

Universität Ulm
Institut für Humangenetik
Leiter: Prof. Dr. W. Vogel

**Suche eines Kandidatengens für das Branchio-Oculo-Facial-Syndrom
durch genomweites Screening**

Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Universität Ulm

vorgelegt von
Elena Guillén Posteguillo
aus Guardamar del Segura/Alicante (Spanien)

2007

Amtierender Dekan: Prof. Dr. Debatin

1. Berichterstatter: Prof. Dr. Just

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Paiss

Tag der Promotion: 26.10.2007

An Jakob

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis.....	III
1. Einleitung.....	1
1.1 Branchio-Oculo-Facial-Syndrom (BOF-Syndrom; BOFS).....	1
1.2 Ähnliche Syndrome und potenzielle Kandidatengene.....	3
1.2.1 EYA-Familie und BOR-/BO-Syndrome.....	4
1.2.2 Studien an Entwicklungsgenen als potenzielle Kandidatengene bei BOFS	5
1.3 Fragestellung.....	19
2. Material und Methoden.....	20
2.1 Material.....	20
2.1.1 BOFS-Familie.....	20
2.1.2 DNA der BOFS-Familie	20
2.1.3 PCR.....	21
2.1.4 Kapillarelektrophorese Komponenten (Applied Biosystems, Weiterstadt).....	22
2.1.5 Agarosegelelektrophorese Komponenten.....	23
2.1.6 DNA-Isolierung	23
2.1.7 Kits.....	23
2.1.8 Software.....	24
2.1.9 Datenbanken.....	24
2.1.10 Geräte.....	24
2.2 Methoden.....	25
2.2.1 Isolierung von DNA	25
2.2.2 Exponentielle Amplifikation linearer DNA (GenomiPhi).....	26
2.2.3 PCR-Grundlagen (109).....	27
2.2.4 Agarosegelelektrophorese.....	29
2.2.5 DNA-Fragmentanalyse.....	29
2.2.6 Anpassungsmodul (65).....	31
2.2.7 Genotyp-Erstellung mit Cyrillic.....	32
2.2.8 Haplotyping Analysis (SimWalk v.2.91).....	32
2.2.9 HaploPainter (Version V.024 beta).....	33
2.2.10 Gensuche in Regionen identischer Haplotypen bei Erkrankten.....	33
2.2.11 Suche nach genetisch bedingten Erkrankungen.....	34
2.2.12 GeneRetriever.....	34

2.2.13 Begründung der Genausschlüsse.....	34
3. Ergebnisse.....	36
3.1 DNA-Extraktion / -Isolation.....	36
3.2 GenomiPhi	36
3.3 PCR und Kontrolle durch Gelelektrophorese.....	37
3.4 Segregationsanalyse mittels Fragmentanalyse im ABI Prism® 3100 Analyzer.....	38
3.5 Anpassungsmodul.....	40
3.6 Cyrillic.....	40
3.7 Anwendung von SimWalk2 (Version 2.91).....	41
3.8 HaploPainter.....	43
3.9 Untersuchung der verdächtigen chromosomalen Regionen: GeneRetriever / OMIM-Datenbank / NCBI mapview.....	44
4. Diskussion.....	85
4.1 Verwandte Krankheitsbilder.....	87
4.1.1 Branchio-Oto-Renal-Syndrom (BOR-Syndrom; BORS).....	87
4.1.2 Branchio-Otic-Syndrom (BO-Syndrom; BOS).....	87
4.1.3 Townes-Brocks-Syndrom (TB-Syndrom; TBS).....	88
4.2 Kriterien zur Eingrenzung der Ergebnisse aus der Segregationsanalyse.....	89
4.2.1 Auswahl der Gene.....	89
4.2.2 Embryonalentwicklung der orofacialen Strukturen aus den Branchialbögen ...	91
4.2.3 Augenentwicklung.....	92
4.2.4 Nierenbildung	93
4.3 Beispiele putativer BOFS-Kandidatengene.....	93
4.4 Inhalt der Krankheitsbildtabellen und Syndromologie.....	97
5. Zusammenfassung.....	100
6. Literaturverzeichnis.....	102

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

ad	bis
bp	<u>B</u> asenpaare
BOS	<u>B</u> ranchio- <u>O</u> tic- <u>S</u> yndrom
BOFS	<u>B</u> ranchio- <u>O</u> culo- <u>F</u> acial- <u>S</u> yndrom
BORS	<u>B</u> ranchio- <u>O</u> to- <u>R</u> enal- <u>S</u> yndrom
BPES	<u>B</u> lepharophimosis- <u>P</u> tosis- <u>E</u> pikantus- <u>I</u> nversus- <u>S</u> yndrom
cM	<u>C</u> enti <u>M</u> organ
dNTP	<u>D</u> esoxy- <u>N</u> ukleosidtriphosphat
EDTA	<u>E</u> thylendiamintetraacetat
ES	<u>E</u> mbryonale <u>S</u> tammzellen
eyaHR	eya <u>h</u> och konservierte C-terminale <u>R</u> egion
eyaVR	eya <u>v</u> ariable <u>R</u> egion
FAM	6-carboxyfluorescein
Gbp	<u>G</u> igabasenpaare
GDB	<u>G</u> enomic <u>D</u> atabase
HD	<u>H</u> omöodomäne oder <i>High density</i>
HEX	4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein
HIDI	Ugs. für <u>H</u> igh <u>D</u> ye
Kbp	<u>K</u> ilobasenpaare
Kegg	<i>Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes</i>
LKG	<u>L</u> ippen- <u>K</u> iefer- <u>G</u> aumenspalte
M	<u>M</u> olar
mA	<u>M</u> illiampere
MAP-Kinase-Weg	<i>Mitogen-activated-protein-Kinase-Weg</i>
Mbp	<u>M</u> egabasenpaare
MGI	<i>Mouse Genome Informatics</i>
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
<i>Mio</i>	<i>Millionen</i>
mM	<u>M</u> illimolar
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NED	2',7',8'-benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein
NEEO	<u>N</u> iedrige <u>E</u> lektroendoosmose
OD	<u>O</u> ptische <u>D</u> ichte
OEC	<u>O</u> varielle <u>E</u> pithelzellen
OFCS	<u>O</u> tofaciocervical-Syndrom
OMIM	<u>O</u> nline <u>M</u> endelian <u>I</u> nheritance in <u>M</u> an
ORFs	<i>Open reading frames</i>
p	Kurzer Arm eines Chromosoms
PCR	<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction = Polymerase-Ketten-Reaktion
POF	<i>Premature ovarian failure</i> (vorzeitige Menopause)
q	Langer Arm eines Chromosoms
RFLP	<u>R</u> estriktionsenzym- <u>F</u> ragment- <u>L</u> ängenpolymorphismus
rpm	<u>R</u> otationen pro <u>M</u> inute
RT	<u>R</u> aum <u>t</u> emperatur

SAGE	<i>Serial Analysis of Gene Expression</i>
SDS	<u>S</u> odium <u>d</u> odecylsulfate (Natriumdodecylsulfate)
SE	<u>S</u> odium-(Natrium)- <u>E</u> DTA
SNP	<u>S</u> ingle- <u>N</u> ucleotid- <u>P</u> olymorphismus
STS	<i>Sequence-tagged site</i>
T ^a	<u>T</u> emperatur
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	<u>T</u> ris- <u>B</u> orat- <u>E</u> DTA
TBS	<u>T</u> ownes- <u>B</u> rocks- <u>S</u> yndrom
TE	<u>T</u> ris- <u>E</u> DTA
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
Tris	2 Amino-2-(hydroxymethyl)-propan-1,3-diol
U/ml	<i>Units pro Milliliter</i> = Einheiten pro Milliliter
UV	<u>U</u> ltraviolett
V	<u>V</u> olt
VBA	<i>Visual Basic for Applications</i>
VIC	2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein
Vol.	<u>V</u> olumen
VNTR	<i>Variable number of tandem repeats</i>
WAGR-Syndrom	<i>Wilms Tumor-Aniridia-Genitourinary Anomalies-Mental-Retardation-Syndrom</i>
w/v	<u>W</u> eight per <u>v</u> olume

Hinweis: Gene des Menschen sind in Großbuchstaben, die anderer Lebewesen in Kleinbuchstaben *kursiv* geschrieben. Proteine werden in Standardschreibweise groß (Mensch) oder klein (andere) genannt.

1. EINLEITUNG

1.1 Branchio-Oculo-Facial-Syndrom (BOF-Syndrom; BOFS)

Das Branchio-Oculo-Facial-Syndrom (BOFS, MIM 113620 (80)) steht für verschiedene Defekte des Kopf-Hals-Bereiches sowie begleitende Fehlbildungen in anderen Organsystemen und Körperteilen. In der Erstbeschreibung dieses Krankheitsbildes wurden zwei nicht-verwandte Kinder mit Branchialspalten, Pseudospaltbildung der Oberlippe und einer „ungewöhnlichen“ Facies vorgestellt, was damals als Branchialspalten-Syndrom bezeichnet wurde (42). Weitere Fälle mit ähnlichen Symptomen wurden entdeckt. Das Branchio-Oculo-Facial-Syndrom i.e.S. wurde zum ersten Mal durch Fujimoto beschrieben und benannt (33). Nach Entdeckung einer Übertragung von Vater zu Sohn, sowie einer fast gleichen Anzahl von männlichen und weiblichen Betroffenen, wurde ein autosomal dominanter Erbgang des Syndroms postuliert (33).

Das Spektrum der Zeichen und Symptome des BOFS ist breit und kann von Patient zu Patient sehr unterschiedlich sein. Es existieren leichte bis sehr schwere Formen der Erkrankung. So wurden unvollständige Penetranz und variable Expressivität für den variablen intra- und interfamiliären Phänotyp verantwortlich gemacht (59). Die Leitsymptome der Krankheit zeigen sich vor allem im Kopf-/Halsbereich. Als Ursache werden Entwicklungsstörungen der Branchialbögen und deren Derivate vermutet. Als mögliche pathognomonische Zeichen fallen im Hals-/Nackbereich beidseitige Branchialspalten und Anomalien, wie postaurikuläre Fisteln entlang des oberen Kopfes des Sternocleidomastoidmuskels, auf. Hautdefekte im Halsbereich treten vor allem hinter den Ohren, viel seltener supra-aurikulär, mit oder ohne drainierendem Sinus, auf (70). Unabhängig von ihrer Lokalisation kommen diese Läsionen in Verbindung mit aplastischer, „hemangiomatöser“, oder anderweitig anormaler Haut vor. Die Halsläsionen sind oft von untypischen Hautarten, wie zum Beispiel epithelialen Branchialbogenderivaten, bedeckt (70). Durch histologische Untersuchungen von Halsläsionen wurde nicht-keratinisiertes mehrschichtiges Epithel mit faserigen Zentren entdeckt. Diese erinnern an ektopisches Thymusgewebe (128). Abnormales Thymusgewebe kann, infolge einer gestörten Wanderung oder gestörten Rückbildung (Thymusinvolutions) des Thymusprimordiums, überall zwischen Thyroidknorpel und Perikard auftreten (27).

Weitere häufige Zeichen des BOFS sind eine Pseudospaltbildung der Oberlippe und Lippengrübchen. Diese Anomalien können isoliert oder zusammen mit Gaumenspalten auftreten, zum Beispiel in Form einer Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. Die Oberlippe kann, wenn nicht wirklich gespalten, lymphomatös oder vorstehend gewölbt sein (79). Auch sind hypertrophe Falten an den Philtrumseiten (*pillars*) beschrieben worden (70). Diese können als Pseudospalte oder schlecht reparierte Lippenspalte interpretiert werden (33).

Maxillar- und Mandibular-Hypoplasie (Micrognathie) wurden bei einem Patienten beschrieben (93). Des Weiteren wurden Malar- und Mastoid-Hypoplasien mit möglicher Abwesenheit der Nasennebenhöhlen beschrieben. Ferner können auch bei den Zähnen Abnormalitäten auftreten. Etwa 37% der erkrankten Personen haben kleine oder weit auseinander stehende, fallweise sogar keine Zähne (33). Hypodontie, zusammen mit asymmetrischen Brüsten und Angststörungen, wurden vor kurzem als neue Symptome im Rahmen eines *Follow-Up* bei einer am BOFS erkrankten Patientin beschrieben (72). Unterentwickelte Mamillen mit/ohne vergrößertem Abstand wurden bei Betroffenen beobachtet. Auch Patienten mit mehreren Brustwarzen sind beschrieben worden (79).

Bei den Augen sind verschiedene Auffälligkeiten bekannt: Mikrophthalmie oder sogar Anophthalmie, Kolobome der Retina und/oder der Iris, angeborener Katarakt und/oder Strabismus, Stenosen des Tränen-Nasengangs und Hypertelorismus. Auch tritt oft einseitige oder beidseitige Blindheit auf. Deshalb spielen Augenärzte eine wichtige Rolle bei Diagnose und Behandlung des BOFS. Das BOFS stellt sogar einen Teil der Kolobomdifferentialdiagnose dar (128).

Anhand von Nasenphänotypen ist das BOFS ebenfalls definierbar. Dazu gehören Nasendeformitäten wie eine sehr breite Basis mit abgeflachter Nasenspitze, sowie eine allgemeine Asymmetrie (33).

Tiefsitzende, nach hinten rotierte Ohren mit hypoplastischer oberer Helix sind bei manchen Betroffenen zu sehen. Eine gelegentlich auftretende Gehörlosigkeit (sensorineural oder als Schalleitungsdefekt) dürfte auf einen Branchialbogenentwicklungsdefekt zurückzuführen sein. Ungewöhnliche supraaurikuläre Fisteln können ein Hinweis auf embryonale Ohrvesikel sein. So wurde z.B. bei einer Mutter und deren Sohn ein supraaurikulärer Sinustrakt als Überrest der Ohrbläschenentwicklung beschrieben (79).

Ein ungewöhnlich kleiner Kopf, ebenso wie eine enge und kleine Stirn sind auffällig (33; 70). Subkutane Kopfharyzysten und vorzeitiges Ergrauen der Haare wurden wiederholt genannt. Zu den Anomalien des ektodermalen Epithels gehören hypoplastische Fingernägel (33).

Bei der Bildung der Nieren kann eine Entwicklungsstörung eintreten, welche sich beim BOF-Syndrom entweder in einer hypoplastischen, einer dysplastischen oder einer aplastischen Niere äußert. Bei den nicht-craniofacial Symptomen sind Nierenanomalien am häufigsten. Skelett-, Gehirn- und Herzfehlbildungen sind beim BOFS eher selten (79). Dennoch sind manchmal skelettale Fehlbildungen wie Polydactylien (von Fingern und Zehen), hypoplastische Daumen und Nägel oder eine Vierfingerfurche beobachtet worden. Auch kleine Auffälligkeiten wie Clinodactylie des fünften Fingers oder Brachydactylie sind beschrieben worden. Sogar ein Fall mit präaxialer Polydactylie ist bekannt. An der Wirbelsäule wurden vereinzelt Kyphose oder Lordose beobachtet (MIM 113620).

Die Hälfte der BOFS-Fälle zeigen eine intrauterine Wachstumsretardierung und fast 40% postnatalen Minderwuchs (70). Eine mäßige Entwicklungsverzögerung findet sich dabei bei normaler Intelligenz.

Die Pathogenese des BOFS ist noch nicht bekannt. Es wird vermutet, dass das verantwortliche Gen im Verlauf der Embryonalbildung an der Entwicklung unterschiedlicher Organsysteme beteiligt sein muss. Das Spektrum der Anomalien beim BOF-Syndrom führte zu einer Hypothese, wonach BOFS auf einen genetischen Defekt in einem Gen aus dem epidermalen Wachstumsfaktorensystem zurückzuführen sei (70).

1.2 Ähnliche Syndrome und potenzielle Kandidatengene

Seit der ersten Beschreibung des BOFS (33) sind nur einzelne Fälle betroffener Personen und nur eine einzige sich über drei Generationen erstreckende Familie mit mehreren Betroffenen entdeckt worden. Auf Grund der Unkenntnis der genetischen Ursache ist es schwierig zu unterscheiden, ob Symptome vom BOFS oder von anderen Syndromen mit ähnlichem Phänotyp herrühren. Man könnte von einem Syndromkreis sprechen, der aus den Branchio-Otic-Syndromen Typ 1-3 (BO-Syndrom 1-3; BOS1-3, MIM 602588, 120502, 608389), dem Branchio-Oto-Renal-Syndrom (BOR-Syndrom; BORS; Melnick-Fraser-Syndrom; MIM 113650), dem Townes-Brocks-Syndrom (TB-Syndrom; TBS; MIM 107480) und zuletzt dem BOF-Syndrom besteht. Vereinzelt wurden krankheitsverursachende Mutationen in Kandidatengenen der unterschiedlichen Syndrome beschrieben. Ihre potenzielle Beteiligung am BOFS wurde in mehreren Publikationen ausgeschlossen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Entwicklungsstörungen bei BOS, BORS und TBS durch ein gemeinsames Netzwerk von Interaktionsfaktoren verursacht sein können. Diese Hypothese muss aber noch durch weitere Genanalysen zur Eingrenzung der

Kandidatengenregion bestätigt werden, was auch Gegenstand der vorliegenden Arbeit sein wird.

Nachfolgend werden einige potenzielle BOFS-Kandidatengene vorgestellt, welche in verwandten Krankheitsbildern eingehend untersucht wurden oder deren Expressionsmuster eine Beteiligung am BOFS nahelegen. Die verwandten Krankheitsbilder selbst sind im Diskussionsteil ab Seite 87 beschrieben.

1.2.1 *EYA*-Familie und BOR-/BO-Syndrome

Ein in seinen phänotypischen Ausprägungen dem BOFS sehr ähnliches Krankheitsbild ist das BOR-Syndrom. Es ist eine autosomal dominant vererbte Erkrankung, die durch verschiedene Störungen in Branchial-, Gehör-, und Nierenbereichen charakterisiert ist. *EYAI* wurde als Kandidatengene für das BOR-Syndrom gefunden (1). *EYAI* bezeichnet eines der Paralogen aus der *EYA*-Familie, wobei sich der Name *EYA* von dem Drosophila-Ortholog *eyes absent (eya)* ableitet. Bei Drosophila trägt *eya*, synergistisch mit *eyeless (ey)* und *dachshund (dach)* zur Ausbildung der Augen bei. Das menschliche *EYAI*-Gen erstreckt sich über 164,8 Kbp und hat 19 Exons, wovon lediglich die Exons 3-19 ein offenes Leseraster zeigen und damit proteinkodierend sind. *EYA1* hat eine, aus 271 Aminosäuren bestehende, hoch konservierte C-terminale Region (*eyaHR*), die auch bei den menschlichen *EYA2*- und *EYA3*-Genprodukten gefunden worden ist. Daher wird *EYA* als Gen-Familie betrachtet. Der Amino-Terminus besteht aus einer prolin/serin/threoninreichen variablen Region (*eyaVR*) (10; 153). Für *EYAI* wurden bislang 14 verschiedene Mutationen bei 20 BOR-Patienten entdeckt, die sich in oder in der Nähe der *eyaHR*-Region (*Eya box*) befanden.

