert. Dies wiederum erklärt die milde Ausprägung der Symptome der untersuchten Betroffenen im Vergleich zu anderen Patienten, die ebenfalls eine Variante in *PTEN* aufweisen. Da die *PTEN*-abhängige Regulation des PI3K-Signalweges Auswirkungen auf die mitochondriale Fitness hat (Liang, He et al. 2014) wurde auch diese bei den Betroffenen anhand der LCLs von Tobias Schwerd untersucht. Hierbei zeigte sich ein dosisabhängiger Effekt der *PTEN* p.Leu182S Variante.

Der Unterschied der Variante p.L128S in *PTEN* zu anderen Varianten in *PTEN* ist die vergleichsweise milde Verlaufsform. Während die heterozygoten Mutationsträger der Familie keinerlei Symptome aufweisen, entwickelt sich bei einem homozygoten Auftreten dieser pathogenen Variante lediglich eine milde mentale Retardierung, Makrozephalie, penile Pigmentierung und die adenoide Hypertrophie. All diese Symptome sind typisch für Betroffene mit einer Variante in *PTEN*. Zuvor bestand die Annahme, dass eine homozygote Variante in *PTEN* stets zu einem letalen Ausgang führen würde. Dies bestätigt den Verdacht, dass diese Variante in heterozygoter Form zwar zu einem hypomorphen Protein führt, die allerdings noch kompensiert werden kann, während erst in homozygoter Form keine Kompensation mehr möglich ist. Im Gegensatz dazu können bei anderen Varianten in *PTEN* bereits im heterozygoten Zustand früh verschiedenste schwere Symptome auftreten. So fehlt

auch ein frühes Vorkommen von tumorösen Erkrankungen in der untersuchten Familie. Dies wäre ebenfalls ein typisches Symptom des PHTS. Eine Erklärung hierfür könnte man in der Position der Variante finden. Es ist anzunehmen, dass die Lipid-Phosphatase-Aktivität und die Tumorsuppression noch uneingeschränkt funktionsfähig sind, während die Protein-Phosphatase nur noch eine eingeschränkte Aktivität aufweist. So gibt es hierfür auch einen Hinweis, dass vor allem die Protein-Phosphatase das neuronale Wachstum beeinflusst. Es wurde gezeigt, dass es bei einer Überexpression von PTEN zu einer erhöhten Neuronendichte im Rückenmark kam und hierfür wohl die Protein-Phosphatase von PTEN verantwortlich war (Zhang, Piccini et al. 2012). Zudem wurde die Variante p.L182S in keiner Tumordatenbank notiert. Auch in den großen Sammlungen von PHTS-Patienten von Charis Eng in Cleveland und Stefan Aretz in Bonn kam diese Variante nicht vor. Es wird angenommen, dass Patienten mit Makrozephalie und Autismus ein geringeres Defizit in der Lipid-Phosphatase-Aktivität aufweisen als Tumorpatienten (Kreis, Leondaritis et al. 2014). Des Weiteren lassen die funktionellen Analysen darauf schließen, dass abhängig von der Restaktivität von PTEN phospho-AKT und phospho-S6 beeinflusst werden. Diese sind Bestandteile des AKT-mTOR-Signalweges, der die Neurogenese und Synapsenbildung beeinflusst (Luo and Park 2012). Hiermit wurde zum ersten Mal eine Variante in *PTEN* gefunden, die aufgrund eines autosomal rezessiven Erbganges zu einem Krankheitsbild führt. Tabelle 4 gibt eine Übersicht über die Parameter der Familie MR141.

	Birth parameters			Parameters at examination			Tumors	ID	Comments
	OFC ¹ (cm)	Height (cm)	Weight (g)	OFC ¹ (cm)	Height (cm)	Weight (kg)			
	born 37th gestational week			examination at age of 18 y					neonataly: few absence epilepsy seizures; as a child: adenoid hypertrophy, serotympanon; at examination: longicephalic head form, prominent front reminding of Bannayan-Riley-Ruvalcaba syndrome
MR141-01, ♀	35.3 (P90)	52 (P90)	3,500 (P90-P97)	63 (+5.9 SD)	166.2 (P25-P50)	60 (P50-P75)	no	mild	
	born 35th gestational week			examination at age of 15 y					as a child: few epileptic seizures, weakness of limbs, reduced proprioceptive reflexes, penile freckling
MR141-04 ♂	P50 ²	49 (P75)	2,500 (P25-P50)	64 (+5.5 SD)	180.5 (P90-P97)	80 (>P97)	no	mild	
MR141-03	NA	NA	NA	54 (P50)	159.2 (P50)	61	no	no	
MR141-02	NA	NA	NA	58 (P50-P75)	174.8 (P50-P75)	84	no	no	

Tabelle 4: Übersicht über die Parameter der Familie MR141 (Schwerd, Khaled et al. 2015)

¹Occipito-frontal head circumference; ² at age of 2 months; NA: data not available

6.2 *FUCA1* in Familie MR140

Die Variante NM_000147:exon5:c.768+1G>A wurde in *FUCA1* identifiziert. Diese Variante war eine Spleiß-Variante, die durch fehlerhaftes Spleißen vermutlich zu einem Frameshift führte. Der Betroffene in der Familie MR140 hatte Krampfanfälle, eine Leukodystrophie, Hepato- und Splenomegalie und eine Makrozephalie. Die Variante wurde als eine Kandidatenvariante aufgrund der Ergebnisse der in silico-Analysen und der mit dem Gen verbundenen Stoffwechselerkrankung gewählt. Das Gen *FUCA1* codiert für das Enzym alpha-L-Fucosidase. Eine Variante in *FUCA1* führt zu der lysosomalen Speicherkrankheit Fucosidose. Dies ist eine autosomal rezessiv vererbte Krankheit, bei der sich Glykolipide und Glykoproteine, die Fucosidose enthalten, in verschiedenen Geweben ablagern (Ben Turkia, Tebib et al. 2008). Der Patient MR140-01 zeigte einen zunehmenden Verlust von bereits Erlerntem. Dieser Verlauf wurde auch bei einem achtjährigen Mädchen beobachtet, das die bereits erlernte Sprache ab dem dritten Lebensjahr wieder vergaß. Auch die festgestellte Leukodystrophie des Patienten MR140-01 wurde bei dem genannten Mädchen anhand eines MRT-Bildes beobachtet (Muthusamy, Thomas et al. 2014). Aufgrund der Ablagerung von Fucosidose-enthaltenden Glykolipiden und Glykoproteinen kommt es bei Betroffenen zu Organomegalie. So kam es bei Patient MR140-01 zu Hepato- und Splenomegalie, sowie zu Makrozephalie. Diese Organomegalie wurde auch bei einer 23-jährigen Patientin in Form einer Kardiomegalie (Lin, Chang et al. 2007) und in der Arbeitsgruppe von Ben Turkia bei zwei Patienten in Form einer Hepatosplenomegalie (Ben Turkia, Tebib et al. 2008) beschrieben. Fortschreitende mentale Retardierung, zunehmende Spastik der Extremitäten und Bronchopneumonien wurden sowohl bei dem Patient MR140-01, als auch bei einigen Patienten der Arbeitsgruppe von Ben Turkia notiert (Ben Turkia, Tebib et al. 2008). Der beschriebene Krampfanfall bei Patient MR140-01 tritt bei 38 % der von Willems untersuchten Fucosidose-Patienten auf (Willems, Gatti et al. 1991). Zusätzlich beschrieb Hoshino bei seinem Patienten ophthalmologische Auffälligkeiten (Hoshino, O'Brien et al. 1989). So wurden nach dem Tod des Patienten dessen Augen histopathologisch untersucht und fibrogranuläre, multilamelläre Einschlüsse im gesamten Auge gefunden (Hoshino, O'Brien et al. 1989). Diesen Einschlüssen könnten die bei unserem Patienten beschriebenen retinalen Spots gleichen. Die Summe all dieser Symptome bei Patient MR140-01, die deutlich mit den charakteristischen Symptomen der Fucosidose übereinstimmen, führte dazu, dass bei unserem Patienten eine Fucosidose-Diagnostik durch David Wenger (PhD an der Thomas Jefferson Universität in Philadelphia) vorgenommen wurde. Die Untersuchung kann entweder durch Messung der Oligosaccharide im Urin (Humbel and Collart 1975) oder Messung der Enzymaktivität in den Leukozyten durchgeführt werden. In diesem Fall wurde in

den Lymphozyten die Enzymaktivität von alpha-L-Fucosidase gemessen (Universitätskrankenhaus in Philadelphia). Es war keine Enzymaktivität messbar. Dadurch konnte die Diagnose Fucosidose auch biochemisch bestätigt werden. Als einzigen kurativen Ansatz gibt es die Möglichkeit einer rechtzeitigen hämatopoetischen Stammzellspende vor dem Auftreten von Symptomen (Miano, Lanino et al. 2001). Da bei dem Patienten MR140-01 die Krankheit jedoch bereits fortgeschritten ist, besteht keine Möglichkeit mehr, die Erkrankung durch eine derartige Therapie zu heilen. So wäre in diesem Fall eine palliative Betreuung vorzuziehen, um das Leiden des Patienten zu lindern.

6.3 STX1A in Familie MR39

Die Variante NM_001165903:exon6:c.284-1G>A wurde in *STX1A* identifiziert. Diese Variante war eine Spleiß-Variante, die zu einem Frameshift führte. Die Betroffenen in der Familie MR39 leiden an einer mentalen Retardierung. Die beiden Brüder wiesen zum Zeitpunkt der Geburt größere Geburtsmaße und eine Hypotonie auf. Sie erlernten das Laufen erst im Alter von drei Jahren und auch die Sprachentwicklung war verzögert. Die Variante wurde als eine Kandidatenvariante aufgrund der Ergebnisse der *in silico*-Analysen und der hohen Expression in neuronalem Gewebe in Betracht gezogen. Das Gen *STX1A* kodiert für das Protein Syntaxin 1a. Syntaxin 1a ist eine Komponente des SNARE-Komplexes, der sich präsynaptisch in Neuronen befindet. In diesem Rahmen spielt es eine wichtige Rolle bei der Exozytose (Sudhof 2012). Zudem interagiert es mit vielen verschiedenen Proteinen, unter anderem mit Neurotransmitter-Transportern und Ionen-Kanälen (Bennett, Calakos et al. 1992, Toonen and Verhage 2007). Da Syntaxin 1a vermehrt in bestimmten neuronalen Geweben exprimiert wird, wird angenommen, dass es eine wichtige Rolle bei Lern- und Gedächtnis-Prozessen, sowie bei Angst-Zuständen spielt (Fujiwara, Mishima et al. 2006). Des Weiteren besteht ein Zusammenhang zwischen der Schwere der mentalen Retardierung bei Williams-Beuren-Syndrom und der Expression von Syntaxin 1a (Gao, Bellugi et al. 2010). In der Arbeit von Fumiko Hoeft wurden mehrere Gene untersucht, die mit dem Williams-Beuren-Syndrom assoziiert werden. Es zeigte sich, dass durch eine Variante in *STX1A* vor allem die Entwicklung der weißen Substanz verringert war (Hoeft, Dai et al. 2014). Dies lässt vermuten, dass auch bei den Betroffenen der Familie MR39 die mentale Retardierung durch eine verminderte Expression von Syntaxin 1a und somit durch eine Reduktion der weißen Substanz bedingt ist. Aus diesem Grund wurde die Syntaxin-1a-Expression in der Familie MR39 anhand einer quantitativen PCR untersucht. Diese konnte jedoch nur bei heterozygoten Mutationsträgern untersucht werden, da nur von diesen Familienmitgliedern lymphoblastoide Zelllinien zur Verfügung standen. Hierbei zeigte sich, dass auch bei den

heterozygoten Familienmitgliedern die mutierte Variante von *STX1A* exprimiert wird und somit kein Non-Mediated-Decay stattfindet. Dies bedeutet, dass die mutierte mRNA nicht vorzeitig abgebaut wird und es somit zur Bildung von fehlerhaften Proteinen kommen kann (Chang, Imam et al. 2007). Da die heterozygoten Mutationsträger der Familie jedoch gesund sind, lässt sich vermuten, dass gegebenenfalls Kompensationsmechanismen durch den ebenfalls exprimierten Wildtyp für eine regelhafte Funktion von Syntaxin 1a verantwortlich sind. Das Expressionsmuster auf Proteinebene sollte mithilfe eines Western Blots analysiert werden. Da dies erfolglos blieb, obwohl die Methode in geeigneten Kontrollen erfolgreich war, ist es denkbar, dass eine zu geringe Konzentration von Syntaxin 1a in lymphoblastoiden Zelllinien vorgelegen hatte, um damit die Expression zu untersuchen. Es ist auch möglich, dass im Rahmen dieser Doktorarbeit die Methoden nicht abschließend etabliert waren. In der Arbeit von Michael Goa wird beschrieben, dass die Konzentration von Syntaxin 1a in den lymphoblastoiden Zelllinien eine Korrelation mit der Schwere an Intelligenzminderung aufweist (Gao, Bellugi et al. 2010). Zusammenfassend ist zu sagen, dass in Bezug auf die Funktion von Syntaxin 1a als Protein, das eine wichtige Rolle in der Signaltransduktion des ZNS und bezüglich der Ergebnisse der qPCR, die Variante bei dieser Familie als krankheitsursächlich einzuschätzen ist.

6.4 CSTF2 in Familie MR142

Die Variante NM_001325:c.C1484A:p.P495H in *CSTF2*, dessen Protein als CstF-64 bezeichnet wird, wurde als hemizygote Variante bei zwei Brüdern von konsanguinen gesunden Eltern der Familie MR143 gefunden. Beide Patienten leiden unter einer milden mentalen Retardierung und Autismus ohne organische Auffälligkeiten. Da die Variante in *CSTF2* hochkonserviert und laut in silico-Analysen krankheitsverursachend war und validiert und segregiert wurde, wurde sie als Kandidatengene gewählt. *CSTF2* wird in verschiedenen Isoformen in jeweils spezifischen Organen exprimiert. So kommt es bei einem Verlust des Proteins τ CstF-64 zu Infertilität (Dass, Tardif et al. 2007). Die Isoform β CstF-64 wurde von Ganesh Shankarling und Clinton MacDonald untersucht. Es wurde zum ersten Mal die Expression von *CSTF2* in neuronalem Gewebe beschrieben. Hierbei zeigte sich, dass CstF-64 eine wichtige Rolle bei der Funktion des Nervensystems spielt (Shankarling and MacDonald 2013). Aus diesem Grund wurde diese Arbeitsgruppe aus Texas kontaktiert und eine Kooperation angestrebt. Da die Arbeitsgruppe von Vera Kalscheuer am Max-Planck-Institut für Molekulargenetik in Berlin ebenfalls eine Missense-Variante in *CSTF2* bei einer Familie fand, wurde sie als Kooperationspartner kontaktiert. Ihre Patienten weisen eine milde mentale Retardierung ohne organische Auffälligkeiten auf. Im Rahmen einer Kooperation mit

beiden Gruppen, sollte zunächst der Effekt der Variante auf die Proteinaktivität untersucht werden. Hierzu entwickelte Andrew Hockert bereits zuvor ein Assay, um die Funktion von CstF zu untersuchen. Mit dem sogenannten SLAP-Assay (*Stem-loop Luciferase Assay for Polyadenylation*) werden die Effekte von Varianten in CstF-64 gemessen, indem die CstF-64-abhängige Polyadenylierung von pre-mRNA in transfizierten HeLA-Zellen untersucht wird (Hockert and Macdonald 2014). Erwartet wird hierbei, dass die Variante NM_001325:c.C1484A:p.P495H in *CSTF2* eine verminderte Polyadenylierung mit dem SLAP-Assay zeigt. Die Ergebnisse dieses Experiments zeigten allerdings keine Auswirkungen der Variante auf die Proteinfunktion. Die von Frau Kalscheuer berichtete Variante zeigte jedoch eine Auswirkung. Somit bleibt das Gen als Kandidat relevant, auch wenn die in dieser Arbeit identifizierte Variante zunächst nicht als kausal bestätigt werden kann.