Die phänotypischen Ähnlichkeiten und Überlappungen der Symptome bei BO-, BOF- und BOR-Syndrom führten zu der Annahme, dass BO- und BOR-Syndrom möglicherweise für den *EYAI*-Locus allelisch sind. Zunächst wurde diese Hypothese bestätigt und BOR- und BO-Syndrom als allelische Varianten von *EYAI* bezeichnet (141). Spätere Genanalysen konnten diese Behauptung allerdings widerlegen (61). Mutationen am *Eya*-Locus wurden als Ursache des Otofaciocervical-Syndroms (OFCS; MIM 166780) beschrieben. Anhand der Lokalisation der verursachenden Mutation und der Symptomüberlappung wurden OFCS und BORS als allelische Varianten angesehen (102). Bei diesem Syndrom entstehen neben anderen Symptomen, Halsfisteln und Gehörlosigkeit als Schallleitungsdefekt wie beim BOFS. Vor kurzem wurde allerdings bei einem Patient mit OFCS eine

Spleißmutation entdeckt, die den *EYAI*-Leserahmen verändert (31). In Mausexperimenten wurde *Eya3*-Expression in den embryonalen Branchialbögen und auch während der Augenentwicklung beobachtet (149). Wie oben erwähnt ist sensorineurale Gehörlosigkeit Teil der BOFS-Symptome. Ein anderes Mitglied der *EYA*-Familie, *EYA4*, ist für die autosomal dominant sensorineurale Gehörlosigkeit DFNA10 (MIM 601316) verantwortlich. Vermutlich verursachen auch *Eya4*-Mutationen eine dilatative Kardiomyopathie (145; 114). Untersuchungen bei BOFS-Patienten haben allerdings den *EYAI*-Locus und die Gene *EYA2-4* ausgeschlossen (61, 71, 20). Somit ist bestätigt, dass auch das BOFS nicht mit den BO/BOR-Syndromen allelisch ist und eine andere Erkrankung bezeichnet (133).

In weiterführenden Untersuchungen wurden andere Kandidatengene für das BO-Syndrom gefunden und dadurch mehrere Loci für dieses Syndrom eingegrenzt. Zuerst wurde der Locus 8q13.3 beschrieben, auf dem auch das Gen für das BOR-Syndrom kartiert wurde (123). Später wurden die Regionen 1q31 (60) und 14q21.3-q24.3 (106) hinzugefügt. Für den erstgenannten Locus wird das Syndrom BOS2, für den letztgenannten BOS3 genannt. Seitdem ist bekannt, dass das BOS genetisch heterogen ist und Mutationen in drei Genen kausal sein können. Daher unterscheidet man seitdem diese drei Varianten des BO-Syndroms.

1.2.2 Studien an Entwicklungsgenen als potenzielle Kandidatengene bei BOFS

Die Entwicklungsprozesse bei Säugetieren werden durch viele verschiedene Gene gesteuert. Es wurde mehrfach gezeigt, dass viele dieser Gene in Netzwerken funktionieren und interagieren können. So erfüllen sie in Prozessen wie Induktion, Expression, Transkription, oder als Wachstumsfaktoren, ihre aktivierende oder reprimierende Funktion. Alle diese Prozesse sind für verschiedene Schritte der Embryonalentwicklung unterschiedlicher Organsysteme, wie z.B. Derivaten der Branchialbögen oder bei der Nierenbildung, unentbehrlich. Die Entschlüsselung dieser Wege und Interaktionen würde viele Geheimnisse der Embryonalentwicklung aufdecken und dazu beitragen, die ersten Schritte des menschlichen Lebens besser zu verstehen. Die nachfolgend beschriebenen Gene wurden vor allem deshalb durch verschiedene im humangenetischen Bereich arbeitende Gruppen untersucht, weil deren räumliches und zeitliches Expressionsmuster eine Beteiligung an der Zellproliferation und Zellmigration während der Embryonalentwicklung vor allem der

Branchialbögen, der Augen und der Niere (also typischen Gewebsbereichen des BOFS) gezeigt haben.

1.2.2.1 *SIX*-Gene

Eine denkbare Ursache des BOF-Syndroms sind Mutationen im Gen *SIX1*, zumal gezeigt wurde, dass Mutationen in *SIX1* für die Entstehung des BO/BOR-Syndroms, sowie die autosomal dominante Gehörlosigkeit am DFNA23-Locus (MIM 605192) verantwortlich sind (106; 107). Die *SIX*-Gene sind Orthologe des Drosophila-Gens *sine oculis* (*so*). Die Nukleotidsequenz der murinen *SIX*-Gene ist mit *so* aus Drosophila (16) teilidentisch. Weitere molekular-phylogenetische Analysen und Vergleiche der Aminosäuresequenzen führten zur Klassifikation der *SIX*-Genfamilie in drei Gruppen: *SIX1/2*, *SIX3/6* und *SIX4/5*. In jeder Gruppe ist auch ein Ortholog der Drosophila-*Six*-Familie vertreten (119). *Six*-Gene haben eine essenzielle Funktion in der Augenentwicklung (120). Zusammen mit Mitgliedern der *Pax*-, *Eya*- und *Dach*-Genfamilien, die unten beschrieben sind, bildet die *Six*-Familie ein bei vielen Spezies hoch konserviertes Netzwerk (9; 96; 14), das zur Entwicklung von Nieren, Muskulatur und Augen befähigt.

Six3 ist für einige Schritte der Augenentwicklung, sowohl bei Fliegen, als auch bei Wirbeltieren, nötig. Es wird gemeinsam mit *Pax6* und *Eya1* am Tag 9.5 der Embryonalentwicklung in der Linsenplakode der Maus exprimiert (91; 149). *Eya1* und *Eya2* werden überlappend mit *Pax6* in den Linsen- und Nasal-Plakoden exprimiert und sind von dessen Expression abhängig, was die konservierte Hierarchie der Augenentwicklung von Insekten und Säugern unterstreicht (149). Eine Co-Expression von *Eya1* mit *Six1* in den embryonalen Ohrplakoden und *Six2* im metanephrischen Mesenchym wurde durch Untersuchungen an *Eya1*-Knockout Mäusen gezeigt (148).

Dach (*dachshund*), ein für die Entwicklung der Facettenaugen bei Drosophila verantwortliches Gen und *Eya* funktionieren synergistisch in der ektopischen Augenbildung (14). Untersuchungen an Hühnern haben die synergistische Regulierung durch *Dach2* und *Eya2* auch bei der Entwicklung der Muskulatur gezeigt. Die synergistische regulatorische Funktion von *Six1*, *Dach2* und *Eya2* konnte auch für die Muskelentwicklung der Wirbeltiere gezeigt werden (44). Zudem wurde eine gegenseitige Aktivierung von *Pax3* und *Dach2* beobachtet (Abb. 1). Diese Daten belegen, dass ein *Pax-Six-Eya-Dach*-Netzwerk sowohl bei der Muskelbildung der Wirbeltiere, als auch bei der Augenbildung in Drosophila während der Embryonalentwicklung genutzt wird (44). Der Mechanismus, über den diese Gene in-

teragieren, wurde auf Proteinebene untersucht. Eine direkte Interaktion zwischen Eya und Six einerseits und zwischen CBP (*CREB Binding Protein*), Eya und Dach andererseits wurde bestätigt und damit die molekularen Grundlagen dieser Interaktionen erklärt (48). Zusammen sollen die Gene der *SIX*-Familie bei der Entwicklung verschiedener Organe kontrollierend bei Zellvermehrung und Regulierung der Zellwanderung während der Morphogenese wirken (56). Ein Beispiel dafür sind Interaktionen von Eya3 und Six1 bei der Regulierung der Zellproliferation. Bei der Muskel-, Hypophysen- und Nierenentwicklung der Säuger ist die synergistische Aktivität von DACH und SIX1 zusammen mit der Phosphatase-Aktivität von EYA-Proteinen nötig, wobei auch das Gen für den *glial cell derived neurotrophic factor (GDNF)* aktiviert wird (69). Die eingangs erwähnte Beteiligung von *SIX1*-Mutationen bei der Pathogenese von BOS/BORS könnte dabei auf einer gestörten Interaktion mit *EYAI* beruhen (126). *SIX3*-Mutationen verursachen die Holoprosencephalie Typ 2 (MIM 157170). Sowohl diese Krankheit als auch das BOFS charakterisieren sich durch craniofaciale Symptome (142; 101). Außerdem aktiviert Six3 die Expression von Genen wie *Pax6* und *Sox2* (SRY-box2), und nimmt an der Nerven- und Augenentwicklung teil (73). Mutationen in *SIX5* rufen Entstehung von Katarakten hervor (112). In embryonalen Augenbechern, Ohrplakoden und der neuralen Retina wurde die Expression von *SIX6* beobachtet (74). *SIX6*-Mutationen wurden bei einem Patient mit bilateraler Mikrophthalmie, Katarakt und Nistagmus entdeckt (35) – Augendefekte, wie sie beim BOFS beschrieben wurden. Wegen dieser Auffälligkeiten wurden *SIX*-Gene auf der Suche nach der Pathogenese des BOFS untersucht. Dabei konnte ein Ausschluss für *SIX1*, *SIX2*, *SIX4* und *SIX6* als potenzielle Kandidatengene des BOFS berichtet werden (53).

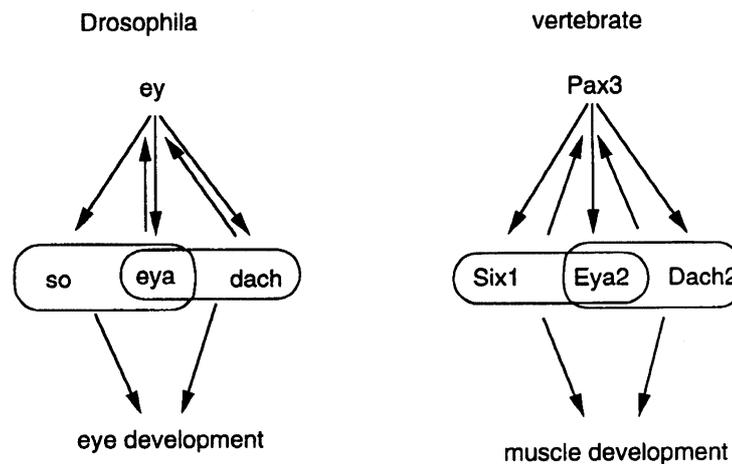


Abbildung 1: *Pax-Six-Eya-Dach*-Netzwerke in *Drosophila melanogaster* und Wirbeltieren.

Drosophila ey interagiert mit *eya*, *dach*, *so* und ist ein Homolog des Vertebraten *Pax6*-Gens. *Pax6* gehört zur *Pax*-Subfamilie *Pax4/6*, jedoch nicht zur *Pax3/7* Subfamilie, deren Vertreter bei Vertebraten die Interaktion mit *Eya*-Genen regeln. *Drosophila so* und Vertebraten *Six1* gehören zur *Six1/2*-Subfamilie. *Six/Eya* oder *Eya/Dach* bilden jeweils einen Komplex und zeigen synergetische Effekte. Modifiziert aus Relaix and Buckingham., 1999 (100, S.3172). Die Pfeile zeigen Induktionswege.

1.2.2.1 *SALL*-Gene / *SALL1*

Das BOFS ähnelt einem anderen branchiootorenen Syndrom: Townes-Brocks-Syndrom. Dieses Syndrom manifestiert sich durch sensorineurale Gehörlosigkeit, aplastische Nieren mit Nierenversagen, übermäßige Helixformation des Ohrs, sowie anderen Merkmalen, die denen des BOFS ähneln. Eine Mutation in *SALL1* (*sal-like 1*) verursacht das TB-Syndrom. *SALL1*, ein Homolog des *Drosophila spalt* (*sal*) Gens, ist für die Regulierung wesentlicher Entwicklungsprozesse verantwortlich, zum Beispiel für die Nierenentwicklung beim Säuger. Dieser Prozess erfolgt durch Interaktionen von *SALL1* mit Mitgliedern des *Pax-Six-Eya-Dach*-Netzwerkes, dem *glial cell derived neurothrophic factor* GDNF und weiteren Faktoren (9). In jüngeren Untersuchungen wurde gezeigt, dass es keine Co-Segregation von Markern aus der *SALL1*-Region mit dem BOFS gibt, so dass der Verdacht, dass das BOFS und das TBS allelisch sind, widerlegt wurde (51).

1.2.2.2 *PAX*-Gene

Die *PAX*-Genfamilie wurde bereits aufgrund ihrer Organisation im *Six-Eya-Dach-Pax*-Netzwerk kurz vorgestellt (s. Abb. 1). *PAX*-Gene wurden wegen ihrer Homologie zu Segmentationsgenen von *Drosophila* entdeckt (6; 24). Von der murinen *Pax*-Familie sind bisher neun Mitglieder bekannt, die anhand von Sequenzübereinstimmung, Genaufbau und Proteinstruktur in vier Gruppen zusammengefasst werden (143). Alle *PAX*-Proteine haben eine gemeinsame DNA-Bindungsdomäne (*paired-box domain* = *PAX*), manche eine zweite, oft nur partiell vorhandene Homöodomäne (HD) und / oder ein dazwischen liegendes Octapeptid (95). Die *PAX*-Proteine sind multifunktionelle Transkriptionsfaktoren. Sie sind in unterschiedlichen Geweben und verschiedenen Organsystemen exprimiert und als Entwicklungsgene bekannt. Ihr Expressionsmuster während der Organogenese spiegelt sich in Defekten wieder, welche durch mutierte *PAX*-Gene entstehen (40, 77).

Pax1 wird im Sklerotom exprimiert, einem ventromedialen Derivat der Somiten nach Abschluss deren Entwicklung. Entsprechend zeigen Mäuse mit *Pax1*-Mutationen Anomalien des Skeletts (4). Aktuelle Studien haben Interaktionen zwischen *Pax2* und *Eya1* während der Entwicklung des inneren Gehörorgans aufgezeigt (154). Mutationen in *Pax3*, welches u.a. im Zentralnervensystem, den Neuralleisten und der Extremitätenmuskulatur exprimiert wird, führen im Maussystem zu „*Splotch*“-Mäusen mit *Spina bifida* und *Exencephalie*, die auch experimentell induziert werden konnte (28). Fehlbildungen dieser Strukturen findet man auch beim korrespondierenden Krankheitsbild des *Waardenburg-Syndroms Typ III* (MIM 148820) beim Menschen in Form einer Hypoplasie des skeletto-muskulären Systems (129). *Pax3* wirkt synergistisch mit *Eya2*, *Six1* und *Dach2* an der Muskelentwicklung. Parallel zu dieser Funktion dient dieses Netzwerk in leicht abgewandelter Form auch der Bildung der Augen (44). Da die auf Mutationen in diesen Genen zurückzuführenden Symptome auch beim *BOFS* vorliegen, wurden sie als potenzielle Kandidatengene betrachtet.

Pax6 wurde als *master control gene* für die Morphogenese und Evolution der Augen vorgeschlagen (36). Viele andere Transkriptionsfaktoren, die z.T. Orthologe der *Pax*-Genfamilie darstellen (*sine oculis*, *optix*, *eyes absent*, *dachshund*, *eye gone* und *teashirt*), können experimentell bei *Drosophila* zur Induktion ektopischer Augen führen und unterstützen die Hypothese eines *Master Gens* (122). Im transgenen Mausexperiment zeigte sich, dass heterozygote Knockout *small-eye* (Sey; *Pax6*) Mäuse im Wesentlichen durch Linsendefekte charakterisiert sind, während homozygote *Pax6*^{-/-} Knockouts letal sind. Eine transgene *Pax6*-Überexpression kann den Knockouteffekt kompensieren. Eine Überdosis des *Pax6*-Transgens verursacht jedoch Entwicklungsstörungen des Auges, was

einerseits auf die *in vivo* fein abgestimmte Expression dieses Gens, aber auch auf weitere *Downstream*-Elemente in der *Pax6*- 3'-Region hinweist (113).

Das Expressionsmuster von *Pax2* während der Augen- und Nierenentwicklung macht es ebenfalls zum potenziellen Kandidatengen des BOFS, da dieses sich durch Defekte dieser beiden Organsysteme manifestiert. *Pax2*-Mutationen wurden nicht nur in Tiermodellen, sondern auch beim Mensch (Renal-Colobom-Syndrom; MIM 120330); eine Form von Nierenhypoplasie) gefunden (111; 25).

Für die korrekte Entwicklung des Augensystems ist eine exakt aufeinander abgestimmte Expression von Genen nötig. Die beiden oben genannten Gene *Pax2* und *Pax6* sind an der Entstehung von Augentstiel bzw. Augenbecher beteiligt. Ihre Expression ist aber exklusiv, da sich *Pax2* und *Pax6* in ihrer Expression gegenseitig hemmen (115). In der Evolution der verschiedenen Augentypen (Linsenauge, Grubenaug, Facettenauge) sind *Pax6* und dessen komplette genetische Kaskade konserviert (144), wobei *Pax6* vor allem während der Embryonalbildung des Auges entscheidend ist und im adulten Auge selten exprimiert wird. Die Entwicklung verschiedener Tieraugen während der Evolution ist nur auf einen Wechsel bei der Genregulierung und nur sehr unwahrscheinlich auf neu entstandene Gene zurück zu führen (58).

Verschiedene Studien haben die wichtige Rolle der *Pax*-Gene als Entwicklungsgene bestätigt. In der frühen Schilddrüsenbildung (während der Embryonalentwicklung) spielt *Pax8* eine zentrale Rolle bei der Bildung der Follikel (76). Haploinsuffizienz dieses Gens führt bei Menschen zu angeborener Hypothyreose ohne Kropfbildung. Bei Erwachsenen nimmt es an der Expressionsregulierung spezifischer Schilddrüsenenzyme (z.B. Thyroperoxidase TPO, Natrium/Jod-Symporter NIS, Thyroglobulin TG) teil (140).

Neben ihres Entwicklungscharakters besitzen *Pax*-Gene auch die Fähigkeit, Zelllinien im Sinne eines onkologischen Prozesses zu transformieren, und auch maligne Tumore zu bilden (78). Eine fehlerhafte tumor-spezifische Expression eines PAX3-FKHR-Fusionsproteins als Folge einer Translokation wurde in alveolären Rhabdomyosarkomen gezeigt (5).

Aufgrund der Expressionsmuster von *Pax2* und *Pax8* und deren vermuteter Beteiligung am BOFS wurden diese beiden Gene in Segregationsanalysen untersucht und dabei als BOFS-Ursache ausgeschlossen, so dass diese *PAX*-Gene nicht den Status eines Kandidatengens erhalten können (53).