6.5 Weitere Varianten

Bei Familie MR134 blieben die Varianten NM_018842:c.C242T:p.T81I in *BAIAP2L1* und die autosomal dominante Variante NM_002923:c.T356C:p.F119S in *RGS* offen.

Bei Familie MR139 blieben das Varianten-Paar NM_198179:c.T206G:p.V69G und NM_198179:c.G208T:p.V70L in *QRFP*, bezogen auf einen autosomal rezessiven Erbgang mit compound heterozygoten Varianten, und die Varianten NM_000718:c.C6416T:p.P2139L in *CACNA1B* und NM_000026:c.G262A:p.V88M in *ADSL*, bezogen auf einen autosomal dominanten Erbgang, offen.

Besonders interessant ist die Variante NM_000718:c.C6416T:p.P2139L in *CACNA1B*. Die Proteinfunktion in neuronalem Gewebe könnte in Zusammenhang mit der Entwicklung von mentaler Retardierung stehen. Da bei den Eltern keine Konsanguinität bekannt ist, wäre auch ein autosomal dominanter Erbgang aufgrund einer *de novo* Mutation wahrscheinlich. Jedoch bleibt offen, ob es sich hierbei nicht um ein Artefakt handelt, denn eine Validierung mittels Sanger-Sequenzierung erfolgte im Rahmen dieser Arbeit nicht.

7 Ausblick

Bei Familie MR134 blieb im Rahmen der ersten Filterung eine autosomal rezessive Variante und im Rahmen der zweiten Filterung eine autosomal dominante Variante offen. Bei Familie MR139 blieben, bezogen auf einen autosomal rezessiven Erbgang mit compound heterozygoten Varianten, ein Varianten-Paar und bezogen auf einen autosomal dominanten Erbgang, zwei Varianten offen. Diese Varianten sollten in weiterführenden Arbeiten validiert bzw. ausgeschlossen werden. Allerdings entwickeln sich die Methoden schnell, so dass es mittlerweile für ungelöste Fälle erfolgsversprechender ist, die gesamte Exom-Sequenzierung für alle Familienmitglieder durchzuführen.

Bei Familie MR143 ergab sich eine Variante in *CSTF2* als möglicherweise krankheitsursächlich. Weitere Untersuchungen im Rahmen einer Kooperation mit der Arbeitsgruppe von Dr. C. MacDonald zeigten keinen Einfluss der Variante auf die Proteinfunktion. Jedoch bleibt diese Variante ein Kandidat, und weitere Erkenntnisse durch andere Arbeiten könnten hier zur Klärung beitragen.

Die Exom-Sequenzierung nimmt einen immer größeren Stellenwert in der Diagnostik von mentaler Retardierung ein. So ist es absehbar, dass in der Zukunft diese Methode als Standard-Methode in der Identifizierung von nicht geklärter mentaler Retardierung verwendet werden könnte (Rauch, Wieczorek et al. 2012). Doch nicht nur bezüglich mentaler Retardierung, sondern auch für die Identifizierung anderer Erbkrankheiten könnte die Exom-Sequenzierung von hoher Relevanz sein. Das Klären der Ursachen von mentaler Retardierung stellt eine große Herausforderung dar und bislang ist lediglich ein Bruchteil aller krankheitsverursachenden Gene charakterisiert worden.

8 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Prof. Dr. rer. nat. Meese und Prof. Dr. med. Reis für das Ermöglichen meiner Doktorarbeit an den Instituten für Humangenetik sowohl an dem Universitätsklinikum des Saarlandes als auch an dem Universitätsklinikum Erlangen und für ihre Unterstützung in dieser Zeit.

Ganz besonders möchte ich auch meinem Betreuer Priv.-Doz. Dr. med. Rami Abou Jamra für seine tatkräftige Unterstützung und die enge und gute Betreuung danken.

Bei den Mitarbeitern des Instituts für Humangenetik an dem Universitätsklinikum Erlangen bedanke ich mich ebenfalls vielmals. Hierbei sind in besonderem Maße Farah Radwan, Rebecca Buchert, Hasan Tawamie und Ute Scheller zu nennen, die mir in dieser Zeit stets mit Rat und Tat zur Seite standen.

Auch meinen Freunden möchte ich danken, da sie jederzeit ein offenes Ohr für mich hatten und mir mit ihrem Glauben an mich und ihren motivierenden Worten viel Halt und Antrieb gaben.

Zuletzt schulde ich den größten Dank meinen Eltern, die mir in jeder Lebenslage zur Seite stehen und mir in meinem Leben viele schöne und wichtige Dinge ermöglicht haben, nicht zuletzt mein Studium und diese Doktorarbeit.

9 Abbildungs-, Tabellen-, Abkürzungsverzeichnis

9.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Arbeitsschritte zur Identifizierung des Kandidatengenes am Beispiel von Familie MR140	13
Abbildung 2: Stammbaum der Familie MR134; *= Index-Patient	16
Abbildung 3: Stammbaum der Familie MR139; * = Index-Patient	17
Abbildung 4: Stammbaum der Familie MR140; * = Index-Patient	18
Abbildung 5: Stammbaum der Familie MR141; * = Index-Patient	20
Abbildung 6: Stammbaum der Familie MR142; * = Index-Patient	21
Abbildung 7: Stammbaum der Familie MR143; * = Index-Patient	22
Abbildung 8: Stammbaum der Familie MR39, * = Index-Patient	23
Abbildung 9: Ergebnis der Homozygotie-Kartierung der Familie MR141.....	30
Abbildung 10: SOLiD, Ablauf der Sequenzierung mit Ligation (Anderson and Schrijver 2010).....	32
Abbildung 11; Illumina, Ablauf der Sequenzierung mit Brückenamplifikation (Mardis 2008).....	33
Abbildung 12: Filterung bei bekannter Konsanguinität ohne Kandidatenregionen.....	35
Abbildung 13: Filterung ohne bekannte Konsanguinität ohne Kandidatenregionen.....	37
Abbildung 14: Amplifikationsplot am Beispiel von PGK1 mit humaner cDNA (Thermo Fisher 2015) ...	39
Abbildung 15: Aufbau des Blots	41
Abbildung 16: Prozess Übersicht der AMPure Aufreinigung (Coulter 2015).....	44
Abbildung 17: Sequenzierung der Variante c.T545C:p.L182S in PTEN bei Eltern und Patienten (von oben nach unten: MR141-02=f, MR141-03=m, MR141-01=l, MR141-04)	45

9.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassifikation MR nach ICD-10-GM Version 2013 (WHO DIMDI 1994 - 2013)	8
Tabelle 2: Übersicht der Familien.....	15
Tabelle 3: Ergebnisse der ersten (Gene bei bekannter Konsanguinität und mit Kandidatenregion) und zweiten Filterung, (Gene bei nicht bekannter Konsanguinität und ohne Kandidatenregionen).....	55
Tabelle 4: Übersicht über die Parameter der Familie MR141 (Schwerd, Khaled et al. 2015)	58

9.3 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
3' UTR	3' untranslatierte Region
5' UTR	5' untranslatierte Region
A	Adenin
ARID	autosomal-rezessive mentale Retardierung
BAIAP2L1	Brain-Specific Angiogenesis Inhibitor 1-Associated Protein 2-Like Protein 1
bp	Basenpaar
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
ca.	circa
cDNA	complementary DNA
cm	Zentimeter
CNV	Copy Number Variant
CSTF2	Cleavage Stimulation Factor, 3 Pre-RNA, Subunit 2, 64kDa
ddNTP	2',3'-Didesoxynucleosid-5'-triphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxynucleosid-5'-triphosphat
DTT	Dithiothreitol
EBV	Ebstein-Bar-Virus
ECL	enhanced chemoluminescence system
ESP	NHLBI Go Exome Sequencing Project
EtBr	Ethidiumbromid
FUCA1	Fucosidase, Alpha-L- 1, Tissue
G	Guanin
h	Stunde
H ₂ O	Wasser
HCS	HiSeq instrument control Software
HLA	Human Leukocyte Antigen
IBD	Identical By Descent
IBS	Identical By State
ICD-10	International Classification of Diseases
ID	Intellectual Disability
IRTKS	insulin receptor tyrosine kinase substrate
Indel	Insertion/Deletion
IQ	Intelligenzquotient
j	ja
kb	Kilobasenpaare
km	Kilometer
l	Liter
LCL	Lymphoblastoide Zelllinien
LDS	Lithium Dodecyl Sulfate
LOH	Loss Of Heterozygosity
m	männlich
M	Mol pro Liter
mA	Milliampere
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
min	Minute

miRNA	microRNA
ml	Milliliter
mRNA	messenger Ribonukleinsäure
MOPS	3-(N-Morpholino)propansulfonsäure
MR	Mentale Retardierung
MUC	Mucin
n	nein
NC	Nicht-konsanguin
ncRNA	non-coding RNA
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NF1	Neurofibrin1
ng	Nanogramm
NGS	Next Generation Sequencing
nm	Nanometer
NS-ARID	nicht-spezifische autosomal-rezessive mentale Retardierung
PBS	phosphatebufferedsaline-Puffer
PCR	polymerase chain reaction (Polymerase-Kettenreaktion)
pH	negativer dekadischer Logarithmus der H ⁺ -Ionen-Konzentration
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinasen
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
OMIM	Online Mendelian Inheritance in Man
QRFP	Orexigenic Neuropeptide QRFP Recepto
ROH	Run Of Homozygosity
rpm	Revolutions per minute
RPS13	Ribosomal Protein S13
rtPCR	Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction
RT-qPCR	Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction
s	Sekunde
SLAP	stem-loop luciferase assay for polyadenylation
SOLiD	Sequencing by Oligonucleotide Ligation and Detection
SNP	Single Nucleotide Polymorphism
SNV	Single Nucleotide Variant
STX1A	Syntaxin 1a
T	Thymin
TBE	Tris-Borat-EDTA
TBS	Tris-buffered saline
TG2012feb	1000Genomes February 2012
U	Uracil
UTR	Untranslated Region
V	Volt
VEP	Variant Effect Predictor
w	weiblich
ZNF366	Zinc finger protein 366

10 Referenzen

Abecasis, G. R., A. Auton, L. D. Brooks, M. A. DePristo, R. M. Durbin, R. E. Handsaker, H. M. Kang, G. T. Marth and G. A. McVean (2012). "An integrated map of genetic variation from 1,092 human genomes." Nature **491**(7422): 56-65.

Abou Jamra, R., S. Wohlfart, M. Zweier, S. Uebe, L. Priebe, A. Ekici, S. Giesebrecht, A. Abboud, M. A. Al Khateeb, M. Fakher, S. Hamdan, A. Ismael, S. Muhammad, M. M. Nothen, J. Schumacher and A. Reis (2011). "Homozygosity mapping in 64 Syrian consanguineous families with non-specific intellectual disability reveals 11 novel loci and high heterogeneity." Eur J Hum Genet **19**(11): 1161-1166.

Alkuraya, F. S. (2010). "Homozygosity mapping: one more tool in the clinical geneticist's toolbox." Genet Med **12**(4): 236-239.

Anderson, M. W. and I. Schrijver (2010). "Next generation DNA sequencing and the future of genomic medicine." Genes (Basel) **1**(1): 38-69.

Arolt, V., C. Reimer and H. Dilling (2011). Basiswissen Psychiatrie und Psychotherapie, Springer-Verlag.

Bellini, C., D. Massocco and G. Serra (2000). "Prenatal cocaine exposure and the expanding spectrum of brain malformations." Arch Intern Med **160**(15): 2393.

Ben Turkia, H., N. Tebib, H. Azzouz, M. S. Abdelmoula, J. Bouguila, H. Sanhaji, N. Miladi, I. Maire, C. Caillaud, N. Kaabachi and M. F. Ben Dridi (2008). "Phenotypic spectrum of fucosidosis in Tunisia." J Inherit Metab Dis **31 Suppl 2**: S313-316.

Bennett, M. K., N. Calakos and R. H. Scheller (1992). "Syntaxin: a synaptic protein implicated in docking of synaptic vesicles at presynaptic active zones." Science **257**(5067): 255-259.

Bittles, A. (2001). "Consanguinity and its relevance to clinical genetics." Clin Genet **60**(2): 89-98.

Bonnemann, C. and P. Meinecke (1990). "Holoprosencephaly as a possible embryonic alcohol effect: another observation." Am J Med Genet **37**(3): 431-432.

Brender, J. D., F. B. Zhan, L. Suarez, P. H. Langlois and K. Moody (2006). "Maternal residential proximity to waste sites and industrial facilities and oral clefts in offspring." J Occup Environ Med **48**(6): 565-572.

Chang, Y. F., J. S. Imam and M. F. Wilkinson (2007). "The nonsense-mediated decay RNA surveillance pathway." Annu Rev Biochem **76**: 51-74.

Corona-Rivera, J. R., E. Corona-Rivera, E. Romero-Velarde, J. Hernandez-Rocha, L. Bobadilla-Morales and A. Corona-Rivera (2001). "Report and review of the fetal brain disruption sequence." Eur J Pediatr **160**(11): 664-667.

Coulter, B. (2015). "Agencourt AMPure XP - PCR Purification." Retrieved 18 September, 2015, from <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/nucleic-acid-sample-preparation/agencourt-ampure-xp-pcr-purification/index.htm?i=A63881#2/10//0/25/1/0/asc/2/A63881///0/1//0/%2Fwsrportal%2Fwsr%2Fresearch-and-discovery%2Fproducts-and-services%2Fnucleic-acid-sample-preparation%2Fagencourt-ampure-xp-pcr-purification%2Findex.htm/>.

Coulter, B. (2015). "Agencourt CleanSEQ - Dye Terminator Removal." Retrieved 18 September, 2015, from <https://www.beckmancoulter.com/wsrportal/wsr/research-and-discovery/products-and-services/nucleic-acid-sample-preparation/agencourt-cleanseq-dye-terminator-removal/index.htm#2/10//0/25/1/0/asc/2/A29151///0/1//0/%2Fwsrportal%2Fwsr%2Fresearch-and-discovery%2Fproducts-and-services%2Fnucleic-acid-sample-preparation%2Fagencourt-cleanseq-dye-terminator-removal%2Findex.htm/>.

Cunningham, F. G., N. F. Gant, K. J. Leveno and C. Larry (2003). "Williams obstetrics." Journal of Midwifery & Women's Health **48**(5): 369-369.

Dass, B., S. Tardif, J. Y. Park, B. Tian, H. M. Weitlauf, R. A. Hess, K. Carnes, M. D. Griswold, C. L. Small and C. C. Macdonald (2007). "Loss of polyadenylation protein tauCstF-64 causes spermatogenic defects and male infertility." Proc Natl Acad Sci U S A **104**(51): 20374-20379.