1.2.2.3 HOX-Gene

Bei *Drosophila* wurde eine neuartige Genfamilie gefunden. Sie besteht aus zwei Gruppen: dem *Bithorax*-Komplex mit drei Homöobox (*Hox*)-Genen (*Ubx*, *Abd-A* und *Abd-B*) und dem *Antennapedia*-Komplex mit fünf Homöobox-Genen (*Lab*, *Pb*, *Dfd*, *Scr* und *Antp*). Die chromosomale Anordnung dieser *Drosophila*-Gene und deren gewebsspezifische Expression wurden bereits 1978 aufgeklärt (68). Ihnen wird eine wichtige Rolle in der Entwicklungskontrolle der anterior-posterior Achse beigemessen (s. Abb. 2). Die *HOX*-Gene sind in der Evolution bis heute sehr konserviert. Sowohl während der Embryonalentwicklung, als auch in erwachsenem Gewebe ist eine koordinierte Expression dieser Gene zu sehen (64).

Im Genom der Mäuse und des Menschen sind 39 *Hox*-Gene gefunden worden, die eine nahe Verwandtschaft zu den homöotischen Genen von *Drosophila* zeigen. Die *HOX*-Gene der Mammalia sind in vier Kopplungsgruppen (Clustern) auf vier verschiedenen Chromosomen verteilt (116).

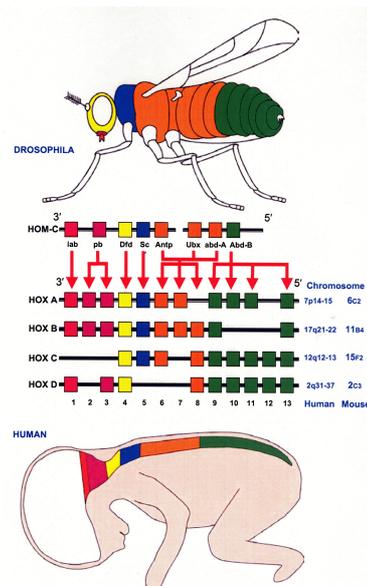


Abbildung 2: Konservierung des *Drosophila HOM-C* Clusters und *HOX*-Gen-Clustern bei Säugern.

Sowohl Nukleotidsequenz als auch Expressionsprofil der vier in Säugetieren gefundenen *Hox*-Gen-Cluster sind konserviert. Während der Embryonalentwicklung korreliert die Gen-Expression mit der Lage jedes Genes auf dem Chromosom. 3' gelegene Gene werden früher und anterior, 5' gelegene Gene dagegen später und posterior exprimiert. Aus Lappin et al., 2006 (64, S.25).

Mutationen in *HOX*-Genen sind oft letal, wobei auch Fehlbildungssyndrome infolge einer *HOX*-Mutation beschrieben wurden, deren Träger lebensfähig sind. Missense-Mutationen

in *HOXD13* führen beispielsweise zu verschiedenen Fehlbildungen der Finger (50). Das Mutations-Spektrum mit Fehlbildungen von Fingern und Zehen wurde inzwischen auf mehrere Gene aus dem auf Chromosom 2 lokalisierten *HOX-D*-Cluster erweitert (64).

Ein Grund, weshalb die *HOX*-Gene speziell bei der Erforschung des BOFS eine wichtige Rolle spielen, ist deren Beteiligung an der Nierenbildung. Hier wurde ihre Beteiligung in Komplementationversuchen an Mäusen und den resultierenden Phänotypen untersucht. Der Ersatz von *Hoxa11* durch das Paralog *Hoxa13* führte zu einer normalen Nierenentwicklung. Der Ersatz durch das Paralog *Hoxa10* führte zu leichten Nierendefekten und der Ersatz durch *Hoxa4* (das kein Paralog von *Hoxa10*, *~11* oder *~13* darstellt), führte zu schweren Nierenanomalien. Diese Ergebnisse beweisen die Ähnlichkeit zwischen Homöoboxen, aber auch, dass die verschiedenen Homöoboxen funktionell nicht gleichwertig sind (151).

Ebenfalls an Mäusen wurde die Rolle von mutierten *Hox11*-Paralogen bei der Nierenentwicklung studiert. Mutiertes *Hox11* führte zu einem Ausbleiben der *Six2*-Expression, wobei die *Eya1*-Expression unverändert war. Daher wurde vermutet, dass die *Six2*-Expression unter Kontrolle der *Hox11*-Gruppe steht (146). Die Funktion des *Six2*-Gens bei der Nierenentwicklung ist noch nicht endgültig aufgeklärt, während die bereits erwähnte regulatorische Hierarchie *Pax-Eya-Six-Dach* für die Organogenese anderer Systeme, wie zum Beispiel der Augenentwicklung belegt ist (41; 96).

Weitere Experimente haben gezeigt, dass *Hox*-Gene für die Morphogenese des Kopf-Hals-Bereichs verantwortlich sind. Beispielsweise führt der Knockout des murinen *Hoxa2*-Gens, welches normalerweise im zweiten Branchialbogen exprimiert wird, zum Verlust von Neuralleistenderivaten aus diesem Branchialbogen. Strukturen des proximalen ersten Branchialbogens duplizieren sich infolgedessen und verschmelzen miteinander (37; 103). Die verbreitete Expression von *HOX*-Genen in dem ersten Branchialbogen, beziehungsweise im Kopf-Gesicht-Bereich, ist auch ein Grund, sie in der Erforschung des BOFS zu berücksichtigen. Andere Homöoboxdomäne-tragende Gene, welche nicht zur *HOX*-Familie gezählt werden, werden ebenfalls im ersten Branchialbogen (Maxillar- und Mandibular-Organisator) exprimiert und spielen bei der frühen Facialentwicklung eine wichtige Rolle. Diese Gene haben lediglich die Kodierung von Transkriptionsfaktoren mit den *HOX*-Genen gemeinsam. Beispiele dafür sind *MSX-1*, *MSX-2*, *DLX1-6* und *BARX-1*. Alle diese Gene haben in *Drosophila* ihr Ortholog (98; 19; 32). *Gsc* (*Drosophila*-Ortholog „Gooseoid“) ist ein Beispiel dieser Homöoboxdomänen-tragenden Gene. *Gsc* Knockout-Mäuse zeigen Defekte im Bereich des Schädels und Gesichts (104; 150).

Bei Erwachsenen ist eine aberrante *HOX*-Expression in verschiedenen Tumoren zu sehen. So adoptieren maligne entartete ovarielle Epithelzellen (OEC), je nach Expression verschiedener *HOX*-Gene, verschiedene Zelltypen: den papillären Typ, den endometrialen Typ und den Mucin-Typ, wenn bei ihnen *HOXA9*, *HOXA10* bzw. *HOXA11* ektopisch exprimiert wird (15). Dies belegt die Fähigkeit dieser Epithelzellen, Eigenschaften anderer Gewebe zu übernehmen und zeigt, dass die *HOX*-Gene die Identität erwachsener Zellen neu definieren können (86). Das auf Chromosom 10q lokalisierte *HOX11* (syn: *TCL3/TLX1*) wurde als Kandidatengen des BOFS in vorangegangenen Segregationsanalysen ausgeschlossen (53).

1.2.2.4 *FOX*-Gene

Die *FOX*-Gene (*forkhead box*) sind eine Genfamilie mit charakteristischen Proteineigenschaften. *FOX*-Gene sind Orthologe des Drosophila-Gens *forkhead*. Das 100 Aminosäuren umfassende Protein besitzt in seiner dreidimensionalen Struktur (Abb. 3) drei α -Helix-Domänen und zwei Schleifen W1 und W2, die an eine Flügelform erinnern (winged helix) (67). Die meisten *FOX*-Proteine haben über die Fähigkeit an DNA zu binden die Funktion eines Transkriptionsfaktors. Weiterhin sind auch Transaktivator- und Transrepressoreigenschaften bekannt. Im menschlichen Genom sind mindestens 43 Gene der *FOX*-Familie bekannt (55).

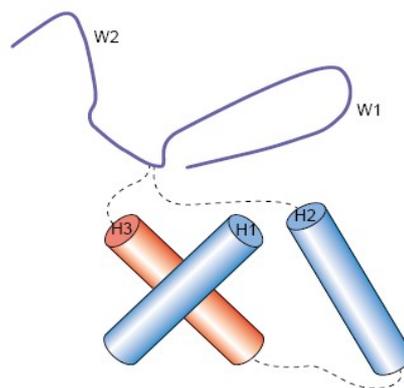


Abbildung 3: Dreidimensionale Struktur der forkhead-Domäne. Modell nach Röntgen-Kristallographie der Forkheadproteine *HNF-3*, *FOXC2* und *Genesis*. Die α -Helices (H1-H3) und zwei Flügel (W1-2) sind dargestellt. Die Erkennungshelix H3 (rot) sitzt in der großen DNA-Furche. Aus Lehmann et al., 2003 (67, S.339)

FOX-Gene werden anhand der Aminosäuresequenz ihrer konservierten *forkhead* Domäne in 17 phylogenetische Subgruppen eingeordnet (52). Bis jetzt wurden acht chromosomale

Gen-Cluster und mindestens 20, nicht in Clustern organisierte Einzelgene identifiziert (67). Weitere Unterteilungen in Genklassen erfolgten nach Eigenschaften des C-Terminus der FOX-Proteine (55).

Durch Untersuchungen von *Fox*-Mutanten wurde die große Bedeutung einiger Mitglieder der *Fox*-Gene in der Augenentwicklung und in anderen Prozessen der Embryonalentwicklung herausgefunden, was die Bedeutung der *FOX*-Gene für die Erforschung des BOFS unterstreicht.

FOXCI-Mutationen sind eine Ursache von Augenentwicklungsanomalien wie Glaukom und anderen mit Glaukomen koinzidierenden Defekten, wie z.B. Gaumenspalte oder angeborene Herzfehler (90; 81). Krankheitsbilder, bei denen die Beteiligung von *FOXCI* (syn.: *FKHL7*) beschrieben wurde, sind das primäre kongenitale Glaukom, die autosomal dominante Iridogoniodysgenese (*IRID1*; MIM 601631) und die Axenfeld-Rieger-Anomalie (MIM 602482) (82; 39; 81). Diese zeigt über Fehlbildungen des Gesichts, sensorineurale Gehörlosigkeit, sowie Augenerkrankungen Übereinstimmung mit BOFS-Symptomen. Entwicklungsstörungen von Herz, Nieren, Meningen, Skelett und Somiten bei *Foxc1*-Knockout-Mäusen (62; 63), sowie das Expressionsprofil dieses Gens in den Somitananlagen, dem ersten und zweiten Branchialbogen und den Nierenanlagen zeigen die Vielfalt der Organe und Systeme, in denen *FOX*-Gene als regulatorische Faktoren mitwirken.

Mutationen in *FOXC2* auf Chromosom 16q24.3 wurden bei Patienten mit Lymphödem-Distichiasis-Syndrom (MIM 153400) beobachtet. Bei diesem autosomal dominant vererbten Syndrom treten Lymphödeme der Extremitäten und Distichiasis (doppelte Wimpernreihe) auf. Außerdem sind Herzdefekte, Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, extradurale Spinalzysten und Augenbefunde wie Photophobie, Exotropie, Ptosis, kongenitale Ektropien und Katarakt beschrieben worden (29; 8). Homozygote Knockoutmäuse (*Foxc2*^{-/-}) sterben prä- oder perinatal an Skelett-, Urogenital- und Kardiovaskulärdefekten (47). Eine Überexpression von *FOXC2* in Adipozyten führt zum Fettabbau im weißen (WAT) und braunen (BAT) Adipozytengewebe (13). Diese Ergebnisse zeigen die Plastizität der Expression und deren phänotypische Konsequenzen.

FOXE3-Mutationen führen zu Defekten im vorderen Segment des Auges, welches aus verschiedenen morphologischen Arealen gebildet wird, u.a. aus Neuroektoderm, primitivem Mesoderm und Zellen der Neuralleiste. *FOXE3* wird im vorderen Anteil des Linsenepithels exprimiert. Mutationen führen über eine Fusion von Linse und Hornhaut zu Katarakt (117).

Fehlbildungen am äußeren Auge werden durch Mutationen in *FOXL2* verursacht. Das dazugehörige Krankheitsbild BPES (Blepharophimosis-Ptoxis-Epikanthus-Inversus-Syndrom (MIM 110100) ist assoziiert mit Gonadendysgenese oder vorzeitiger Menopause (POF -*premature ovarian failure*) (22; 43; 134).

Mutationen des auf Chromosom 9q22 lokalisierten Gens *FOXE1* (Syn.: *TITF-2*; *FKHL15*) führen zu kongenitalen Hypothyreosen, Thyroidagenesen und Gaumenspalten. So wurden bei Untersuchungen an Nachkommen einer konsanguinen Ehe (Cousin/Cousine 1. Grades; Hinweis auf autosomal rezessiven Erbgang) eine kongenitale Hypothyreose (infolge einer Athyreose) und Gaumenspalten festgestellt (12). Andere Gene wie der Thyroid-Transkriptionsfaktor *Tf1* und das *paired box*-Gen *Pax8* (Regulatoren von Genen der Zelldifferenzierung) werden gemeinsam mit *Foxe1* während der Entwicklung der Schilddrüse im Überschuss exprimiert (18; 152).

Entwicklungsdefekte können bereits bei der Differenzierung embryonaler Stammzellen (ES) entstehen. ES-Zellen sind noch nicht differenzierte Zellen mit dem Potenzial, sich in verschiedene Zellsorten umzuwandeln, und zu den entsprechenden Geweben zu wandern. Der Nachweis von *FOXH1*- und *FOXO1*-Transkripten in menschlichen ES-Zellen ist ein Indiz dafür, dass diese Gene für kongenitale Defekte verantwortlich sein können. Diese Hypothese wird durch repräsentative Transkriptmengenanalysen an humanen ES unterstützt, bei denen signifikant erhöhte Transkriptmengen dieser Gene in undifferenzierten ES gefunden wurden (7).

Die Expression von *Foxi1* (Syn.: *Fkh10*; *FKHL10*) im Ohrvesikel während der Embryonalentwicklung und vestibuläre Störungen in *Fkh10*-Knockoutmäusen (46) können ein Hinweis auf BOFS sein, zumal *Fkh10* auch in Epithelien embryonaler und adulter Nierentubuli exprimiert wird.

Abschließend kann für die *FOX*-Gene festgestellt werden, dass durch Segregationsanalysen, Sequenzierung und *Southern Blot* gezeigt wurde, dass zumindest *FOXC1* nicht als Kandidatengenen für das BOFS angesehen werden darf (53).

1.2.2.5 FGF-Gene und FGF-Rezeptoren

Mutationen in Genen der *FGF*-Familie (*fibroblast growth factor*) führen zu Entwicklungsstörungen, die Symptomen des BOFS ähneln. Derzeit sind 22 Liganden und 4 Rezeptoren der *FGF*-Familie bekannt. Die Gene sind größtenteils über Duplikationen ancestraler Vorläufer entstanden und werden in Familien anhand ihrer Anordnung auf den Chromosomen

in Clustern zusammengefasst (49). Die Produkte dieser Gene sind Heparin- oder Heparansulfatproteoglykan-bindende Proteine. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Knochen, Haut und Nervensystem (138). FGF induzieren die Vermehrung von mesenchymalen und neuroektodermalen Embryonalzellen. Sie erhöhen dabei nicht die Zellvermehrungsrate, sondern induzieren die Differenzierung einzelner Zellen und stellen auf diese Weise eine Entwicklungskontrolle dar. Experimentell wurde ihre Beteiligung an der DNA-Synthese, der Zellwanderung, dem Wachstum der Blutgefäße und der Wundheilung festgestellt. Gemeinsam mit dem VEGF (*vascular endothelial growth factor*) sind FGF potenzielle Induktoren der Angiogenese. Hier wirken sie chemotaktisch (130; 118) und mitogen (75) auf Endothelzellen und induzieren dort die Expression von Plasminogenaktivatoren und Kollagenasen, welche als verantwortliche Enzyme der Gewebe-Remodellierung angesehen werden (87; 85).

FGF stimulieren als Mitogen die Proliferation und hemmen die Differenzierung verschiedener glialer und neuronaler Precursorzellen *in vitro* (38; 54; 88), was in Untersuchungen an *FGF1* und *FGF2* in frühen Phasen der Peripher- und Zentralnervensystementwicklung gezeigt wurde. Die Beteiligung von *Fgf8* an der Ausbildung des cerebellären Cortex wurde am Tiermodell gezeigt. Dort induziert *Fgf8* den Transkriptionsfaktor *Bf1* und steuert gemeinsam mit diesem die Entwicklung von Derivaten der Neuralplatte (121). Mäuse mit defektem *Fgf8* haben keinen „Bulbus olfactorius“, so dass *Fgf8* für die Differenzierung der Nasalplakoden benötigt wird (83). Diese Mäuse zeigen zudem ein kleineres Telencephalon. Andere FGFs können die Funktionen von FGF8 ersetzen. Ein Beispiel dafür ist FGF2, das an die gleichen FGF-Rezeptoren wie FGF8 bindet.

Die FGF-Aktivität wird über Tyrosinkinase-Rezeptoren vermittelt, die in der Zellmembran verankert sind. Bis heute sind vier dieser strukturell und funktionell unterschiedlichen Rezeptoren bekannt (FGFR1-4) (94). Die Spezifität der Rezeptordomäne wird durch alternatives Spleißen hergestellt (33). Dieser Mechanismus wird als Ursache gewebsspezifischer FGF/FGFR-Bindungen interpretiert (92). Mutationen in *FGFR* führen zu inkorrektur Bildung des Schädels und/oder Skelettanomalien, wie z.B. den Acrocephalosyndaktylien oder Störungen der Chondrogenese (11). Intrauteriner und postnataler Minderwuchs gehören zum klinischen Spektrum des BOFS und könnten Folge vorzeitiger Ossifikation, hervorgerufen durch Störungen des FGF/FGFR-Systems, sein. Die beim BOFS vereinzelt beschriebenen neuronalen Entwicklungsdefekte, wie milde mentale Retardierung und cerebelläre Vermisagenese, sowie Anomalien in Sinnesorganen, könnten durch Defekte in der Bildung des Nervensystems oder als Folge craniofacialer Strukturen erklärt werden. *INT2*,

Synonym für *FGF3*, ist auf Chromosom 11q lokalisiert. Über Markeranalysen wurde dieses Gen als Kandidat für das BOFS ausgeschlossen (53).

Mutationen in den Rezeptorgenen *FGFR1*, -2 oder -3 zeigen einen dominanten Vererbungsmodus. Sie wirken sich durch konstitutiven Tyrosinkinase-Aktivierung als *gain of function*-Mutation aus. Durch morphometrische Untersuchungen von *Fgfr3*-defizienten Mäusen wurde festgestellt, dass deren Knochen im Durchschnitt länger sind (23). Aufgrund dieser Befunde vermutet man, dass FGFR3 das Knochenwachstum negativ reguliert. Mutationen führen zu erhöhter FGFR3-Aktivität und vorzeitiger Ossifikation. Diese ist unabhängig von Liganden, und übersteigt somit die normale negative Kontrolle des FGFR3 (11). Mutationen in *FGFR1-3* zeigen sehr ähnliche klinische Phänotypen. Deshalb ist es denkbar, dass sich ihre Funktionen überlappen und gegenseitig ausgleichen (11).