DeJonge, M. and J. Poulik (1997). "Pathological case of the month. Fetal brain disruption sequence." Arch Pediatr Adolesc Med **151**(12): 1267-1268.

Fujiwara, T., T. Mishima, T. Kofuji, T. Chiba, K. Tanaka, A. Yamamoto and K. Akagawa (2006). "Analysis of knock-out mice to determine the role of HPC-1/syntaxin 1A in expressing synaptic plasticity." The Journal of neuroscience **26**(21): 5767-5776.

Fukusumi, S., R. Fujii and S. Hinuma (2006). "Recent advances in mammalian RFamide peptides: the discovery and functional analyses of PrRP, RFRPs and QRFP." Peptides **27**(5): 1073-1086.

Gabis, L., Z. Gelman-Kohan and M. Mogilner (1997). "Microcephaly due to fetal brain disruption sequence. Case report." J Perinat Med **25**(2): 213-215.

Gao, M. C., U. Bellugi, L. Dai, D. L. Mills, E. M. Sobel, K. Lange and J. R. Korenberg (2010). "Intelligence in Williams Syndrome is related to STX1A, which encodes a component of the presynaptic SNARE complex." PLoS One **5**(4): e10292.

Gautam, P. and S. R. Phadke (2000). "Fetal brain disruption sequence." Indian Pediatr **37**(6): 662-664.

Gibbs, J. R. and A. Singleton (2006). "Application of genome-wide single nucleotide polymorphism typing: simple association and beyond." PLoS Genet **2**(10): e150.

Hamamy, H., S. E. Antonarakis, L. L. Cavalli-Sforza, S. Temtamy, G. Romeo, L. P. Kate, R. L. Bennett, A. Shaw, A. Megarbane, C. van Duijn, H. Bathija, S. Fokstuen, E. Engel, J. Zlotogora, E. Dermitzakis, A. Bottani, S. Dahoun, M. A. Morris, S. Arsenaault, M. S. Aglan, M. Ajaz, A. Alkalamchi, D. Alnaqeb, M. K. Alwasiyah, N. Anwer, R. Awwad, M. Bonnefin, P. Corry, L. Gwanmesia, G. A. Karbani, M. Mostafavi, T. Pippucci, E. Ranza-Boscardin, B. Reversade, S. M. Sharif, M. E. Teeuw and A. H. Bittles (2011). "Consanguineous marriages, pearls and perils: Geneva International Consanguinity Workshop Report." Genet Med **13**(9): 841-847.

Hamel, B. C. and F. A. Poppelaars (2000). "[Sex-linked mental retardation]." Ned Tijdschr Geneeskd **144**(36): 1713-1716.

Hartel, C., S. Bachmann, C. Bonnemann, P. Meinecke and J. Sperner (2005). "Familial megalencephaly with dilated Virchow-Robin spaces in magnetic resonance imaging: an autosomal recessive trait?" Clin Dysmorphol **14**(1): 31-34.

Hepper, P. G., J. C. Dornan and C. Lynch (2012). "Fetal brain function in response to maternal alcohol consumption: early evidence of damage." Alcohol Clin Exp Res **36**(12): 2168-2175.

Hockert, J. A. and C. C. Macdonald (2014). "The stem-loop luciferase assay for polyadenylation (SLAP) method for determining CstF-64-dependent polyadenylation activity." Methods Mol Biol **1125**: 109-117.

Hockert, J. A., H. J. Yeh and C. C. MacDonald (2010). "The hinge domain of the cleavage stimulation factor protein CstF-64 is essential for CstF-77 interaction, nuclear localization, and polyadenylation." J Biol Chem **285**(1): 695-704.

Hoeft, F., L. Dai, B. W. Haas, K. Sheau, M. Mimura, D. Mills, A. Galaburda, U. Bellugi, J. R. Korenberg and A. L. Reiss (2014). "Mapping genetically controlled neural circuits of social behavior and visuo-motor integration by a preliminary examination of atypical deletions with Williams syndrome." PLoS One **9**(8): e104088.

Hontelez, S., N. Karthaus, M. W. Looman, M. Ansems and G. J. Adema (2013). "DC-SCRIPT regulates glucocorticoid receptor function and expression of its target GILZ in dendritic cells." J Immunol **190**(7): 3172-3179.

Hoshino, M., T. P. O'Brien, J. M. McDonnell, Z. C. de la Cruz and W. R. Green (1989). "Fucosidosis: ultrastructural study of the eye in an adult." Graefes Arch Clin Exp Ophthalmol **27**(2): 162-171.

Housby, J. N. and E. M. Southern (1998). "Fidelity of DNA ligation: a novel experimental approach based on the polymerisation of libraries of oligonucleotides." Nucleic Acids Res **26**(18): 4259-4266.

Humbel, R. and M. Collart (1975). "Oligosaccharides in urine of patients with glycoprotein storage diseases. I. Rapid detection by thin-layer chromatography." Clin Chim Acta **60**(2): 143-145.

Illumina. (2016, 26 January 2016). "An Introduction to Next-Generation Sequencing Technology." from http://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/illumina_sequencing_introduction.pdf.

Kaufman, L., M. Ayub and J. B. Vincent (2010). "The genetic basis of non-syndromic intellectual disability: a review." J Neurodev Disord **2**(4): 182-209.

Kelly, S. J., N. Day and A. P. Streissguth (2000). "Effects of prenatal alcohol exposure on social behavior in humans and other species." Neurotoxicol Teratol **22**(2): 143-149.

Kim, J. Y., X. Duan, C. Y. Liu, M. H. Jang, J. U. Guo, N. Pow-anpongkul, E. Kang, H. Song and G. L. Ming (2009). "DISC1 regulates new neuron development in the adult brain via modulation of AKT-mTOR signaling through KIAA1212." Neuron **63**(6): 761-773.

Klee, E. (1983). Euthanasie" im NS-Staat: die" Vernichtung lebensunwerten Lebens, Fischer S. Verlag GmbH.

Kreis, P., G. Leonarditis, I. Lieberam and B. J. Eickholt (2014). "Subcellular targeting and dynamic regulation of PTEN: implications for neuronal cells and neurological disorders." Front Mol Neurosci **7**: 23.

Lander, E. S. and D. Botstein (1987). "Homozygosity mapping: a way to map human recessive traits with the DNA of inbred children." Science **236**(4808): 1567-1570.

Leonard, H. and X. Wen (2002). "The epidemiology of mental retardation: challenges and opportunities in the new millennium." Ment Retard Dev Disabil Res Rev **8**(3): 117-134.

Liang, H., S. He, J. Yang, X. Jia, P. Wang, X. Chen, Z. Zhang, X. Zou, M. A. McNutt, W. H. Shen and Y. Yin (2014). "PTENalpha, a PTEN isoform translated through alternative initiation, regulates mitochondrial function and energy metabolism." Cell Metab **19**(5): 836-848.

- Lin, S. P., J. H. Chang, M. P. de la Cadena, T. F. Chang and G. J. Lee-Chen (2007). "Mutation identification and characterization of a Taiwanese patient with fucosidosis." J Hum Genet **52**(6): 553-556.
- Luo, X. and K. K. Park (2012). "Neuron-intrinsic inhibitors of axon regeneration: PTEN and SOCS3." Int Rev Neurobiol **105**: 141-173.
- Mardis, E. R. (2008). "Next-generation DNA sequencing methods." Annu Rev Genomics Hum Genet **9**: 387-402.
- Martin, J. P. and J. Bell (1943). "A PEDIGREE OF MENTAL DEFECT SHOWING SEX-LINKAGE." J Neurol Psychiatry **6**(3-4): 154-157.
- Mattson, S. N. and E. P. Riley (2011). "The quest for a neurobehavioral profile of heavy prenatal alcohol exposure." Alcohol Res Health **34**(1): 51-55.
- McKenna, A., M. Hanna, E. Banks, A. Sivachenko, K. Cibulskis, A. Kernytsky, K. Garimella, D. Altshuler, S. Gabriel, M. Daly and M. A. DePristo (2010). "The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data." Genome Res **20**(9): 1297-1303.
- McLaren, W., B. Pritchard, D. Rios, Y. Chen, P. Flicek and F. Cunningham (2010). "Deriving the consequences of genomic variants with the Ensembl API and SNP Effect Predictor." Bioinformatics **26**(16): 2069-2070.
- Mester, J. and C. Eng (2013). "When overgrowth bumps into cancer: the PTEN-opathies." Am J Med Genet C Semin Med Genet **163c**(2): 114-121.
- Meyer, H. (1983). Geistigbehindertenpädagogik. Stuttgart, Kohlhammer.
- Miano, M., E. Lanino, R. Gatti, G. Morreale, P. Fondelli, M. E. Celle, M. Stroppiano, F. Crescenzi and G. Dini (2001). "Four year follow-up of a case of fucosidosis treated with unrelated donor bone marrow transplantation." Bone Marrow Transplant **27**(7): 747-751.
- Millard, T. H., J. Dawson and L. M. Machesky (2007). "Characterisation of IRTKS, a novel IRSp53/MIM family actin regulator with distinct filament bundling properties." J Cell Sci **120**(Pt 9): 1663-1672.
- Moore, C. A., D. D. Weaver and M. J. Bull (1990). "Fetal brain disruption sequence." J Pediatr **116**(3): 383-386.
- Musante, L. and H. H. Ropers (2014). "Genetics of recessive cognitive disorders." Trends in Genetics **30**(1): 32-39.
- Muthusamy, K., M. M. Thomas, R. E. George, M. Alexander, S. Mani and R. N. Benjamin (2014). "Siblings with fucosidosis." J Pediatr Neurosci **9**(2): 156-158.
- Najmabadi, H., H. Hu, M. Garshasbi, T. Zemojtel, S. S. Abedini, W. Chen, M. Hosseini, F. Behjati, S. Haas, P. Jamali, A. Zecha, M. Mohseni, L. Puttmann, L. N. Vahid, C. Jensen, L. A. Moheb, M. Bienek, F. Larti, I. Mueller, R. Weissmann, H. Darvish, K. Wrogemann, V. Hadavi, B. Lipkowitz, S. Esmaeeli-Nieh, D. Wiczorek, R. Kariminejad, S. G. Firouzabadi, M. Cohen, Z. Fattahi, I. Rost, F. Mojahedi, C. Hertzberg, A. Dehghan, A. Rajab, M. J. Banavandi, J. Hoffer, M. Falah, L. Musante, V. Kalscheuer, R. Ullmann, A. W. Kuss, A. Tzschach, K. Kahrizi and H. H. Ropers (2011). "Deep sequencing reveals 50 novel genes for recessive cognitive disorders." Nature **478**(7367): 57-63.
- Ng, P. C. and S. Henikoff (2003). "SIFT: Predicting amino acid changes that affect protein function." Nucleic Acids Res **31**(13): 3812-3814.

Occhiodoro, T., K. R. Beckmann, C. P. Morris and J. J. Hopwood (1989). "Human alpha-L-fucosidase: complete coding sequence from cDNA clones." Biochem Biophys Res Commun **164**(1): 439-445.

Ramensky, V., P. Bork and S. Sunyaev (2002). "Human non-synonymous SNPs: server and survey." Nucleic Acids Res **30**(17): 3894-3900.

Rasmussen, S. A., J. L. Frias, C. Z. Lafer, D. L. Eunpu and E. H. Zackai (1990). "Partial duplication 1q: report of four patients and review of the literature." Am J Med Genet **36**(2): 137-143.

Rauch, A., J. Hoyer, S. Guth, C. Zweier, C. Kraus, C. Becker, M. Zenker, U. Huffmeier, C. Thiel, F. Ruschendorf, P. Nurnberg, A. Reis and U. Trautmann (2006). "Diagnostic yield of various genetic approaches in patients with unexplained developmental delay or mental retardation." Am J Med Genet A **140**(19): 2063-2074.

Rauch, A., D. Wiczorek, E. Graf, T. Wieland, S. Endeke, T. Schwarzmayr, B. Albrecht, D. Bartholdi, J. Beygo and N. Di Donato (2012). "Range of genetic mutations associated with severe non-syndromic sporadic intellectual disability: an exome sequencing study." The Lancet **380**(9854): 1674-1682.

Riley, E. P. and C. L. McGee (2005). "Fetal alcohol spectrum disorders: an overview with emphasis on changes in brain and behavior." Exp Biol Med (Maywood) **230**(6): 357-365.

Ropers, H.-H. (2006). "X-linked mental retardation: many genes for a complex disorder." Current opinion in genetics & development **16**(3): 260-269.

Ropers, H. H. (2010). "Genetics of early onset cognitive impairment." Annu Rev Genomics Hum Genet **11**: 161-187.

Ropers, H. H. and B. C. Hamel (2005). "X-linked mental retardation." Nat Rev Genet **6**(1): 46-57.

Russell, L. J., D. D. Weaver, M. J. Bull and M. Weinbaum (1984). "In utero brain destruction resulting in collapse of the fetal skull, microcephaly, scalp rugae, and neurologic impairment: the fetal brain disruption sequence." Am J Med Genet **17**(2): 509-521.

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis and H. A. Erlich (1988). "Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase." Science **239**(4839): 487-491.

Sanger, F., S. Nicklen and A. R. Coulson (1977). "DNA sequencing with chain-terminating inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A **74**(12): 5463-5467.

Schwarz, J. M., C. Rodelsperger, M. Schuelke and D. Seelow (2010). "MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations." Nat Methods **7**(8): 575-576.

Schwerd, T., A. V. Khaled, M. Schurmann, H. Chen, N. Handel, A. Reis, G. Gillissen-Kaesbach, H. H. Uhlig and R. Abou Jamra (2015). "A recessive form of extreme macrocephaly and mild intellectual disability complements the spectrum of PTEN hamartoma tumour syndrome."

Seelow, D., M. Schuelke, F. Hildebrandt and P. Nurnberg (2009). "HomozygosityMapper--an interactive approach to homozygosity mapping." Nucleic Acids Res **37**(Web Server issue): W593-599.

Shankarling, G. S. and C. C. MacDonald (2013). "Polyadenylation site-specific differences in the activity of the neuronal betaCstF-64 protein in PC-12 cells." Gene **529**(2): 220-227.

Strachan, T. and A. P. Read (2011). Human molecular genetics / Tom Strachan and Andrew Read. New York Garland Science/Taylor & Francis Group.

Sudhof, T. C. (2012). "The presynaptic active zone." Neuron **75**(1): 11-25.

Syed, I. B. (2002). "Islamic Medicine: 1000 years ahead of its times." Journal of the international society for the history of islamic medicine **1**: 8.

Tan, M. H., J. Mester, C. Peterson, Y. Yang, J. L. Chen, L. A. Rybicki, K. Milas, H. Pederson, B. Remzi, M. S. Orloff and C. Eng (2011). "A clinical scoring system for selection of patients for PTEN mutation testing is proposed on the basis of a prospective study of 3042 probands." Am J Hum Genet **88**(1): 42-56.

Teresi, R. E., K. M. Zbuk, M. G. Pezzolesi, K. A. Waite and C. Eng (2007). "Cowden syndrome-affected patients with PTEN promoter mutations demonstrate abnormal protein translation." Am J Hum Genet **81**(4): 756-767.

Thermo Fisher. (2015). "SYBR® Select Master Mix." Retrieved 18 September, 2015, from <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/4472903>.

Toonen, R. F. and M. Verhage (2007). "Munc18-1 in secretion: lonely Munc joins SNARE team and takes control." Trends Neurosci **30**(11): 564-572.