Es ist denkbar, dass die Auslösung des BOFS durch Defekte in der Interaktion zwischen verschiedenen Entwicklungsgenen erfolgt. Die Proteine der FGF-Familie interagieren mit anderen Genen und/oder Genprodukten. Einige Befunde deuten darauf hin, dass FGF direkt oder indirekt auf Transkriptionsfaktoren wirken können und damit die Zellvermehrung beeinflussen. So haben *in vitro* Untersuchungen an Zellen des Ratten-Telencephalons gezeigt, dass *Fgf2* ein endogener Stimulator eines Homöobox-Gens (*Otx2*) ist (105).

1.2.2.6 POU-Gene

Wie einzelne der oben bereits genannten Gene ist auch *POU4F3* als mögliches Kandidatengene für das BOFS, vor allem im Zusammenhang mit Gehörlosigkeit, diskutiert worden. Die Familie der POU-Transkriptionsfaktoren, welche in vielen Entwicklungsprozessen involviert sind, erhielt ihren Namen von der POU-Domäne, einer hoch konservierten DNA-Bindungs-Domäne (3). Sie setzt sich aus zwei intramolekularen Dimeren mit DNA-Bindeeigenschaften zusammen (108). Trotz der hohen Homologie zwischen den POU-Faktoren sind die 15 derzeit bekannten Gene, die sie kodieren, auf verschiedenen Chromosomen verteilt (3).

Die Mitglieder der POU-Familie besitzen als Entwicklungsgene ein breites Spektrum von Funktionen. So sind einige Mitglieder vor allem in der Differenzierung einzelner Areale der Hypophyse und des Hypothalamus und der neuroendocrinen Signalübertragung zwischen diesen Organen involviert (3). Die neuronale Verknüpfung dieser Organe erfolgt

über zwei Arten von Neuronen, die jedoch bei Mutationen in bestimmten *POU*-Genen nicht ausgebildet werden können (2).

Bei der Entwicklung des Ohrs ist das Gen *POU4F3* (POU-Domäne, Klasse 4, Transkriptionsfaktor 3; syn.: *Brn-3.1/Brn-3c*) ein wichtiger Differenzierungsfaktor, insbesondere der inneren Haarzellen. Es konnte gezeigt werden, dass dieses Gen (bei Mensch und Maus) ausschließlich in der fetalen Cochlea exprimiert wird (139). In Knockoutmäusen verursacht der Verlust dieses Gens eine fehlerhafte Differenzierung der inneren Haarzellen. Als Folge degenerieren sensorische Ganglien, die auf das Vorhandensein von Haarzellen angewiesen sind (30). Die Mäuse sind taub und haben Gleichgewichtsstörungen (147). Eine beim Mensch gefundene Mutation in Form einer Exon 2-Deletion in *POU4F3* ist verantwortlich für die autosomal dominante Form DFNA15 (MIM 602459) sensorineuraler Gehörlosigkeit (139). Diese Form von Gehörlosigkeit ist auch ein Merkmal des BOFS. Das rechtfertigte eine molekulargenetische Untersuchung dieses Gens bei Individuen mit BOFS. In dieser Untersuchung konnte *POU4F3* als Ursache des BOFS jedoch ausgeschlossen werden (53). Ein weiteres Mitglied der *POU*-Familie (*POU3F4*) konnte als Kandidatengens für das autosomal dominant vererbte BOFS ausgeschlossen werden, da es auf dem X-Chromosom lokalisiert ist.

1.3 Fragestellung

Das Branchio-Oculo-Facial-Syndrom ist eine genetisch bedingte, autosomal dominant vererbte Erkrankung. Der autosomal dominante Erbgang ist aus der Vater-Sohn-Übertragung der in der vorliegenden Arbeit untersuchten Familie abzuleiten.

In vorangegangenen Arbeiten wurden bereits einige Gene ausgeschlossen, bei denen Mutationen ein dem BOFS ähnliches Krankheitsbild (BO-, BOR- und TBS-Syndrom) verursachen. Dennoch ist es wegen der Seltenheit des Krankheitsbildes bislang nicht gelungen, auf Einzelgen-Ebene das Kandidatengen für das BOFS zu identifizieren. Eine kürzlich durchgeführte Untersuchung an Genen des *Pax-Eya-Six-Dach*-Netzwerks konnte keine Co-Segregation dieser Gene mit dem Krankheitsbild belegen. Zusätzliche Untersuchungen von Genen, die in der Literatur als Kandidaten vorgeschlagen worden waren (*FOXC1*; *POU4F3*), führten ebenso wenig zum Nachweis eines BOFS-Kandidatengens.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es daher, über eine genomweite Untersuchung (*genome-wide scan*; Segregationsanalyse) mit polymorphen Mikrosatellitenmarkern diejenigen Regionen einzugrenzen, die allen erkrankten Personen einer Familie mit mehreren BOFS-Individuen gemeinsam sind. Die Eingrenzung von Kandidatenregionen, der Ausschluss chromosomaler Regionen und ganzer Chromosomen sollte im Lauf dieser Arbeit durchgeführt werden. Ein wesentlicher Teil der Arbeit sollte die Einbeziehung von Daten aus Datenbanken bei der Auswertung der Segregationsanalysen sein. Einerseits sollte dabei nach Genen gesucht werden, die in den gemeinsamen chromosomalen Abschnitten lokalisiert sind und aufgrund ihrer Eigenschaften als potenzielle Kandidatengene für das BOFS in Betracht kommen könnten. Andererseits sollte daraus eine Entscheidung abgeleitet werden, ob ein Gen als BOFS-Kandidat ein- oder ausgeschlossen werden kann. Diese Auswahl sollte anhand verschiedener Kriterien (Expressionsprofil, Knockoutdaten, Mutationsdatenbank) getroffen werden.

Das Erhalten potenzieller Kandidatenregionen sollte damit einen wesentlichen Schritt bei der Suche nach der Pathogenese des BOFS bedeuten. Ein nächster Schritt auf dieser Suche müsste die vergleichende Sequenzierung, der in diesen Regionen identifizierten und ausgewählten Gene bei Gesunden und BOFS-Individuen sein, um ein Gen endgültig als Kandidatengen nominieren zu können. Aufgrund der geringen Zahl, der vom BOFS betroffenen Personen, war zu erwarten, dass mehrere chromosomale Regionen mit dem Phänotyp des BOFS segregieren würden.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 BOFS-Familie

Für die Durchführung dieser Arbeit stand eine Familie mit Branchio-Oculo-Facial-Syndrom (BOFS) zur Verfügung. Fünf von sieben Mitgliedern der Familie sind am BOFS erkrankt. Dies ist die weltweit größte Familie mit BOFS. Die meisten publizierten Fälle beruhen auf spontanen Neumutationen. Bis heute wurden keine anderen familiären Fälle mit BOFS beschrieben.

Für Untersuchungen an DNA der Familie lag das positive Votum der Ethikkommission der Universität Ulm (Aktenzeichen 114/2004) vor.

2.1.2 DNA der BOFS-Familie

Zur Untersuchung stand DNA von fünf betroffenen (D404, D406, D410, D412, D413) und zusätzlich von zwei gesunden Angehörigen zur Verfügung (D408, D402).

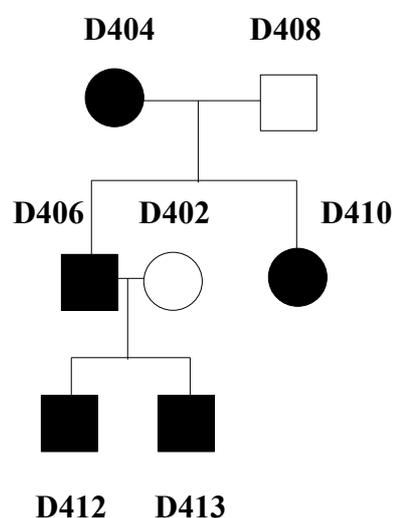


Abbildung 4: Stammbaum der Branchio-Oculo-Facial-Syndrom-Familie („D“ steht für DNA)

-  weiblich, gesund
-  weiblich, erkrankt
-  männlich, gesund
-  männlich, erkrankt

2.1.3 PCR

2.1.3.1 ABI Prism® Linkage Primer Set (Applied Biosystems, Weiterstadt)

Dieses Kit enthält ca. 400 Primerpaare, welche eine mittlere Auflösung von 10 cM im menschlichen Genom haben.

ABI Prism® Primer v2.5-MD10

ABI PRISM® True Allele™ PCR Premix

Kontroll DNA CEPH 1347-02

2.1.3.2 Zusätzliche Primer

Für Regionen, in denen die gefundenen Allelgrößen der PCR-Loci keine Aussage zuließen, wurden weitere Marker aus dem Linkage Mapping Set v2.5-MD5 hinzugefügt. Diese Primer haben einen mittleren Abstand von 5 cM im menschlichen Genom.

Tabelle 1: Zusätzliche verwendete Marker von der Firma Applied Biosystems

FAM (6- carboxyfluorescein); HEX (4,7,2',4',5',7'-hexachloro-6-carboxyfluorescein); NED (2',7',8'- benzo-5'-fluoro-2',4,7-trichloro-5-carboxyfluorescein); VIC (2'-chloro-7'-phenyl-1,4-dichloro-6-carboxyfluorescein)

Marker	Fluoreszenz -Farbstoff	Chromosom	Marker	Fluoreszenz -Farbstoff	Chromosom
D3S3725	NED	3	D14S1054	VIC	14
D3S3609	FAM	3	D14S1050	NED	14
D4S3042	FAM	4	D15S1014	NED	15
D4S2460	VIC	4	D15S212	NED	15
D5S2011	FAM	5	D18S1107	NED	18
D5S2090	FAM	5	D18S468	FAM	18
D5S2049	FAM	5	D18S450	VIC	18
D6S1660	VIC	6	D18S465	FAM	18
D6S1721	FAM	6	D18S56	NED	18
D6S291	FAM	6	D18S1127	FAM	18
D6S1617	NED	6	D18S1147	FAM	18
D6S259	FAM	6	D19S894	NED	19
D7S2476	VIC	7	D19S888	NED	19
D7S2459	FAM	7	D19S572	FAM	19
D7S483	NED	7	D19S931	VIC	19
D10S1655	NED	10	D19S903	FAM	19
D11S914	VIC	11	D19S566	FAM	19
D11S4102	FAM	11	D21S1911	VIC	21
D12S367	VIC	12	D21S1899	FAM	21
D12S1638	VIC	12			

Für Regionen, in denen es weder Primer aus der 10 cM noch aus der 5 cM Sammlung gab, wurden anhand von Datenbanken (NCBI, GDB) weitere Primerpaare definiert und zur Synthese in Auftrag gegeben.

Tabelle 2: Zusätzliche Primerpaare der Firma Biomers
FAM (6- carboxyfluorescein)

Marker	Fluoreszenz-Farbstoff	Chromosom
D18S1115	FAM	18
D22S427	FAM	22

2.1.3.3 PCR-Chemikalien und -Lösungen

Taq DNA Polymerase			GE Healthcare, Freiburg
dNTP 20 mM			GE Healthcare, Freiburg
Standard-MgCl ₂ -Mix (10 x)			
2,0 mM MgCl ₂ -Mix:	0,1	M Tris-HCl, pH 8,5	
	0,5	M KCl	
	20	mM MgCl ₂	
	0,1	% Gelatine	
3,0 mM MgCl ₂ -Mix:	0,1	M Tris-HCl, pH 8,5	
	0,5	M KCl	
	30	mM MgCl ₂	
	0,1	% Gelatine	

2.1.4 Kapillarelektrophorese Komponenten (Applied Biosystems, Weiterstadt)

EDTA Puffer (10x)
Hi Di™ Formamid
Genescan® 400HD[Rox] Size Standard

2.1.5 Agarosegelelektrophorese Komponenten

TBE-Puffer pH 8,0 (5x)	0,4 M Tris
	0,4 M Borsäure
	10 mM EDTA-Na ₂ , pH 7,6
Agarose 2% NEEO	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (Stammlösung 10 mg/ml)	Roth, Karlsruhe
Lademix (110)	50% (w/v) Saccharose
	0,1%(w/v) Bromphenolblau
	pH 7,0
	0,1%(w/v) Xylencyanol FF
	in 10 mM Tris-Cl, pH7,6
DNA-Längenstandard:	
ϕX174 DNA- <i>Hae</i> III	Promega, Mannheim

2.1.6 DNA-Isolierung

TE-Puffer (10x)	100 mM Tris-Cl, pH 8,0
	10 mM EDTA-Na ₂ , pH 7,6
SE-Puffer	75 mM NaCl
	25 mM EDTA-Na ₂ , pH 8,0
Dodecylsulfat Na-Salz (SDS), 10 g/100ml	Serva, Heidelberg
Proteinase K, 100 mg in 10ml SE-Puffer (10mg/ml)	Sigma, München

2.1.7 Kits

ABI Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt
---------	---------------------------------

ABI Prism® Primer	
ABI PRISM® True Allele™ PCR Premix	
Kontroll DNA CEPH 1347-02	
GenomiPhi™ DNA Amplification Kit	GE Healthcare, Freiburg
GFX PCR DNA and Gel Band PurificationKit	GE Healthcare, Freiburg

2.1.8 Software

GenScan®, GenoTyper®	Applied Biosystems, Weiterstadt
Cyrillic v.2.1.3	Cyrillic Software, Oxfordshire UK
VisualBasic Script zur Transformation der erhaltenen Daten von GenoTyper® nach Cyrillic	
SimWalk2 v.2.91	(124; 125)
GeneRetriever v. 2.1	(17)
HaploPainter v. 024beta	(45)

2.1.9 Datenbanken

NCBI:

OMIM (80)	ncbi.nlm.nih.gov/Omim
Map View	ncbi.nlm.nih.gov/mapview/
GDB (<i>Genome Data Base</i>)	www.gdb.org

2.1.10 Geräte

PCR-Maschinen

Corbett Research PalmCycler®	LTF, Konstanz
Perkin-Elmer 9600 TempCycler®	Appl. Biosystems, Überlingen
RoboCycler® Gradient 96	Stratagene, Heidelberg

Weitere Geräte

ABI Prism® 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Weiterstadt
----------------------------------	------------------------------------

Geldokumentationssystem Kodak Digital Science	Life Technologies, Karlsruhe
Eppendorf Centrifuge 5402	Eppendorf, Hamburg
Gel-Elektrophorese Power Supply:	
Consort E 831	LTF, Konstanz
Consort E 425	LTF, Konstanz
Gene Quant Photometer	GE Healthcare, Freiburg

2.2 Methoden

2.2.1 Isolierung von DNA

2.2.1.1 DNA-Isolation aus EDTA Blut (84)

Aus den Lymphozyten des peripheren Blutes wurde die DNA aller Probanden isoliert. Dafür wurden mit einer EDTA-Monovette 10 ml Blut entnommen. Das im Röhrchen enthaltene EDTA verhindert die Koagulation durch Entzug von Calcium-Ionen. Das Blut wurde uns im Rahmen einer Kooperation freundlicherweise von Dr. Müller (Chemnitz, Inst. für medizinische Genetik) zur Verfügung gestellt. Die Blutproben wurden mit je 30 ml Lysepuffer gemischt, auf Eis gekühlt und mehrmals geschüttelt. Anschließend wurden die Proben 10 min bei 4°C und 1000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert. Das Pellet wurde in 10 ml Lysepuffer resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert, dann 10 min erneut zentrifugiert (1000 rpm; 4°C) und der Überstand dekantiert. Das Zellpellet wurde in 5 ml SE-Puffer resuspendiert, mit 30 µl Proteinase K (10 mg/ml) und 500 µl 10% SDS versetzt und über Nacht bei 55°C inkubiert. Zum Fällern der Proteine wurden 1,5 ml 6M NaCl hinzugefügt, 15 sek kräftig gemischt und dann bei 20°C 4500 rpm 20 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgenommen und mit 2 Volumina reinen Alkohols aufgefüllt. Die entstandene DNA-Wolke wurde mit einem Plastikspatel entnommen, kurz in 70%-igem Alkohol gespült, ca. 2 min luftgetrocknet und anschließend in 50 µl TE gelöst.

2.2.1.2 Konzentrationsmessung der DNA im Photometer

Die in 50 µl TE gelösten DNA Proben wurden 30 min bei 37°C im Thermoblock geschüttelt. Die Endkonzentration der 1:50 verdünnten DNA wurde anhand ihrer optischen Dichte bei der Wellenlänge 260 nm im Photometer gemessen, wobei eine OD-Einheit (OD = optische Dichte) einer DNA-Konzentration von 50 µg/ml entspricht.

2.2.2 Exponentielle Amplifikation linearer DNA (GenomiPhi)

Bei dieser exponentielle Amplifikation kann man mit dem Enzym Φ 29 DNA Polymerase (ohne Exonukleaseaktivität) lange DNA-Stücke aus einer geringen Menge an eingesetzter DNA erhalten. Diese Methode findet vor allem bei DNA-Analysen Anwendung, bei denen wenig Ausgangsmaterial zur Verfügung steht. Die Polymerisationsqualität ist so hoch, dass es bislang keine Berichte über Sequenzen gab, welche sich nicht amplifizieren ließen (keine *Allel-Dropouts*).

DNA-Verdünnungen der sieben Personen unserer BOFS-Familie wurden amplifiziert. Zuerst wurde je 1 μ l Template (20 ng/ μ l) mit 4 μ l H₂O und 45 μ l Probenpuffer bei 95°C 5 min denaturiert und anschließend 5 min auf Eis inkubiert. Zur Vorbereitung der Amplifikationsreaktion wurde ein Mastermix hergestellt. Dazu wurden 63 μ l Reaktionspuffer und 7 μ l Enzym gemischt. In jede gekühlte Probe wurden 10 μ l Mastermix gegeben. Die Proben wurden bei 30°C im Wasserbad für 16 bis 18 Stunden zur Durchführung der exponentiellen DNA-Amplifikation inkubiert. Dann wurde die Polymerase bei 65°C 10 min hitzeinaktiviert und auf Eis gekühlt.

Als letztes wurde die DNA gereinigt. Dafür wurde ein GFX Kit (GE Healthcare) verwendet. Je Probe wurden 500 μ l Ladepuffer (*Capture-Buffer*) zugegeben und mit der Pipette gut gemischt. Diese Lösung wurde auf die Membran der Säule pipettiert und bei 13.000 rpm für 30 sek zentrifugiert. Die danach in dem *Collection Tube* aufgefangene Flüssigkeit wurde verworfen. Es wurden 500 μ l Waschpuffer auf jede Säule pipettiert und erneut bei 13.000 rpm für 30 sek zentrifugiert. Die Säulen wurden in ein neues Reaktionsgefäß gestellt. 50 μ l PCR Wasser wurde direkt auf die Matrix pipettiert. Anschließend wurde die Lösung 1 min bei RT inkubiert und dann 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Die gewonnenen Eluate wurden mit je 50 μ l TE verdünnt.

Zur Kontrolle der GenomiPhi-Amplifikation wurde eine PCR mit Kontroll-DNA (männlich, 100 ng/ μ l) gemacht und davon 5 μ l in einem 2% NEEO-Agarosegel aufgetragen, mit Ethidiumbromid gefärbt und fotografiert.