Watanabe, Y., N. Katayama, K. Takeuchi, T. Togano, R. Itoh, M. Sato, M. Yamazaki, M. Abe, T. Sato, K. Oda, M. Yokoyama, K. Takao, M. Fukaya, T. Miyakawa, M. Watanabe, K. Sakimura, T. Manabe and M. Igarashi (2013). "Point mutation in syntaxin-1A causes abnormal vesicle recycling, behaviors, and short term plasticity." J Biol Chem **288**(48): 34906-34919.

Wei, Z., W. Wang, P. Hu, G. J. Lyon and H. Hakonarson (2011). "SNVer: a statistical tool for variant calling in analysis of pooled or individual next-generation sequencing data." Nucleic Acids Res **39**(19): e132.

WHO DIMDI. (1994 - 2013, 21.09.2012). "ICD-10-GM Version 2013 Kapitel V Psychische und Verhaltensstörungen (F00-F99) Intelligenzstörung (F70-F79) ", from <https://www.dimdi.de/static/de/klassi/icd-10-gm/kodesuche/onlinefassungen/htmlgm2013/block-f70-f79.htm>.

Willems, P. J., R. Gatti, J. K. Darby, G. Romeo, P. Durand, J. E. Dumon and J. S. O'Brien (1991). "Fucosidosis revisited: a review of 77 patients." Am J Med Genet **38**(1): 111-131.

Zhang, X. C., A. Piccini, M. P. Myers, L. Van Aelst and N. K. Tonks (2012). "Functional analysis of the protein phosphatase activity of PTEN." Biochem J **444**(3): 457-464.

11 Anhang

11.1 Verwendete Primer

	ID_F	Sequenz_F	ID_R	Sequenz_R
MR140	NOS3_X14_F	caccctcacacctcctctc	NOS3_X14_R	cctctttagctccctgctc
	TSKS_X7_F	gccatagctgattggcctac	TSKS_X7_R	ggcgagataggtgagctctg
	CAPN6_X4_F	cctcatgtaccctgatagcagac	CAPN6_X4_R	tgtggtctggtgaataacacttg
	ARVCF_X12_F	gggattccctctctcaggac	ARVCF_X12_R	ggggatgatggatgagagc
	PRELID1_X5_F	GGGTGAATACCACCTTTTAG TG	PRELID1_X5_R	CTGCTGCTGCTTCTTGGTG
	C20orf186_X11_F	ccctgggtacctctatgct	C20orf26_X11_R	ggagaccatgtggctctgctc
	ADAMTSL3_X28_F	gatttacctgcactgtgctttt	ADAMTSL3_X28_R	ggagagaatgtgtgctgctc
	VPS13B_X9_F	tgggaggaaaaatttaagga	VPS13B_X9_R	CTGAATGCAAAGCAAACCTGA
	RTTN_X31_F	cgcttacggataccatcaca	RTTN_X31_R	tgttaggaaaaaggcttattga
	TNFRSF18_X6_F	ACCTTCCTGCACCCACTTCT	TNFRSF18_X6_R	AGCTGAGGAGTCAGTGCATG T
	PPM1H_X8_F	GTTGGCTACTGTCTGGATATG GG	PPM1H_X8_R	TGCACTGGAATGGGATGC
	SYTL4_X18_F	ggtaatttggggctgtct	SYTL4_X18_R	ggagcaagcaaagaaagtgc
	FUCA1_F	gctgctgtggtgtctactcc	FUCA1_R	gctctgtcctgatcacatgtct
	CYP7B1_X3_F	tccaccatcttcaaaggaac	CYP7B1_X3_R	TCAAGGTCCTCGTGACATA
	KDM4B_X23_F	AGGTTGCTCAGTAGGGCATTG	KDM4B_X23_R	CCACAGCAATCAGGGCTCT
	FCGBP_X4_F	ctctcttcaccactctgc	FCGBP_X4_R	ATACACACTGCTCCAGGAAGG
	CSF2_X1_F	acaggccacattctctcac	CSF2_X1_R	gccaggagatccacagttc
MR134	PCSK6_X6_F	aaacaggaggctgctgagac	PCSK6_X6_R	aatgacatctctggctctg
	HAO1_X2_F	ccagtccacacagctggaaag	HAO1_X2_R	tgaagtcatgtctgtttgg
	LCE3C_X1_F	tcttgcttagaaagtgcttc	LCE3C_X1_R	cttgtgaaagccagaacaagg
	FMO1_F	tgaaggatgtctttgattgc	FMO1_R	aagtgtcccacacAttcagc
	FOXH1_X1_F	tctcaggactggctccactg	FOXH1_X1_R	CACCCAAAGGCAACTCAGG
	LCE3C_X1_Fb	agacaggaagcaccttctgg	LCE3C_X1_Rb	ttatccaaatgcattgttaggg
	LCE3C_X1_Fc	GAGGGAAGTGTGAGATCCTAT ACAC	LCE3C_X1_Rc	AGCATGTTGTCAGGAATGCAC
	TTC9_X1_F	ccactggtgagcagtagcag	TTC9_X1_R	CGCAGTGCTACAAGGACAAG
	BAIAP2L1_X4_F	GGAAATAAATTCATACCAGGT TTGAG	BAIAP2L1_X4_R	CTGAGGTTAGGAGTTCAAGAC CAG
	BAIAP2L1_X3_F	AGCCCACCCTACGACTAAGC	BAIAP2L1_X3_R	TACCTCCTGAGAGCCACACC
	PMFBP1_X7_F	GGGTAAAGGTTTGGGTTTCC	PMFBP1_X7_R	CTGCCTGAAGGAGCTTACC
	SGIP1_X15_F	CAGACAACCCAGCTGACTCC	SGIP1_X15_R	ACTTGGACCATGACTGTGAGC
	SGIP1_X20_F	GGAATTGTAAGAGCCTGCCTT T	SGIP1_X20_R	GATGAACAAACTGTTGCTGAT ACAG