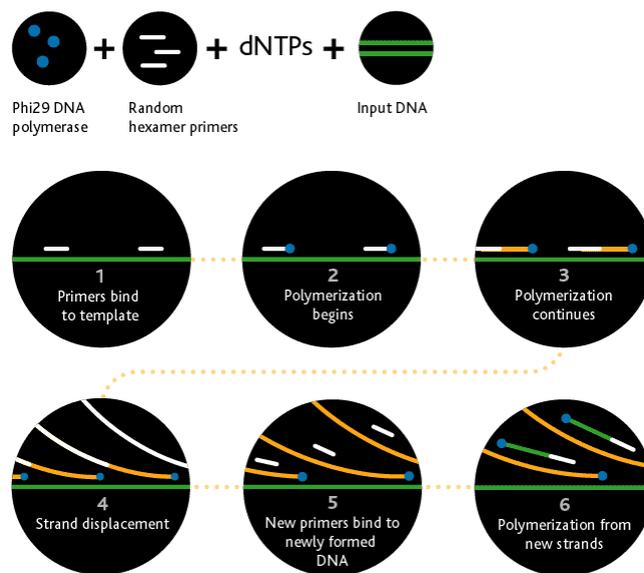


Abbildung 5: Schema der exponentiellen Amplifikation mit GenomiPhi
(Quelle: www.genomiphi.com)
dNTP (desoxy-Nukleosidtriphosphat)

2.2.3 PCR-Grundlagen (109)

Die PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion) ist eine Methode zur automatisierten, exponentiellen Amplifikation von DNA unter Zuhilfenahme der thermostabilen Taq-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*. Die PCR besteht grundsätzlich aus 3 Schritten: Denaturierung der doppelsträngigen DNA in ihre Einzelstränge, Anlagerung der PCR-Primer an die einzelsträngige DNA (Annealing) und Neusynthese der DNA durch die Taq-Polymerase (Polymerisation).

Reaktionsgemische (Applied Biosystems)

3,8 μ l H₂O

9 μ l PCR Premix

1 μ l Primer

1,2 μ l DNA

(15 μ l)

Für die Etablierung von D22S427 und D18S1115 :

3 µl	3 mM MgCl ₂ Mix
0,3 µl	dNTP 20 mM
0,3 µl	P ₁
0,3 µl	P ₂
0,4 µl	Taq DNA Polymerase 5000U/ml
1 µl	DNA 100ng/µl
24,7 µl	H ₂ O

(30µl)**PCR-Programme**

Für die meisten Primerpaare wurde das Standardprogramm verwendet. Für die Etablierung von Primern, deren Signale bei der nachfolgenden Fragmentanalyse zu schwach waren, sind Variationen in der Annealingtemperatur gemacht worden. Die ersten PCRs wurden auf einem Palm-Cycler durchgeführt, für die nachfolgenden Proben wurde entweder die PCR-Maschine von Perkin Elmer oder der Stratagene Robo-Cycler verwendet, da deren Temperaturprofil günstiger für die stringenten Vorgaben bei den Annealingtemperaturen waren.

Tabellen 3-5: Verwendete PCR-Geräte und -Programme**Standard Programm:**

Palm-Cycler			
Programm:	Temperatur	Zeit	Zyklen
Cycle 1	95°C	12 min	1
Cycle 2	(Denaturierung) 94°C (Annealing) 55°C (Polymerisation) 72°C	15 sek 15 sek 30 sek	10
Cycle 3	89°C 55°C 72°C	15 sek 15 sek 30 sek	20
Cycle 4	72°C	10 min	1
Cycle 5	4°C	∞	1

Variationen des Programms:

Perkin Elmer			
Programm:	Temperatur	Zeit	Zyklen
	95°C	12 min	1
	94°C 50°C bis 55°C 72°C	15 sek 15 sek 30 sek	10
	89°C 50°C bis 55°C 72°C	15 sek 15 sek 30 sek	20
	72°C	10 min	1
	4°C	∞	-

Robo Cycler			
Programm:	Temperatur	Zeit	Zyklen
Window I	95°C	12 min	1
Window II	94°C Gradient (50°C-61°C) / (46°C-57°C) / (45°C-56°C) 72°C	15 sek 15 sek 30 sek	30
Window III	72°C	10 min	1
Window IV	4°C	∞	1

2.2.4 Agarosegelelektrophorese

Für die Überprüfung der PCR-Produkte wurde eine Elektrophorese durchgeführt. Die DNA-Gelelektrophorese ermöglicht eine Auftrennung von geladenen Makromolekülen (wie DNA) umgekehrt proportional zum Logarithmus ihres Molekulargewichts. In einem 2%-igen Agarosegel wurden 15 µl des PCR-Produkts (zusammen mit Lademix) aufgetragen. Bei einer Spannung von 200 V (dies entspricht einer Feldstärke von 2 V/cm bei der verwendeten Gelkammer) und einer Stromstärke von 300 mA wurden die Proben 30 min in 1 x TBE aufgetrennt. Nach 20 min Färbung in Ethidiumbromid (10 mg/ml) wurden sie unter UV-Licht fotografiert. Das Laufverhalten und die Produktgröße der PCR-DNA wurde mit einem Längenstandard (Φ X 174/*Hae* III) verglichen.

2.2.5 DNA-Fragmentanalyse

Die Allelgrößen der PCR-Produkte aller Probanden wurden mittels Kapillarelektrophorese in einem Fluoreszenzsequenziergerät ABI® Prism 3100 bestimmt.

2.2.5.1 Mikrosatelliten Analyse

Mikrosatelliten sind kleine Abschnitte im Erbgut, die als tandemartige Wiederholungen von definierten Sequenzen (*repeats*) des Eukaryonten-Genoms charakterisiert sind. Die unterschiedliche Anzahl der Wiederholungen und die daraus resultierende Größe des DNA-Abschnitts einer bestimmten Sequenz kann durch die Fragmentanalyse untersucht werden. Bei diesem Verfahren kann man Restriktionsenzyme und PCR-Primer, die spezielle DNA-Sequenzen erkennen können, verwenden. In Abhängigkeit von der Detektionsmethode kann, wie in der hier vorliegenden Arbeit, auch mit PCR alleine diese Aussage gemacht werden. Letztendlich führen beide Methoden zur Erkennung unterschiedlich großer DNA-Fragmente.

Ein PCR-Primerpaar besteht aus einer vorwärts gerichteten und einer rückwärts gerichteten Sequenz. Es wurden PCR-Primerpaare, die im Abstand von 10 cM vorhanden sind, verwendet. Das PCR-Produkt wurde dann durch den ABI Prism 3100 (automatisches DNA-Kapillarsequenziergerät) analysiert, der für mehrere Proben gleichzeitig die Kapillarelektrophorese durchführen kann.

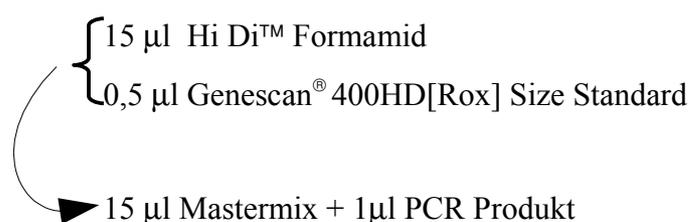
2.2.5.2 Kapillarelektrophorese

Es wurden 15 µl Formamid HIDi und 0,5 µl Interner Standard (ROX 400 HD) als Mastermix verwendet. 1 µl PCR-Produkt wurde zugegeben und in 96-well-Platten gegeben. Nach Zentrifugation der Platten wurde die darin enthaltene DNA bei 95°C 3 min denaturiert und auf Eis abgekühlt, um einzelsträngige DNA zu erhalten. Schließlich wurden die Proben im ABI® Prism 3100 separiert und analysiert.

Die Plattenvorlagen und damit die Steuerung des Geräts wurden mit dem Excel Platten Editor gestaltet.

Standard ABI-Ansatz

Mastermix:



2.2.5.3 Manuelle Bearbeitung der Daten

Nach der Durchführung der Kapillarelektrophorese wurde die Position der Allele für jeden Marker (*Peaks* auf der grafischen Ausgabe) jeder Person der Familie mit der Software GenoTyper definiert. Es wurde dadurch bestätigt, dass die Vererbung von Allelen zwischen den Verwandten möglich und richtig ist. Bei jedem Marker sollten zum Beispiel alle *Peaks* bzw. Allele nur in geradzahliger oder nur in ungeradzahliger Position sein, da die DNA in Basenpaare geteilt ist und die Marker als Dinukleotidrepeats (Mikrosatelliten) definiert waren.

Die Ausgabe der Daten der ABI Software GenoTyper erfolgt in einem Datensatzformat, welches mit der anschließenden Analyse durch Cyrillic nicht kompatibel ist. Daher wurde von Herrn Herbert Heinz aus dem Institut für Humangenetik mit *VisualBasic* ein Anpassungsmodul geschrieben, welches alle Allelgrößen automatisch mit den Stammbaumdaten zusammenführen kann.

2.2.6 Anpassungsmodul (65)

Die Ergebnisdaten der GenoTyper-Software wurden vom ABI3100 als ASCII-Datei zur Verfügung gestellt. Zur weiteren Verarbeitung der Daten mit Cyrillic musste eine Importdatei im Oxford-Format (26) erstellt werden, wie sie auch als Datenfile in den LINKAGE-Programmen (65) verwendet wird. Diese Konvertierung erfolgte mit Hilfe von VBA (*Visual Basic for Applications*). Mit dem *VBA-Script* wurden die Rohdaten in eine Datenbanktabelle eingelesen und dabei sämtliche *whitespaces* (Leerzeichen, Tabulatoren, Absatzmarken) entfernt. Daraufhin wurden die Größen der Allele eines Markers aller Patienten in Kennziffern konvertiert (1, 2, ...) und das Ergebnis sortiert in einer Tabelle abgelegt. Mit diesen aufbereiteten Rohdaten wurde das *Inputfile* für Cyrillic erzeugt, wobei je Chromosom ein *Inputfile* benötigt wurde, welches alle chromosomen-spezifischen Marker mit Allelgrößen, sowie die Daten (Geschlecht, Status, Verwandtschaftsgrad) aller Familienmitglieder enthielt. Als erster Schritt wurde der für das Oxfordformat nötige *Header* erstellt. Nach dem *Header* wurden die Marker mit Hilfe einer weiteren Tabelle, die Chromosomen- und zugehörige Markerdaten enthält, in der gleichen Reihenfolge wie auf dem Chromosom aufgelistet. Der Rest des *Inputfiles* wurde mit den in der Tabelle zwischengespeicherten Marker- und Alleldaten ergänzt.

2.2.7 Genotyp-Erstellung mit Cyrillic

Alle aus der oben genannten Analyse erhaltenen Daten wurden in Cyrillic eingelesen. Zuvor wurden die Markercharakteristika (Name, relative Position in % des Chromosoms, Anzahl der Allele) aus einer separaten Markertabelle direkt in Cyrillic eingelesen. Da maximal 6 Allele (3 Gründerpersonen trugen zum Stammbaum bei) erwartet werden konnten, wurde die Anzahl der Allele willkürlich auf 10 erhöht, weil Cyrillic standardmäßig nur 4 Allele annimmt. Die tatsächliche Häufigkeit der Allele in einer bestimmten Population wurde nicht berücksichtigt. Auch die Allelfrequenz wurde einheitlich auf 0.1 (10%) (gleiche Häufigkeit aller Allele) festgesetzt. Diese willkürliche Festlegung hat keinen Einfluss auf die Ergebnisse im Rahmen der Fragestellung.

Da die Phase der Marker bei denjenigen Personen im Stammbaum, von denen es keine elterliche DNA gibt, unklar ist, wurden diese Marker auch mit dem Merkmal "*phase unknown*" eingegeben.

Die vorläufigen Genotypen konnten noch nicht in eindeutige Haplotypen übersetzt werden, da die Rekombinationsfrequenz von Cyrillic nicht berücksichtigt wird und somit ein artifizierlicher Haplotyp entstehen könnte. Für die Berücksichtigung der wahrscheinlichsten Rekombinationsereignisse wurden die Cyrillic-Daten zur nachfolgenden Bearbeitung mit SimWalk exportiert.

2.2.8 Haplotyping Analysis (SimWalk v.2.91)

SimWalk errechnet selbstständig verschiedene Rekombinationsereignisse und gibt als Ergebnis den jeweils wahrscheinlichsten paternalen und maternalen Haplotyp für jede Person aus einem Stammbaum aus. Rekombinationsereignisse zwischen Markern werden dabei von der Software markiert. Dafür benötigt das Programm folgende Informationen: Stammbaumdaten, Personenbezeichnung und Geschlecht, die durch ABI erzeugten Allele von jedem Familienmitglied, die physikalische Reihenfolge der verwendeten Marker und deren Anordnung auf einem Chromosom sowie die Rekombinationsfrequenz zwischen den Markern. Diese Daten werden von Cyrillic zur Verfügung gestellt, wobei alle Markerallele in Cyrillic noch willkürlich ohne Bezug zum parental Haplotyp dargestellt werden. In dieser Arbeit wurde $0,05$ (5%) = 5 cM als durchschnittliche Rekombinationsrate/-frequenz zwischen zwei benachbarten Markern angenommen. Diese Vorgabe lässt Rekombination zwischen benachbarten Markern zu und umgeht die Berechnung eines

Kopplungsungleichgewichts. Dieser Wert berücksichtigt auch den mittleren Abstand der kommerziellen Marker von ABI, deren mittlerer Abstand 10 cM, bzw. 5 cM (Linkage Mapping Set v2.5-MD5) beträgt.

In durchschnittlich circa 2.7 Mio Rechenoperationen wurde das Verhältnis von beobachteten zu erwarteten Rekombinationsereignissen gebildet und der negative dekadische Logarithmus als *Likelihood* (Maß der Wahrscheinlichkeit) ausgegeben. Dieser Wert hängt von der Größe des untersuchten Chromosoms und der Anzahl der verwendeten Marker in folgender Form ab: je größer das Chromosom und je mehr Marker für die Analyse des Haplotyps zur Verfügung stehen, desto kleiner ist die Zahl und desto höher die Wahrscheinlichkeit einer adäquaten (realitätsnahen) Berechnung der Rekombinationsereignisse durch SimWalk.

Als Beispiel sind die Daten der SimWalk-Analyse für Chromosom 22 im Ergebnisteil dargestellt.

Die von SimWalk erzeugten Dateien wurden als *Input* für die abschließende Darstellung der Stammbaumdaten mit HaploPainter verwendet.

2.2.9 HaploPainter (Version V.024 beta)

Das Softwarepaket HaploPainter kann die von SimWalk erhaltenen Daten publikationsreif darstellen. Dazu wurden Standarddateien zur Steuerung von HaploPainter erstellt. Die erste zu ladende Datei enthielt die Standardeinstellungen (*defaults*) für HaploPainter. Eine weitere Datei enthielt den kompletten Stammbaum. Eine chromosomenspezifische Steuerdatei enthielt Markernamen und Position (absolut in Mbp) jedes Chromosoms. Zuletzt wurden die SimWalk *Output*-Dateien "*Haplo***.****" eingelesen. Der resultierende Stammbaum mit allen Allelgrößen und Markerdaten wurde als Postscript-Grafik exportiert.

2.2.10 Gensuche in Regionen identischer Haplotypen bei Erkrankten

Nach Einschränkung auf diejenigen chromosomalen Regionen, in denen das für das BOFS verantwortliche Gen aufgrund der Haplotyp-Analyse zu finden sein sollte, wurden diese Intervalle mit Hilfe der *Map Viewer* Datenbank (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/mapview/>) untersucht. Dazu wurden jeweils der nächstgelegene proximale und distale Marker außerhalb der identischen Regionen als *Input* bei Mapview eingegeben. Die Auswahl der

nächstgelegenen Marker ist eine Vorsichtsmaßnahme, da der genaue Punkt einer Rekombination zwischen zwei Markern unbekannt ist. Als *Output* erhielt man eine Tabelle mit sämtlichen Genen / ORFs / vermuteten Transkripten dieser eingegrenzten Region. Die Bezeichnung der Gene und die Beschreibung des bekannten Genproduktes wurden in Tabellen dargestellt und manuell nachbearbeitet.

2.2.11 Suche nach genetisch bedingten Erkrankungen

In den zuvor genannten Intervallen wurde eine Suche nach genetisch bedingten Krankheiten in der "OMIM-Datenbank" (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/) durchgeführt. Die Daten wurden in Tabellen dargestellt.

2.2.12 GeneRetriever

Unter Verwendung des Programms GeneRetriever wurde eine weitere Gensuche in den gemeinsamen Regionen durchgeführt. Dafür wurden die Marker, die das Intervall oben und unten begrenzen eingegeben. Außerdem wurden die folgenden Parameter ausgewählt: "Gene description", "Type of gene", "Summary", "Accession Number". Die erhaltenen Daten wurden in Tabellen dargestellt.

2.2.13 Begründung der Genausschlüsse

In den im Ergebnisteil dargestellten Tabellen stehen nur diejenigen Gene, die entweder in einem Zusammenhang mit dem BOFS stehen könnten, oder solche, für die aufgrund der unklaren Datenlage keine Aussage getroffen werden konnte. Die Einschlusskriterien für die Nominierung als potenzielles BOFS-Kandidatengen sind nachfolgend beschrieben.

Das Expressionsprofil eines Gens wurde zeitlich und räumlich untersucht. Dafür wurden Daten der *Serial Analysis of Gene Expression* (SAGE) der Internetseite: www.sagenet.org genommen. Das auf dieser Internetseite beschriebene Expressionsprofil wurde mit den klinischen Symptomen vom BOFS verglichen. Entscheidende Vergleichskriterien waren dabei das Entwicklungsstadium bzw. das Alter der betroffenen Person, bei der ein Symptom auftritt, sowie dessen Lokalisierung. Hiermit versucht man, eine mögliche Korrelation zu finden. Andere hilfreiche Quellen bei der Suche nach dem Ex-

pressionsprofil waren: <http://www.genecards.org> (99) (*Gene Decks Assorted Gene*) und <http://www.genatlas.org/>.

Bei gentechnisch veränderten Tieren (Transgene / Knockout-Tiere) kann man gut erkennen welche Gene für welche Effekte verantwortlich sind. Informationen über Tiermodelle wurden von der Internetseite <http://www.informatics.jax.org> der Gesellschaft: (MGI) *Mouse Genome Informatics* am *Jackson Laboratory*, Bar Harbor, Maine, USA, benutzt. Dort stehen Daten der Expression des orthologen Gens, zum Beispiel von Knockout-Maus-Experimenten, zur Verfügung.

Die Funktion eines Gens war auch ein wichtiger Punkt für die Entscheidung über die Nominierung als BOFS-Kandidatengen. Die Daten über die Funktionen der Gene wurden von dem Gen-Atlas (siehe Web-Seite oben), der *UniProt / Swiss-Prot* Protein-Datenbank (www.expasy.org/uniprot) erhalten. Mit deren Informationen wurde, wenn nötig, nach weiteren Literaturquellen gesucht. Damit wurde u.a. auch eine Funktion als Haushaltsgen oder Entwicklungsgen des Kandidaten herausgefunden.

Des Weiteren wurden die genetischen und funktionellen Wege der durch GeneRetriever erhaltenen Gene untersucht. Unter <http://www.genome.ad.jp/kegg/> wurden Informationen über Genwege sowie Interaktionen zwischen verschiedenen Genprodukten gefunden.

Die sogenannten Pseudogene sind DNA-Sequenzen, die eine hohe Homologie mit einem funktionellen nicht allelischen Gen zeigen, aber selbst meist nicht funktionell sind. Die Benennung als Pseudogen war Grund eines Ausschlusses des jeweiligen Gens aus der Liste. Die dazu nötigen Daten wurden von der Web-Seite (<http://pseudogene.org/main.php>) der Gesellschaft: *Pseudogene Analysis of Prokaryotic and Eukaryotic Organisms* entnommen.

Ebenso wurde eine mögliche Assoziation von DNA-Varianten (SNPs) einzelner Gene und Phänotypen des BOFS berücksichtigt. Informationen dazu standen über den Katalog menschlicher Gene und genetisch bedingter Erkrankungen OMIM (*Online Mendelian Inheritance in Man*) online unter www.ncbi.nlm.nih.gov zur Verfügung.

3. ERGEBNISSE

Der autosomal dominante Erbgang des Branchio-Oculo-Facial-Syndroms (BOFS) ist bekannt (33). Durch die Untersuchung der Allelseggregation einer Familie, in der mehrere Personen vom BOFS betroffen sind, ist es möglich, ein genetisches Bild zu bekommen. Damit können Veränderungen von DNA-Abschnitten herausgefunden werden, die für den Phänotyp verantwortlich sind. Die Methode erlaubt zumindest den Ausschluss konkreter Regionen oder sogar ganzer Chromosomen. Wenn gleiche Allele eines Locus von betroffenen wie nicht betroffenen Individuen vererbt worden sind, kann man davon ausgehen, dass dieser Locus ausgeschlossen werden kann.

3.1 DNA-Extraktion / -Isolation

Die für die Untersuchungen verwendete DNA der Mitglieder der BOFS-Familie wurde aus EDTA-Blut isoliert. Diese Methode ermöglicht die Gewinnung der DNA aus Lymphozyten. Es wurden aus 10 ml Blut jedes Probanden verschieden konzentrierte Mengen von DNA durch die Aussalzmethode (84) gewonnen. Die erhaltene DNA wurde in TE-Puffer gelöst, zur Konzentrationsbestimmung 1:50 verdünnt und anschließend im Photometer gemessen. Beispiele davon sind in Tabelle 6 dargestellt.

Tabelle 6: DNA-Messung nach der Isolation

(von Person D404 war DNA zweier verschiedener Blutproben vorhanden- I, II; „D“ steht für DNA)

Verdünnung 1:50	260 nm	Ratio 260 nm / 280 nm	[DNA] µg/ml -verdünnt-	Endkonzentration (µg/ml)
Person D402	0,547	1,647	27,3	1365
Person D404/ I	0,337	1,667	16,9	825
Person D404/ II	0,426	1,628	21,3	1065

3.2 GenomiPhi

Die ursprüngliche Menge an genomischer DNA der Probanden, die für diese Arbeit zur Verfügung stand, reichte für die Weiterführung aller geplanten Analysen nicht aus. Deshalb erfolgte eine Amplifikation durch die GenomiPhi-Methode. Dafür wurde 1 µl

Template eingesetzt (20 ng/ μ l) und daraus nach Amplifikation durch die Φ 29 DNA-Polymerase zwischen 35 μ g -59 μ g erhalten.

Ein Vergleich ursprünglicher DNA mit amplifizierter DNA (GenomiPhi Kit) wurde durch PCR, Gelelektrophorese und Fragmentanalyse durchgeführt. Es wurde kein Unterschied festgestellt.

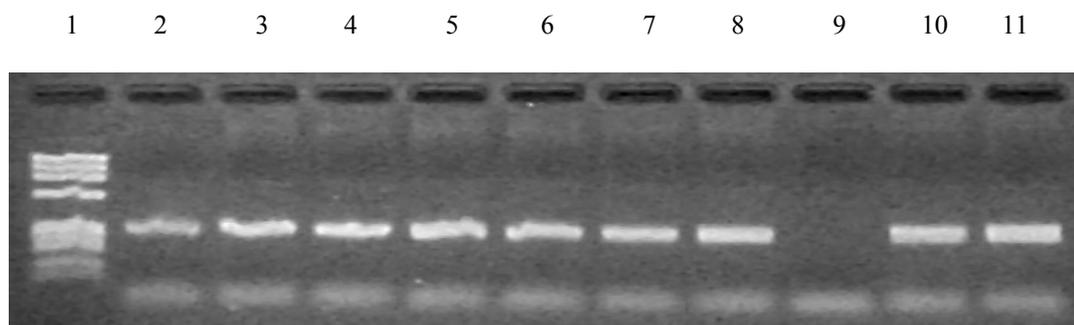


Abbildung 6: Gelelektrophorese von PCR-Produkten nach GenomiPhi Amplifikation. Marker: D2S337. Spur 1: Längenstandard (ϕ X174/*Hae*III), Spur 2 - 8: Patient 1 bis 7 (D410, D408, D404, D406, D413, D412, D402); Spur 9: Leerwert; Spur 10: Positiv-Kontrolle (CEPH-1347-02); Spur 11: Kontroll-DNA Probe (männlich, 100 ng/ μ l). Produktgröße: ca. 290 bp. („D“ steht für DNA)

3.3 PCR und Kontrolle durch Gelelektrophorese

Mit Hilfe von Mikrosatelliten-Markern, die aus definierten Regionen des Genoms stammen, wurden PCR-Reaktionen mit DNA der BOFS-Familie durchgeführt. Damit war es möglich, von einem repräsentativen Teil jedes Autosoms die Allelseggregation aller Familienmitglieder dieser Studie zu erhalten. Die PCR mit ABI Prism Primern wurde unter den in „Material und Methoden“ detailliert beschriebenen Bedingungen durchgeführt (in der PalmCycler-, Perkin-Elmer 9600- oder RoboCycler-Maschine).

Für die zusätzlichen, über die Firma Biomers bestellten PCR-Primer wurde eine Etablierung durchgeführt, um die optimalen PCR-Bedingungen dieser Marker zu finden. Die optimale $MgCl_2$ Konzentration entsprach 2 mM. Zur PCR-Reaktion wurde je 1 μ l Template (100 ng/ μ l) zugegeben. Außerdem wurden 0,3 μ l Desoxy-Nucleosidtriphosphate (dNTPs) wie je 0,3 μ l der rück- und vorwärtsgerichteten Primer (25 pmol/ μ l) verwendet. Als DNA-Polymerase wurde die Taq-Polymerase von *Thermus aquaticus* (0,4 μ l) verwendet. Nach der Denaturierung auf 95°C wurde als Annealingtemperatur 57°C für den Marker D18S1115 und 51°C für den Marker D22S427 ausgewählt. Schließlich wurde die Polymerisation bei 72°C durchgeführt. Die Zahl der Zyklen und die Zeit jedes Schrittes sind detailliert in den Tabellen 3-5 im Abschnitt „Material und Methoden“ aufgeführt.

Zur PCR-Kontrolle wurden außer den sieben Probandenproben zwei weitere Proben, Leerwert und Positiv-Kontrolle (CEPH-1347-02) entsprechend vorbereitet. Als Kontrolle wurde auch eine Gelelektrophorese des PCR-Produktes durchgeführt. Dafür wurden je Probe 10 µl PCR-Produkt plus 5µl Lademix auf ein Gel aufgetragen, gefärbt und fotografiert (Abbildung 7). Die Proben wurden dann im Gefrierschrank bei -20°C aufbewahrt und danach für die Durchführung der Fragmentanalyse verwendet.

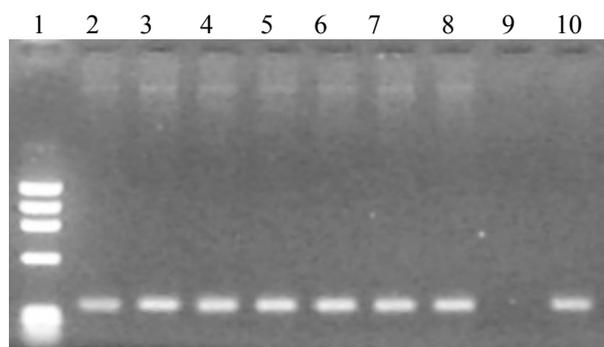


Abbildung 7: Kontroll-Gel nach PCR

Marker: D1S2842. Spur 1: Längenstandard (ϕ X174/*Hae*III); Spuren 2 - 8: Patienten 1 bis 7 (siehe Legende Abb. 6); Spur 9: Leerwert; Spur 10: Positiv-Kontrolle (CEPH 1347-02) Größe des PCR-Produkts: ca 350 bp.

3.4 Segregationsanalyse mittels Fragmentanalyse im ABI Prism® 3100 Analyzer

Die Bestimmung der Allelgröße der verschiedenen Mikrosatellitenmarker aller Probanden erfolgte durch Kapillarelektrophorese. Das ABI Prism® 3100 Fluoreszenzsequenziergerät verarbeitete die in den geeigneten Platten aufgetragenen Proben. Die Ergebnisse wurden mit der Software GenScan erfasst.

Von jedem Marker oder Primerpaar wurden in einem Verzeichnis neun Dateien erzeugt, die aus den Proben der sieben Mitglieder der BOFS-Familie, dem Leerwert und der Positivkontrolle bestanden. Aus jedem Datensatz konnte eine Grafik generiert werden, in welcher jedes Allel jedes Patienten als *Peak* angezeigt wurde. Jeder *Peak* bestand aus einem diskreten Signal, wobei das Signal nach Größe der DNA-Fragmente, Effizienz der PCR und Qualität der eingesetzten DNA variieren konnte.

So erlaubte das Programm eine vorläufige Darstellung der Ergebnisse für einen Marker in Form von *Peaks* die den Signalen der Fragmente des PCR-Produkts bzw. des Allels aller Probanden entsprachen. Die verschiedenen Marker wurden in unterschiedlichen Farben (blau, grün oder schwarz) dargestellt, je nachdem ob die von den Firmen

AppliedBiosystems und Biomers hergestellten Primer, den Fluoreszenzfarbstoff FAM, HEX/VIC oder NED tragen. Hiernach wurden die Daten in die Software GenoTyper importiert und mit diesem Programm in neuen Diagrammen und daraus resultierenden Tabellen zusammengefasst, angezeigt und gespeichert. Damit wurde die Datenerfassung abgeschlossen und die Durchführung der Ergebnisauswertung ermöglicht.

Abbildung 8 zeigt ein typisches GenoTyper Auswertungsbild. Oben findet sich eine gemeinsame, mittels mitgeführter Standards in den Analysen erzeugte, in Basenpaaren kalibrierte, Skala. Diese Skala und zusätzliche kleine Schilder unter jedem *Peak* ermöglichten, die Charakteristika (Größe in Basenpaaren, Allelnummer) jedes Allels zu definieren, und die Richtigkeit dieser Position durch Vergleich der Daten zwischen Verwandten (Mendel'scher Erbgang) zu überprüfen.

Aufgrund der DNA-Verteilung in Basenpaaren bzw. der Skalenteilung (x-Achse) im Diagramm wurden nur *Peaks*, die bei jedem Mitglied der Familie entweder nur in geradzahigen oder nur in ungeradzahigen Positionen standen, als möglich angesehen. Alle anderen wurden vorsichtig manuell nachbearbeitet. Auf der y-Achse wurde die Intensität der Signale angezeigt. Für die an einem bestimmten Locus homozygoten Mitglieder wurde ein einzelner *Peak* angezeigt, bei Heterozygoten zwei. Die Größe der *Peaks* bzw. die Signalintensität war je nach Marker, und innerhalb der Marker je nach Familienmitglied, unterschiedlich stark. Dies kann auf DNA-Mengenunterschiede oder PCR-Artefakte zurückzuführen sein.

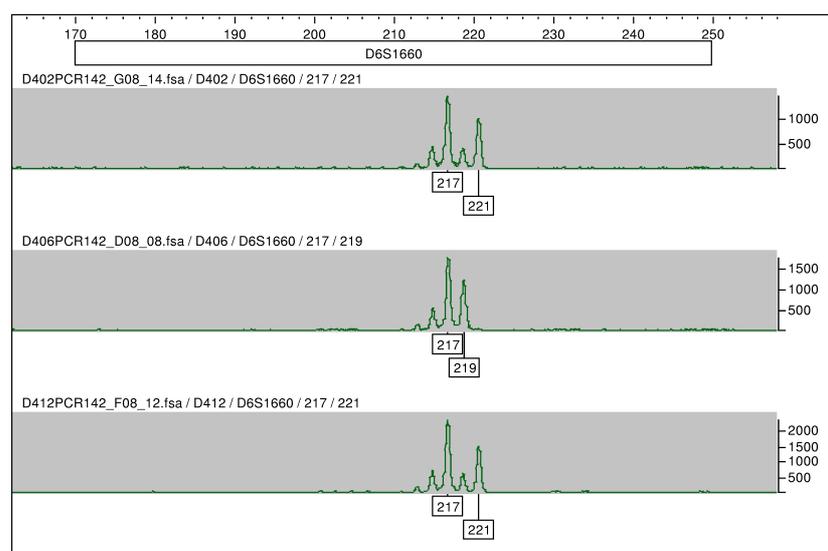


Abbildung 8: Auswertung mit GenoTyper®

Bildschirmansicht. Erster Graph: Person D402 (Mutter); zweiter Graph: Person D406 (Vater); dritter Graph: Person D412 (Sohn), (siehe Legende Abb.4)

3.5 Anpassungsmodul

Wie beschrieben (Abschnitt 2.2.6), wurden die von GenoTyper erhaltenen Daten durch ein Anpassungsmodul konvertiert, um ihre weitere Verwendung mit Cyrillic zu ermöglichen. Dabei entstand z.B. die nachfolgend gezeigte Steuerdatei für Cyrillic:

```
Oxford format pedigree file derived from 0 on 1-1-2005
RIND 22 7 99
loci
1 D22S420 22.08
2 D22S539 22.28
3 D22S315 22.42
4 D22S280 22.61
5 D22S283 22.75
6 D22S423 22.90
7 D22S274 22.99
Z
          *  aoao  aoao  aoao  aoao  aoao  aoao  aoa
fam      iden ind  pat  mat  x  *  1    2    3    4    5    6    7
          1    2    3    4    5    6    7
BOFBOF  bD404 1   0   0   F A 1 3  1 3  1 3  2 4  1 3  1 3  1 2
BOFBOF  bD408 2   0   0   M U 2 3  1 1  2 2  2 3  3 4  1 2  2 3
BOFBOF  bD402 3   0   0   F U 1 2  1 2  1 2  1 3  2 5  1 4  3 4
BOFBOF  bD406 4   2   1   M A 3 3  1 3  1 2  2 4  1 3  1 3  1 3
BOFBOF  bD410 5   2   1   F A 3 3  1 3  1 2  2 4  1 3  1 1  2 3
BOFBOF  bD412 6   4   3   M A 1 3  1 2  2 2  1 2  2 3  1 1  3 3
BOFBOF  bD413 7   4   3   M A 1 3  2 3  1 2  1 4  1 2  3 4  1 4
999
```

Abbildung 9: Anpassungsmodul von Genotyper nach Cyrillic.

Das Modul wurde mit VBA (*Visual Basic for Applications*) im Oxford-Format (25) erstellt. Die Datei enthält Angaben aller Individuen aus dem Stammbaum, das Geschlecht, den Verwandtschaftsgrad sowie den Status der Personen. In der Schriftart Courier New kursiv gesetzte Texte sind Steuerbefehle für Cyrillic. M = Male; F = Female; U = Unaffected; A = Affected.

3.6 Cyrillic

Nachdem die Daten aus dem Anpassungsmodul in Cyrillic importiert worden sind, entstand ein Stammbaum, der allerdings noch keine Rekombinationshäufigkeiten und -wahrscheinlichkeiten berücksichtigte. Auch die Phase der Allele blieb dabei unbekannt. In Abbildung 10 ist ein typisches Beispiel für eine vorläufige Markeranalyse von Chromosom 22 zu sehen.

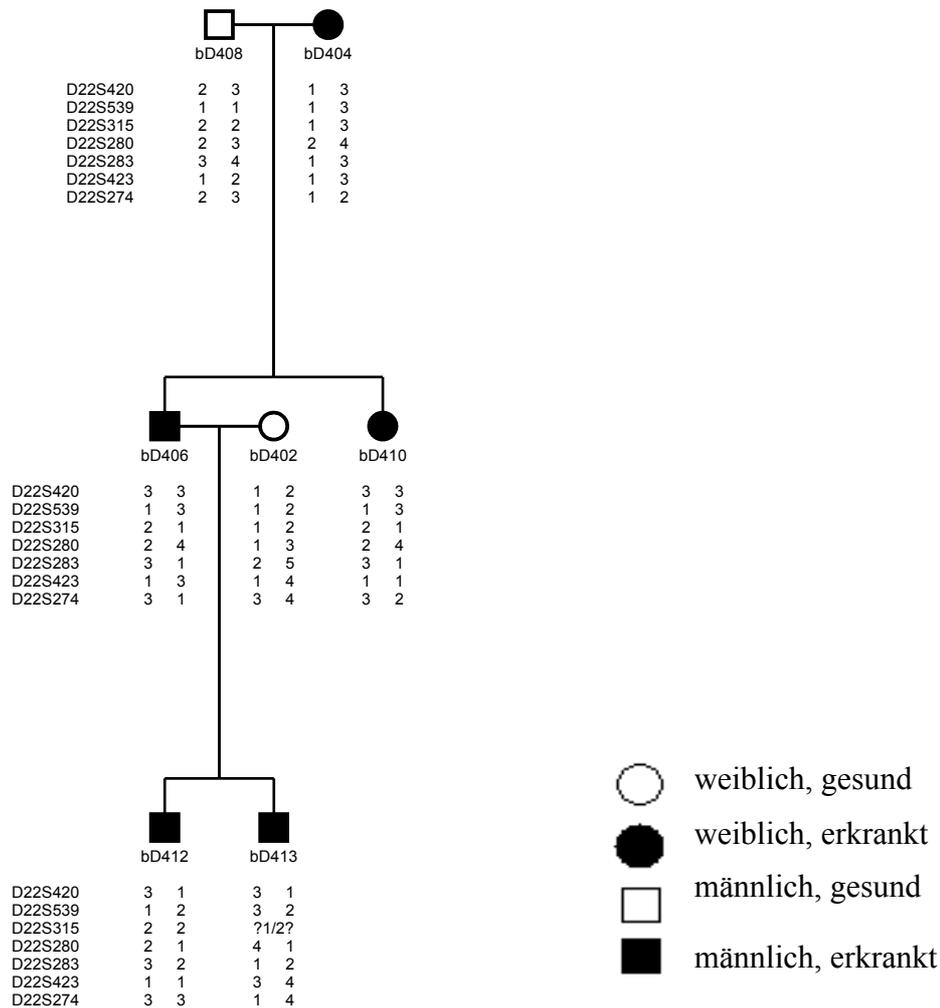


Abbildung 10: Stammbaum der Branchio-Oculo-Facial-Syndrom-Familie in Cyrillic
Gezeigt sind hier die Allele von Markern des Chromosoms 22. Die Legende „?1/2?“ bedeutet, dass die Software den elterlichen Ursprung der Allele nicht berechnen konnte, da Allel 1 und Allel 2 des Markers D22S315 bei D413 sowohl vom Vater D406 als auch von der Mutter D402 stammen können. („b“ steht für Branchio-Oculo-Facial; „D“ steht für DNA)

3.7 Anwendung von SimWalk2 (Version 2.91)

SimWalk wurde benutzt, um Rekombinationswahrscheinlichkeiten benachbarter Marker auf den Chromosomen zu berechnen. Dafür wurden Position und Abstände der Marker berücksichtigt.