	EPHA8_X3_F	CTGCAAGGAGACCTTCAACC	EPHA8_X3_R	GTCTGTTCCCTCCCTCTCC
	RGS2_X4_F	GCAGCAGAGTGCCAACATAAG	RGS2_X4_R	CTAGCCCGCTTTGTCCTTG
	MED13L_X27_F	GCCCAGTGATTCCATACTCC	MED13L_X27_R	ACCAGAGGAGGAAAGAAAGT AGG
	CES2_X5_F	AACCCAGGCTTTGATACAGG	CES2_X5_R	CTGAGAAAGTAGCAGGGACAG G
	MANBA_X3_F	TGTCACATGGCCAATTATGC	MANBA_X3_R	AAGATAAGCTGGATCACTCAA AGG
	MPPED2_X4_F	CCAGGCACTGAAAGGATGC	MPPED2_X4_R	GTGCGACGACAATTTCAAGG
	BAIAP2L1_X4_Fb	TCTCCTGTCTGCTGCTGATG	BAIAP2L1_X4_Rb	TCTGTGTTCCCTGTTCT GTTTC
MR141	LAMC1_X1_F	GATGAGAGGGAGCCATCG	LAMC1_X1_R	ggagaaaggagttctgTgtgg
	PHKA1_X10_F	ctggacacaggggtgtatact	PHKA1_X10_R	ctgagtgatgacagactttattgtg
	PTEN_X6_F	aatggctacgaccagttacc	PTEN_X6_R	tgtccaatacatggaaggatg
	ACTR1A_X8_F	aagggcTccaagagaagagac	ACTR1A_X8_R	ttccaggaGgcctatcttg
	DLG5_X15_F	AGCCTTCAGAGTCTGCCTTG	DLG5_X15_R	tgaccattgctttacctctgg
	DRD4_X3_F	AGCACAGTTGGAGCCGC	DRD4_X3_R	CGCCTCCATCTTCAACCTG
	PLK5P_X14_F	TCTGGGTTGAACAGTCATGC	PLK5P_X14_R	CtacccttgctgGTGAGC
	PKN1_X20_F	cttactgggcagggaaatg	PKN1_X20_R	ccacattgggctgagtgc
	C8orf85_X2_F	CACAGTGTTAGCCAGGATGG	C8orf85_X2_R	tttcatatggacagctttgtgc
	MR142	DNAH8_X42_F	tcctgtaacgtgtcatccca	DNAH8_X42_R
PDXP_X2_F		aatccacctccctggacttc	PDXP_X2_R	GAATCTTCAGCAGGCACCAG
LAMB_4_F		ggaccagcacaaggaatg	LAMB_4_R	TAGCAAAGCAGCGATCAGG
DNAH8_X42_Fb		GATTATATGAGATCACGTCAC TTGG	DNAH8_X42_Rb	TTGGTTCTCCTGACTGTAATG G
GPR50_X2_F		ACTCAGGGAGGTCACTGTCCG	GPR50_X2_R	CATTCCAGATCCTCCTCTGC
ZNF366_X2_F		TGATCAAAGACGAGGATGTGC	ZNF366_X2_R	GCTGGGCTTAATGGGTTCC
MR143	WDR1_X8_F	acagtcgagtggaagaagc	WDR1_X8_R	catgtccaagaaagcaacc
	ARHGEF4_X14_F	AGCTCTTGGATGTGGTCAGC	ARHGEF4_X14_R	ACTTGCAGGCAGAGGAAGG
	FAM83H_X5_F	CTTGAAGGCGTCCATCTCC	FAM83H_X5_R	tcctgcagacctcacatcc
	CSTF2_X11_F	aaacagcccaagtgcagaagg	CSTF2_X11_R	atgtggaacagtaggtttgc
	RPS13_X5_F	gcatcttgagaggaacagaa	RPS13_X5_R	aataaagacaagcagagggc
	MGMT_X1_F	cgagcctagtccaggaac	MGMT_X1_R	atgagcagactgcctcag
	RPS13_X5_Rb	GCCCTCTGCTTGTCTTTATT		
MR139	NOS1_X21_F	ggccctgtctatgatcc	NOS1_X21_R	gcaacagacaccctctcc
	ARHGEF19_X8_F	gttgccagctcccagat	ARHGEF19_X8_R	agccctcagtgctcacct
	MAP4K1_X31_F	cctgggcaacaagagtgaac	MAP4K1_X31_R	ccaactaacacagcagaagg
	CEBPD_X1_F	CAGCGAGGTGACAGCCTC	CEBPD_X1_R	CAAGCTCACACGGTCTGT
	QRFPR_X1_F1	GGTTAAGAGAGAAGGAGCGA AGG	QRFPR_X1_R1	GCAGGCGCTTAACATTACCC
	CADPS2_X9_F	TTGAGAAGTCTATCTTAGAGT GATT	CADPS2_X9_R	ACCCAGAATAAGCTAACTCAT TTTG
	CACNA1B_X45_F	GCACCACCTGAATTCTGTCC	CACNA1B_X45_R	GGAGCTTGATGAGAACACAG C
	ADSL_X2_F	TTTAAGGGTTGGGAGATAGGG	ADSL_X2_R	ACTTCTCAACTGGACAACAT

				C
	TRAPPC9_X19_F	ggaatgctgcaatcatcagc	TRAPPC9_X19_R	gggacatcacaggaaagatgg
	DLG4_X2_F	GTCACAGGAACAGAACTGAGT TACC	DLG4_X2_R	TTCCTGTGTTGGCATCTTCC
	TMCC2_X3_F	GTGGCTGTCAGGGATACTGC	TMCC2_X3_R	AGTGCTCCAGCTTCTTGTGC
MR39	STX1Awt_Fb	acaaagtcgtccaagtaaagag	STX1A_Rb	CATGACCTCCACAAACTTTCT G
	STX1Amt_Fb	acaaagtcgtccaagtaaagac		
	STX1Awt_Fc	aaagtcgtccaagtaaagag	STX1A_Rc	CTTTCTGGACAGCGTGG
	STX1Amt_Fc	aaagtcgtccaagtaaagac		
	STX1Ak_Fd	CTGGAAGAACTCATGTCCGAC	STX1Ak_Rd	TTGTACTIONCCGACATGACCTCC

11.2 PCR mit Wintaq: MasterMix und Cyclor-Programm

Reagenzien	Volumen (μ l)
DNA (25ng/μl)	1,5
Primer forward (10 pM)	1
Primer reverse (10 pM)	1
WinTaq-Puffer	2
dNTPs (2,5 mM)	1
WinTaq	1,5
optional: DMSO	1
Betain (5 M)	4
Aqua dest.	auf 20 μ l

PCR-Programm: TD Wintaq

11.3 PCR mit Invitrogen: MasterMix und Cyclor-Programm

Reagenzien	Volumen (μ l)
DNA (25ng/ μ l)	1,5
Primer forward (10 pM)	1
Primer reverse (10 pM)	1
10 x Puffer	1,5
MgCl ₂ (2,5 mM)	0,45
dNTPs (2,5 mM)	0,3
Invitro Taq	0,07
optional:	
DMSO	0,75
Betain (5 M)	3
Aqua dest.	auf 18,5 μ l

Programm: TD_invitro

11.4 Sequenzierreaktion: MasterMix und Cyclor-Programm

Reagenzien	Volumen (μ l)
PCR-Produkt	5
Primer forward oder reverse (2,5 pM)	1
BigDye Puffer	2
BigDye	0,2
Aqua dest.	auf 10 μ l

Programm: BigDye55_2Min.

11.5 cDNA Herstellung: MasterMix und Cyclor-Programm

Reagenzien	Volumen (μ l)
5x First Strand Buffer	4
10 mM dNTPs	2
Random Primers	1
0,1 M DTT	2
SuperScript II	1
RNAse Out	0,6
Gesamtvolumen	10,6

MasterMix zu denaturierter RNA geben; 10 min bei Raumtemperatur inkubieren

Cyclor-Programm: CDNA-Synthese.hyb (2 h, 37°C; 3 min, 94°C; 10 min, 4°C)

11.6 quantitative PCR: MasterMix und Cycler-Programm

MasterMix

Reagenzien	Volumen (μ l)
SYBR Green Kit	7,5
Primer_F	0,2
Primer_R	0,2
H2O	5,1
Total	13

96-Well Platte: 60 μ l MasterMix in jedes Well, 10 μ l cDNA, 50x mischen

384-Well Platte: 15 μ l auf 384-Well Platte, Quadruplikate, bis 4000rpm abzentrifugieren

Programm

Dauer	Temperatur ($^{\circ}$ C)	Zyklen
2 min	50	1
15 min	95	1
15 sec	95	50
30 sec	55	50
30 sec	72	50

Endogene Kontorllen: B2M, TBP, HPRT

11.7 Verwendete Antikörper

Primärantikörper

Bezeichnung	Firma	Host	
AP4E1	Abnova	Mouse	polyclonal
AP4S1	Santa Cruz	Goat	polyclonal
NEO1	Santa Cruz	Goat	polyclonal
c9orf4	Abcam	rabbit	polyclonal
bActin	Abcam	Mouse	polyclonal
HA tag	Abcam	rabbit	polyclonal
STX1A	SynapticSystems	Mouse	monoclonal

Sekundärantikörper

	Firma	Host		Verdünnung
mouse	life technologies	goat	Alexa Fluor 488 (grün)	1:500
mouse	life technologies	goat	HRP	1:30.000
rabbit	life technologies	goat	Alexa Fluor 594 (rot)	1:500
rabbit	life technologies	goat	HRP	1:30.000