Nachfolgend ist eine typische Datei mit Ergebnissen aus einer SimWalk-Analyse (Chromosom 22) dargestellt.

NAME	MOTHER	FATHER	SEX	TRAIT	MARKERS						
P 1	--	--	F	--	3	3	1	4	1	1	2
+					-----						
M 1	--	--	F	--	1	1	3	2	3	3	1
M 2	--	--	M	--	2	1	2	3	4	2	2
+					-----						
P 2	--	--	M	--	3	1	2	2	3	1	3
M 3	--	--	F	--	2	1	1	3	5	4	4
+					-----						
P 3	--	--	F	--	1	2	2	1	2	1	3
M 4	1	2	M	--	3	3	1	4	1	3	1
+					-----						
P 4	1	2	M	--	3	1	2	2	3	1	3
M 5	1	2	F	--	3	3	1	4	1	1	2
+					-----						
P 5	1	2	F	--	3	1	2	2	3	1	3
M 6	3	4	M	--	1	2	2	1	2	1	3
+					-----						
P 6	3	4	M	--	3	1	2	2	3	1	3
M 7	3	4	M	--	1	2	2	1	2	4	4
+					-----						
P 7	3	4	M	--	3	3	1	4	1	3	1

In diesem Haplotyp-Diagramm werden für jede Person aus der BOFS-Familie folgende Daten von links nach rechts in dieser Reihenfolge aufgeführt: M oder P zeigt an, ob der Haplotyp dieser Zeile maternalen oder paternalen Ursprungs ist. Es folgt die Identitätsnummer 1-7 im Stammbaum; anschließend der Name der Mutter (1 oder 3) und des Vaters (2 oder 4), das Geschlecht und, falls vorhanden, Merkmale des Phänotyps.

Die berechneten Haplotypen schließen sich rechts an.

Die mütterlichen und väterlichen Haplotypen werden durch eine Linie von Symbolen getrennt:

- Standard-Symbol
- ^ in diesem Intervall Rekombinationen nur im mütterlichen Haplotyp
- V in diesem Intervall Rekombinationen nur im väterlichen Haplotyp
- | in diesem Intervall Rekombinationen in mütterlichem und väterlichem Haplotyp
- = markiert mütterliche oder väterliche Allele, die ursprünglich unbestimmt waren, aber von bekannten Allelen abgeleitet werden konnten
- * Phase konnte für diesen Marker nicht festgelegt werden. Es wurde die wahrscheinlichste Phase für die Darstellung gewählt.

Für Nachkommen wurde automatisch der maternale Haplotyp oberhalb der gestrichelten Linie angezeigt. Für sogenannte *Founder* erfolgte die Zuordnung der parental Haplotypen willkürlich.

Informationen für jede Rekombination:

RUN NUM	PED NUM	PEDIGREE NAME	PERSON NAME	HAPLOTYPE ORIGIN	INTERVAL NUMBER	INTERVAL SIZE in Haldane cM
15	001	BOFBOF	4	maternal	5	5.268
15	001	BOFBOF	7	maternal	5	5.268

In der Spalte „ON THE MATERNAL HAPLOTYPE“ wird angezeigt:

- die Nummer der Rekombinationen in jedem Haplotyp
- [] Wahrscheinlichkeit einer Rekombination vs. einer Nicht-Rekombination
- { } minimaler Abstand zwischen zwei *Crossovers* (in Haldane cM)

RUN NUM	PED NUM	PEDIGREE NAME	PERSON NAME	ON THE MATERNAL HAPLOTYPE	ON THE PATERNAL HAPLOTYPE
15	001	BOFBOF	4	1 [0.052632] { }	0 [] { }
15	001	BOFBOF	7	1 [0.052632] { }	0 [] { }

Summe der SimWalk-Analyse:

RUN NUM	PED NUM	PED NAME	STEPS TAKEN	LOG-10 LIKELIHOOD	RECOMBINATIONS EXPECTED	RECOMBINATIONS SEEN	HAPLOTYPES WITH r				
RECOMB:							r=0	r=1	r=2	r=3	r>3
15	001	BOFBOF	26%	-48.03501	2.4	2	12	2	0	0	0

Abbildung 11: SimWalk2 2.91 Analyse. Chromosom 22.

Der oben berechnete Stammbaum wurde nach 215393 Rechenoperationen ermittelt. Es finden sich 2 Einzelrekombinationen im Intervall 5 zwischen den Markern „5“ und „6“.

3.8 HaploPainter

Die mit dieser Software erhaltenen Diagramme werden zusammen mit den Tabellen jedes Chromosoms und den Markerdaten im nächsten Kapitel gezeigt. Jedes Diagramm entspricht einem Chromosom mit in verschiedenen Farben dargestellten Allelverteilungen. An der linken Seite der Grafik kann man die jeweils analysierten Marker gemäß ihrer Position im Chromosom sehen.

3.9 Untersuchung der verdächtigen chromosomalen Regionen: GeneRetriever / OMIM-Datenbank / NCBI *mapview*

Die Position aller Gene und Marker auf dem menschlichen Chromosomen ist dank des „Humanen Genom Projekts“ bekannt. Dadurch war es mit Hilfe von Datenbanken möglich, die Gene der Regionen zu bestimmen, die allen erkrankten Personen gemeinsam sind. Dafür wurde die GeneRetriever-Software verwendet, mit der eine Suche nach Genen in einer bestimmten chromosomalen Region durchgeführt wurde. Zuerst wurden die gewünschten Marker, die das zu untersuchende Intervall begrenzen, eingegeben. Dann wurden die Parameter „Gene description“, „Type of gene“, „Summary“, „Accession Number“ ausgewählt. Die erhaltenen Daten wurden in Tabellen umgewandelt, in denen das Symbol des Gens, die Position und das Genprodukt dargestellt wurden.

Ferner sind genetisch bedingte Krankheiten sowie die Funktionen des Genprodukts vieler Gene bekannt. Diese Informationen wurden mit Hilfe von OMIM erhalten (www.ncbi.nlm.nih.gov/Omim/). Es wurden die Parameter „Gene“, „Idiogram“, „STS“ (*Sequence-tagged site*) eingegeben und die Suche durchgeführt. Die Ergebnisse wurden in Tabellen umgewandelt, in denen Datenbanknummer der Gene, Symbole und verursachte Krankheitsbilder dargestellt wurden.

Eine Auswahl der für das BOFS verdächtigen Gene und auch die Liste der in der Region kartierten Erkrankungen sind in den folgenden Tabellen dargestellt. Diese wurden nach den in der Diskussion erklärten Grundsätzen so zusammengestellt, dass von den Genen, die auf einem Chromosom lokalisiert sind, nur diejenigen gelistet sind, die nach diesen Kriterien eine mögliche Verbindung zu den Symptomen des BOFS haben könnten.

Von jedem nicht aufgrund von Segregationsanalysen ausgeschlossenen Chromosom wird zuerst die Tabelle (a) mit den in der Region kartierten Genen gezeigt. Falls Krankheitsbilder dieser chromosomalen Region in Beziehung mit dem BOFS stehen, werden diese in einer zweiten Tabelle (b) dargestellt. Allen Tabellen liegen die Daten aus der Datenbank von *H. sapiens* (NCBI *mapview* Genome Build 35.1) zugrunde. Die zwischenzeitlich (September 2006) veröffentlichte Version 36.2 wurde ignoriert, da hier nicht nur alle Gene (tatsächliche und vom Computer vorhergesagte) enthalten sind, sondern von jedem einzelnen Gen jedes Exon als eigener Datensatz existiert, was die Darstellung unübersichtlich gestalten würde.

Bei den Gentabellen ist in der ersten Spalte das Symbol des Gens und in der zweiten eine kurze Beschreibung des Genproduktes in alphabetischer Sortierung dargestellt. In der drit-

ten Spalte wurde (nach weiter unten aufgeführten Gründen) eine persönliche Einschätzung über die Wahrscheinlichkeit eines Zusammenhangs mit dem BOFS dargestellt. Gene, die mit hoher Sicherheit ausgeschlossen werden konnten, wurden aus der Tabelle herausgenommen. Gene, über die keine Aussage getroffen werden kann, wurden mit „?“ und Gene, die in einem Zusammenhang mit dem BOFS stehen könnten, mit „j“ gekennzeichnet.

Bei den, auf den folgenden Seiten dargestellten Krankheitstabellen wird in der ersten Spalte die OMIM-Nummer der Erkrankung angezeigt, in der zweiten der Name und in der dritten das Symbol, das das Krankheitsbild in der OMIM-Datenbank hat.

Für **Chromosom 1** konnten keine gemeinsamen Haplotypen bei den erkrankten Individuen gefunden werden. Somit ist dieses Chromosom komplett als Kandidatengenregion für das BOFS ausgeschlossen.

Tabelle 7: Chromosom 2. Region: 0 – 7.389.274 bp

44 Gene befinden sich in dieser Region; 20 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 12 auf Seite 68.

Gen-Symbol	Name	?
<i>C2orf22</i>	chromosome 2 open reading frame 22	?
<i>COLEC11</i>	collectin sub-family member 11	?
<i>DDEF2</i>	development and differentiation enhancing factor 2	?
<i>DDX1</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 1	?
<i>E2F6</i>	E2F transcription factor 6	?
<i>ITGB1BP1</i>	integrin beta 1 binding protein 1	?
<i>KCNF1</i>	potassium voltage-gated channel, subfamily F, member 1	?
<i>LAPTM4A</i>	lysosomal-associated protein transmembrane 4 alpha	?
<i>MYT1L</i>	myelin transcription factor 1-like	?
<i>NTSR2</i>	neurotensin receptor 2	?
<i>OACT2</i>	O-acyltransferase (membrane bound) domain containing 2	?
<i>ODD</i>	odd-skipped homolog (Drosophila)	?
<i>RNF144</i>	ring finger protein 144	?
<i>RPS7</i>	ribosomal protein S7	?
<i>SOX11</i>	SRY (sex determining region Y)-box 11	?
<i>TFCP2L2</i>	transcription factor CP2-like 2	?
<i>TIEG2</i>	TGFB inducible early growth response 2	?
<i>TXNDC7</i>	thioredoxin domain containing 7 (protein disulfide isomerase)	?
<i>WDR35</i>	WD repeat domain 35	?
<i>YWHAQ</i>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein,	?

Gen-Symbol	Name	?
	theta polypeptide	

Für **Chromosom 2** konnten 4 Krankheitsbilder im Bereich des gemeinsamen Haplotypen der erkrankten Individuen gefunden werden. Allerdings konnten die aus dem Intervall 0 – 7.389.274 bp gefundene Krankheitsbilder anhand der Symptome ausgeschlossen werden.

Tabelle 8a: Chromosom 3. Regionen: 124.525.825 – 174.965.717 bp und 193.159.931 – 198.502.745 bp

442 Gene befinden sich in diesen Regionen; 58 davon kamen in die engere Wahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 13 auf Seite 68.

Gen-Symbol	Name	?
<i>ABTB1</i>	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 1	?
<i>AMOTL2</i>	angiomin like 2	?
<i>ARMC8</i>	armadillo repeat containing 8	?
<i>BITE</i>	p10-binding protein	?
<i>CHCHD6</i>	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 6	?
<i>CHR3SYT</i>	chr3 synaptotagmin	?
<i>CHST13</i>	carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 13	?
<i>CHST2</i>	carbohydrate (N-acetylglucosamine-6-O) sulfotransferase 2	?
<i>CLDN18</i>	claudin 18	?
<i>COMMD2</i>	COMM domain containing 2	?
<i>CPA3</i>	carboxypeptidase A3 (mast cell)	?
<i>CPNE4</i>	copine IV	?
<i>DHX36</i>	DEAH (Asp-Glu-Ala-His) box polypeptide 36	?
<i>DNAJC13</i>	DnaJ (Hsp40) homolog, subfamily C, member 13	?
<i>EPHB1</i>	EphB1	?
<i>FAIM</i>	Fas apoptotic inhibitory molecule	?
<i>FLJ12592</i>	putative acyl-CoA dehydrogenase	?
<i>FLJ46299</i>	FLJ46299 protein	?
<i>GOLPH4</i>	golgi phosphoprotein 4	?
<i>GR6</i>	putative GR6 protein	?
<i>ITGB5</i>	integrin, beta 5	j
<i>KPNA4</i>	karyopherin alpha 4 (importin alpha 3)	?
<i>KY</i>	kyphoscoliosis peptidase	?
<i>MRAS</i>	muscle RAS oncogene homolog	?
<i>MUC13</i>	mucin 13, epithelial transmembrane	?
<i>MYNN</i>	myoneurin	?
<i>NCK1</i>	NCK adaptor protein 1	?
<i>OSBPL11</i>	oxysterol binding protein-like 11	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>PCOLCE2</i>	procollagen C-endopeptidase enhancer 2	?
<i>PDCD10</i>	programmed cell death 10	?
<i>PIK3CB</i>	phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide	?
<i>PIK3R4</i>	phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 4, p150	?
<i>PLD1</i>	phospholipase D1, phosphatidylcholine-specific	?
<i>PLXNA1</i>	plexin A1	?
<i>RAB6B</i>	RAB6B, member RAS oncogene family	?
<i>RASA2</i>	RAS p21 protein activator 2	?
<i>RNF13</i>	ring finger protein 13	?
<i>RYK</i>	RYK receptor-like tyrosine kinase	?
<i>SELT</i>	selenoprotein T	?
<i>SHOX2</i>	short stature homeobox 2	?
<i>SKIL</i>	SKI-like	?
<i>SLC12A8</i>	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 8	?
<i>SLC33A1</i>	solute carrier family 33 (acetyl-CoA transporter), member 1	?
<i>SLC41A3</i>	solute carrier family 41, member 3	?
<i>SNX4</i>	sorting nexin 4	?
<i>SOX14</i>	SRY (sex determining region Y)-box 14	j
<i>SRPRB</i>	signal recognition particle receptor, B subunit	?
<i>STAG1</i>	stromal antigen 1	?
<i>TAZ</i>	transcriptional co-activator with PDZ-binding motif (TAZ)	?
<i>TFDP2</i>	transcription factor Dp-2 (E2F dimerization partner 2)	?
<i>TLOC1</i>	translocation protein 1	?
<i>TOPBP1</i>	topoisomerase (DNA) II binding protein 1	?
<i>TRIM42</i>	tripartite motif-containing 42	?
<i>TRIM59</i>	tripartite motif-containing 59	?
<i>UBE1DC1</i>	ubiquitin-activating enzyme E1-domain containing 1	?
<i>USH3A</i>	Usher syndrome 3A	j
<i>ZIC1</i>	Zic family member 1 (odd-paired homolog, Drosophila)	?
<i>ZIC4</i>	Zic family member 4	?

Tabelle 8b: Chromosom 3. Krankheitsbilder in den Regionen 124.525.825 – 174.965.717 bp und 193.159.931 – 198.502.745 bp

Von den in der Datenbank gefundenen 47 Krankheitsbildern kamen nur zwei in die engere Auswahl, 45 wurden verworfen. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 13 auf Seite 68.

OMIM-Nummer	Krankheitsbilder	Symbol
603212	Cataract, juvenile-onset; Cataract, congenital	BFSP2
117700	Hypoceruloplasminemia, hereditary; Cerebellar ataxia; Hemosiderosis, systemic, due to aceruloplasminemia	CP

Tabelle 9a: Chromosom 4. Region: 40.047.136 – 122.344.093 bp

528 Gene befinden sich in dieser Region; 30 davon kamen in die engere Wahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 14 auf Seite 70.

Gen-Symbol	Name	?
<i>ANXA3</i>	annexin A3	?
<i>ASAH1</i>	N-acylsphingosine amidohydrolase (acid ceramidase)-like	?
<i>ATP8A1</i>	ATPase, aminophospholipid transporter (APLT), Class I, type 8A, member 1	?
<i>BRDG1</i>	BCR downstream signaling 1	?
<i>CCNG2</i>	cyclin G2	?
<i>CCNI</i>	cyclin I	?
<i>CDKL2</i>	cyclin-dependent kinase-like 2 (CDC2-related kinase)	?
<i>CHIC2</i>	cysteine-rich hydrophobic domain 2	?
<i>FRAS1</i>	Fraser syndrome 1	j
<i>G3BP2</i>	Ras-GTPase activating protein SH3 domain-binding protein 2	?
<i>GRSF1</i>	G-rich RNA sequence binding factor 1	?
<i>HAT</i>	airway trypsin-like protease	?
<i>KDR</i>	kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)	?
<i>LPHN3</i>	latrophilin 3	?
<i>N4BP2</i>	Nedd4 binding protein 2	?
<i>NRPS998</i>	2-aminoadipic 6-semialdehyde dehydrogenase	?
<i>PDCL2</i>	phosducin-like 2	?
<i>PDGFRA</i>	platelet-derived growth factor receptor, alpha polypeptide	j
<i>PWDMP</i>	WD repeat membrane protein PWDMP	?
<i>RASSF6</i>	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family 6	?
<i>RCHY1</i>	ring finger and CHY zinc finger domain containing 1	?
<i>RPL9</i>	ribosomal protein L9	?
<i>SCARB2</i>	scavenger receptor class B, member 2	?
<i>SCFD2</i>	sec1 family domain containing 2	?
<i>SEC3L1</i>	SEC3-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	?
<i>ShrmL</i>	Shroom-related protein	?
<i>SLC30A9</i>	solute carrier family 30 (zinc transporter), member 9	?
<i>SLC4A4</i>	solute carrier family 4, sodium bicarbonate cotransporter, member 4	j
<i>TEC</i>	tec protein tyrosine kinase	?
<i>VDP</i>	vesicle docking protein p115	?

Tabelle 9b: Chromosom 4. Krankheitsbilder in der Region 40.047.136 – 122.344.093 bp

Von den in der Datenbank gefundenen 46 Krankheitsbildern kam nur eines in die engere Auswahl, 45 wurden verworfen. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 14 auf Seite 70.

OMIM-Nummer	Krankheitsbild(er)	Symbol
603786	Morbus Stargardt Typ 4	STGD4

Tabelle 10a: Chromosom 5. Region: 168.375.302 – 179.921.252 bp

161 Gene befinden sich in dieser Region; 39 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 15 auf Seite 71.

Gen-Symbol	Name	?
<i>CANX</i>	calnexin	?
<i>CLK4</i>	CDC-like kinase 4	?
<i>CLTB</i>	clathrin, light polypeptide (Lcb)	?
<i>COL23A1</i>	collagen, type XXIII, alpha 1	?
<i>DDX41</i>	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 41	?
<i>DUSP1</i>	dual specificity phosphatase 1	j
<i>ETEA(UBXD8)</i>	expressed in T-cells and eosinophils in atopic dermatitis	?
<i>FBXW11</i>	F-box and WD-40 domain protein 11	?
<i>FGF1</i>	fibroblast growth factor 1	j
<i>FGF18</i>	fibroblast growth factor 18	j
<i>FGFR4</i>	fibroblast growth factor receptor 4	j
<i>FLT4</i>	fms-related tyrosine kinase 4	j
<i>FOXJ1</i>	forkhead box J1	j
<i>HNRPAB</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A/B	?
<i>HNRPH1</i>	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H1 (H)	?
<i>MAML1</i>	mastermind-like 1 (Drosophila)	?
<i>MGAT1</i>	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,2-N-acetylglucosaminyltransferase	?
<i>MGAT4B</i>	mannosyl (alpha-1,3-)-glycoprotein beta-1,4-N-acetylglucosaminyltransferase, isoenzyme B	?
<i>MSX2</i>	msh homeo box homolog 2 (Drosophila)	j
<i>MXD3</i>	MAX dimerization protein 3	?
<i>NOLA2</i>	nucleolar protein family A, member 2 (H/ACA small nucleolar RNPs)	?
<i>NPM1</i>	nucleophosmin (nucleolar phosphoprotein B23, numatrin)	?
<i>PC-LKC</i>	protocadherin LKC	?
<i>PDLIM7</i>	PDZ and LIM domain 7 (enigma)	?
<i>RANBP17</i>	RAN binding protein 17	?
<i>RASGEF1C</i>	RasGEF domain family, member 1C	?
<i>RGS14</i>	regulator of G-protein signalling 14	?
<i>RNF130</i>	ring finger protein 130	?
<i>RNF44</i>	ring finger protein 44	?
<i>RPL26L1</i>	ribosomal protein L26-like 1	?
<i>SFXN1</i>	sideroflexin 1	?
<i>SLC34A1</i>	solute carrier family 34 (sodium phosphate), member 1	?
<i>STC2</i>	stanniocalcin 2	?
<i>TLX3</i>	T-cell leukemia, homeobox 3	?
<i>ZNF346</i>	zinc finger protein 346	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>ZNF354A</i>	zinc finger protein 354A	?
<i>ZNF354B</i>	zinc finger protein 354B	?
<i>ZNF354C</i>	zinc finger protein 354C	?
<i>ZNF454</i>	zinc finger protein 454	?

Tabelle 10b: Chromosom 5. Krankheitsbilder in der Region 168.375.302 – 179.921.252 bp

Von den in der Datenbank gefundenen 15 Krankheitsbildern kamen nur drei in die engere Auswahl, 12 wurden verworfen. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 15 auf Seite 71.

OMIM-Nummer	Krankheitsbilder	Symbol
123101	Craniosynostosis, type 2; Parietal foramina 1; Parietal foramina with cleidocranial dysplasia	MSX2
606681	Weaver syndrome	NSD1
136352	Hemangioma, capillary infantile, somatic	FLT4

Tabelle 11a: Chromosom 6. Region: 0 – 36.373.842 bp

612 Gene befinden sich in dieser Region; 102 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 16 auf Seite 72.

Gen-Symbol	Name	?
<i>ABCF1</i>	ATP-binding cassette, sub-family F (GCN20), member 1	?
<i>ABT1</i>	activator of basal transcription 1	?
<i>AGER</i>	advanced glycosylation end product-specific receptor	?
<i>AGPAT1</i>	1-acylglycerol-3-phosphate O-acyltransferase 1 (lysophosphatidic acid acyltransferase, alpha)	?
<i>ATP6V1G2</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 13kDa, V1 subunit G isoform 2	?
<i>BMP6</i>	bone morphogenetic protein 6	?
<i>BPHL</i>	biphenyl hydrolase-like (serine hydrolase; breast epithelial mucin-associated antigen)	?
<i>CLIC1</i>	chloride intracellular channel 1	?
<i>CPNE5</i>	copine V	?
<i>CREBL1</i>	cAMP responsive element binding protein-like 1	?
<i>CSNK2B</i>	casein kinase 2, beta polypeptide	?
<i>CTAG3</i>	cancer/testis antigen 3	?
<i>DAAM2</i>	dishevelled associated activator of morphogenesis 2	j
<i>DDAH2</i>	dimethylarginine dimethylaminohydrolase 2	?
<i>DDR1</i>	discoidin domain receptor family, member 1	?
<i>DOM3Z</i>	dom-3 homolog Z (<i>C. elegans</i>)	?
<i>DSP</i>	desmoplakin	?
<i>DTNBP1</i>	dystrobrevin binding protein 1	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>EDN1</i>	endothelin 1	?
<i>EGFL8</i>	EGF-like-domain, multiple 8	?
<i>FKBPL</i>	FK506 binding protein like	?
<i>FLOT1</i>	flotillin 1	?
<i>FOXF2</i>	forkhead box F2	?
<i>FOXP4</i>	forkhead box P4	j
<i>FOXQ1</i>	forkhead box Q1	?
<i>FRS3</i>	fibroblast growth factor receptor substrate 3	j
<i>GMNN</i>	geminin, DNA replication inhibitor	j
<i>GNL1</i>	guanine nucleotide binding protein-like 1	?
<i>GPLD1</i>	glycosylphosphatidylinositol specific phospholipase D1	?
<i>GPX6</i>	glutathione peroxidase 6 (olfactory)	?
<i>GTF2H4</i>	general transcription factor IIIH, polypeptide 4, 52kDa	?
<i>HCG9</i>	HLA complex group 9	?
<i>HLA-F</i>	major histocompatibility complex, class I, F	?
<i>HMGN4</i>	high mobility group nucleosomal binding domain 4	?
<i>HSPA1A</i>	heat shock 70kDa protein 1A	?
<i>HSPA1B</i>	heat shock 70kDa protein 1B	?
<i>HSPA1L</i>	heat shock 70kDa protein 1-like	?
<i>HUS1B</i>	HUS1 checkpoint homolog b (S. pombe)	?
<i>IBRDC2</i>	IBR domain containing 2	?
<i>IER3</i>	immediate early response 3	?
<i>IHPK3</i>	inositol hexaphosphate kinase 3	?
<i>KIF13A</i>	kinesin family member 13A	?
<i>LRRC16</i>	leucine rich repeat containing 16	?
<i>LY86</i>	lymphocyte antigen 86	?
<i>MRS2L</i>	MRS2-like, magnesium homeostasis factor (S. cerevisiae)	?
<i>NFYA</i>	nuclear transcription factor Y, alpha	?
<i>NOTCH4</i>	Notch homolog 4 (Drosophila)	?
<i>NUP153</i>	nucleoporin 153kDa	?
<i>OFCC1</i>	orofacial cleft 1 candidate 1	?
<i>PAK1IP1</i>	PAK1 interacting protein 1	?
<i>PBX2</i>	pre-B-cell leukemia transcription factor 2	?
<i>PGBD1</i>	piggyBac transposable element derived 1	?
<i>PHACTR1</i>	phosphatase and actin regulator 1	?
<i>PHF1</i>	PHD finger protein 1	?
<i>POU5F1</i>	POU domain, class 5, transcription factor 1	?
<i>PPP1R10</i>	protein phosphatase 1, regulatory subunit 10	?
<i>PPP1R11</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 11	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>PRSS16</i>	protease, serine, 16 (thymus)	?
<i>RANBP9</i>	RAN binding protein 9	?
<i>RDBP</i>	RD RNA binding protein	?
<i>RFP</i>	ret finger protein	?
<i>RING1</i>	ring finger protein 1	?
<i>RIOK1</i>	RIO kinase 1 (yeast)	?
<i>RIPK1</i>	receptor (TNFRSF)-interacting serine-threonine kinase 1	?
<i>RNF39</i>	ring finger protein 39	?
<i>RNF5</i>	ring finger protein 5	?
<i>RNF8</i>	ring finger protein (C3HC4 type) 8	?
<i>RPS10</i>	ribosomal protein S10	?
<i>RREB1</i>	ras responsive element binding protein 1	?
<i>SEC5L1</i>	SEC5-like 1 (<i>S. cerevisiae</i>)	?
<i>SERPINB1</i>	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 1	?
<i>SERPINB6</i>	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 6	?
<i>SERPINB9</i>	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 9	?
<i>SIRT5</i>	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 5 (<i>S. cerevisiae</i>)	?
<i>SKIV2L</i>	superkiller viralicidic activity 2-like (<i>S. cerevisiae</i>)	?
<i>SLC35B3</i>	solute carrier family 35, member B3	?
<i>SLC39A7</i>	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 7	?
<i>SOX4</i>	SRY (sex determining region Y)-box 4	?
<i>SSR1</i>	signal sequence receptor, alpha (translocon-associated protein alpha)	?
<i>STK19</i>	serine/threonine kinase 19	?
<i>TAF11</i>	TAF11 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 28kDa	?
<i>TFAP2A</i>	transcription factor AP-2 alpha (activating enhancer binding protein 2 alpha)	?
<i>THEM2</i>	thioesterase superfamily member 2	?
<i>TRIM10</i>	tripartite motif-containing 10	?
<i>TRIM15</i>	tripartite motif-containing 15	?
<i>TRIM26</i>	tripartite motif-containing 26	?
<i>TRIM31</i>	tripartite motif-containing 31	?
<i>TRIM38</i>	tripartite motif-containing 38	?
<i>TRIM39</i>	tripartite motif-containing 39	?
<i>TRIM40</i>	tripartite motif-containing 40	?
<i>TTRAP</i>	TRAF and TNF receptor associated protein	?
<i>UBD</i>	ubiquitin D	?
<i>USP49</i>	ubiquitin specific protease 49	?
<i>VPS52</i>	vacuolar protein sorting 52 (yeast)	?
<i>ZNF165</i>	zinc finger protein 165	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>ZNF184</i>	zinc finger protein 184 (Kruppel-like)	?
<i>ZNF187</i>	zinc finger protein 187	?
<i>ZNF192</i>	zinc finger protein 192	?
<i>ZNF311</i>	zinc finger protein 311	?
<i>ZNF322A</i>	zinc finger protein 322A	?
<i>ZNF76</i>	zinc finger protein 76 (expressed in testis)	?
<i>ZNRD1</i>	zinc ribbon domain containing, 1	?

Tabelle 11b: Chromosom 6. Krankheitsbilder in der Region 0 – 36.373.842 bp

Von den in der Datenbank gefundenen 52 Krankheitsbildern kam nur eines in die engere Auswahl, 51 wurden verworfen. HaploPaint-Diagramm von Chromosom 6 siehe Abbildung 16 auf Seite 72.

OMIM-Nummer	Krankheitsbilder	Symbol
119530	Orofacial cleft-1	OFC1

Tabelle 12: Chromosom 7. Region: 66.694.958 – 115.682.245 bp

404 Gene befinden sich in dieser Region; 84 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 17 auf Seite 73.

Gen-Symbol	Name	?
<i>ADAM22</i>	a disintegrin and metalloproteinase domain 22	?
<i>ARPC1A</i>	actin related protein 2/3 complex, subunit 1A, 41kDa	?
<i>ARPC1B</i>	actin related protein 2/3 complex, subunit 1B, 41kDa	?
<i>ACTL6B</i>	actin-like 6B	?
<i>ASK</i>	activator of S phase kinase	?
<i>APS</i>	adaptor protein with pleckstrin homology and src homology 2 domains	?
<i>AP1S1</i>	adaptor-related protein complex 1, sigma 1 subunit	?
<i>ASB4</i>	ankyrin repeat and SOCS box-containing 4	?
<i>ARS2</i>	arsenate resistance protein ARS2	?
<i>ATP6V1F</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 14kDa, V1 subunit F	?
<i>AIP1</i>	atrophin-1 interacting protein 1	?
<i>BAZ1B</i>	bromodomain adjacent to zinc finger domain, 1B	?
<i>CADPS2</i>	Ca ²⁺ -dependent activator protein for secretion 2	?
<i>CAPZA2</i>	capping protein (actin filament) muscle Z-line, alpha 2	?
<i>CAV2</i>	caveolin 2	?
<i>CCT6A</i>	chaperonin containing TCP1, subunit 6A (zeta 1)	?
<i>CLDN15</i>	claudin 15	?
<i>CPSF4</i>	cleavage and polyadenylation specific factor 4, 30kDa	?
<i>COPG2</i>	coatamer protein complex, subunit gamma 2	?
<i>CHCHD2</i>	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain containing 2	?
<i>COPS6</i>	COP9 constitutive photomorphogenic homolog subunit 6 (Arabidopsis)	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>CTNBP2</i>	cortactin binding protein 2	?
<i>CUTL1</i>	cut-like 1, CCAAT displacement protein (Drosophila)	?
<i>DMTF1</i>	cyclin D binding myb-like transcription factor 1	?
<i>EGFR</i>	epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)	j
<i>FKBP9L</i>	FK506 binding protein 9-like	?
<i>FZD1</i>	frizzled homolog 1 (Drosophila)	?
<i>FZD9</i>	frizzled homolog 9 (Drosophila)	j
<i>GPR85</i>	G protein-coupled receptor 85	?
<i>GTF2IRD1</i>	GTF2I repeat domain containing 1	?
<i>GNAI1</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1	?
<i>GNB2</i>	guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2	?
<i>GNAT3</i>	guanine nucleotide binding protein, alpha transducing 3	?
<i>HIC</i>	I-mfa domain-containing protein	?
<i>LANCL2</i>	LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial)	?
<i>LMTK2</i>	lemur tyrosine kinase 2	?
<i>LRRC4</i>	leucine rich repeat containing 4	?
<i>NPTX2</i>	neuronal pentraxin II	?
<i>NIPA</i>	nuclear interacting partner of anaplastic lymphoma kinase (ALK)	?
<i>NRF1</i>	nuclear respiratory factor 1	?
<i>ODAG</i>	ocular development-associated gene	j
<i>PDAP1</i>	PDGFA associated protein 1	?
<i>PTCD1</i>	pentatricopeptide repeat domain 1	?
<i>PEX1</i>	peroxisome biogenesis factor 1	j
<i>PFTK1</i>	PFTAIRE protein kinase 1	?
<i>POMZP3</i>	POM (POM121 homolog, rat) and ZP3 fusion	?
<i>PRKRIP1</i>	PRKR interacting protein 1 (IL11 inducible)	?
<i>PCOLCE</i>	procollagen C-endopeptidase enhancer	?
<i>PPP1R9A</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 9A	?
<i>RASA4</i>	RAS p21 protein activator 4	?
<i>RBM28</i>	RNA binding motif protein 28	?
<i>SRCRB4D</i>	scavenger receptor cysteine rich domain containing, group B (4 domains)	?
<i>SEC61G</i>	Sec61 gamma subunit	?
<i>SEMA3A</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A	?
<i>SEMA3C</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3C	?
<i>SEMA3D</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3D	?
<i>SEMA3E</i>	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted,	?

Gen-Symbol	Name	?
	(semaphorin) 3E	
<i>SLC12A9</i>	solute carrier family 12 (potassium/chloride transporters), member 9	?
<i>SLC26A4</i>	solute carrier family 26, member 4	j
<i>SRI</i>	sorcin	?
<i>SAMD9</i>	sterile alpha motif domain containing 9	?
<i>SUMF2</i>	sulfatase modifying factor 2	?
<i>TAF6</i>	TAF6 RNA polymerase II, TATA box binding protein (TBP)-associated factor, 80kDa	j
<i>TES</i>	testis derived transcript (3 LIM domains)	?
<i>TRIP6</i>	thyroid hormone receptor interactor 6	?
<i>TFEC</i>	transcription factor EC	?
<i>TM4SF12</i>	transmembrane 4 superfamily member 12	?
<i>TNPO3</i>	transportin 3	?
<i>TRIM4</i>	tripartite motif-containing 4	?
<i>TRIM56</i>	tripartite motif-containing 56	?
<i>YWHAG</i>	tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein, gamma polypeptide	?
<i>VIK</i>	vav-1 interacting Kruppel-like protein	j
<i>WNT2</i>	wingless-type MMTV integration site family member 2	?
<i>ZNF277</i>	zinc finger protein (C2H2 type) 277	?
<i>ZFD25</i>	zinc finger protein (ZFD25)	?
<i>ZNF117</i>	zinc finger protein 117 (HPF9)	j
<i>ZNF138</i>	zinc finger protein 138 (clone pHZ-32)	?
<i>ZNF3</i>	zinc finger protein 3 (A8-51)	j
<i>ZNF36</i>	zinc finger protein 36 (KOX 18)	j
<i>ZNF38</i>	zinc finger protein 38	j
<i>ZNF498</i>	zinc finger protein 498	j
<i>ZNF92</i>	zinc finger protein 92 (HTF12)	?
<i>ZFP95</i>	zinc finger protein 95 homolog (mouse)	j
<i>ZNHIT1</i>	zinc finger, HIT domain containing 1	?

Für **Chromosom 7** konnten 41 Krankheitsbilder im Bereich des gemeinsamen Haplotypen der erkrankten Individuen gefunden werden. Allerdings konnten die aus dem Intervall 66.694.958 – 115.682.245 bp gefundene Krankheitsbilder anhand der Symptome ausgeschlossen werden.

Für die **Chromosomen 8, 9 und 10** konnten keine gemeinsamen Haplotypen bei den erkrankten Individuen gefunden werden. Somit sind diese Chromosomen komplett als Kandidatengenregionen für das BOFS ausgeschlossen.

Tabelle 13a: Chromosom 11. Region: 5.944.360 – 67.650.107 bp

948 Gene befinden sich in dieser Region; 133 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 18 auf Seite 74.

Gen-Symbol	Name	?
<i>ABTB2</i>	ankyrin repeat and BTB (POZ) domain containing 2	?
<i>ACY-3</i>	aspartoacylase-3	?
<i>ALDH3B1</i>	aldehyde dehydrogenase 3 family, member B1	?
<i>ARFIP2</i>	ADP-ribosylation factor interacting protein 2 (arfaptin 2)	?
<i>ARHGAP1</i>	Rho GTPase activating protein 1	?
<i>ASCL3</i>	achaete-scute complex (Drosophila) homolog-like 3	?
<i>ASRGL1</i>	asparaginase like 1	?
<i>BHC80</i>	BRAF35/HDAC2 complex (80 kDa)	?
<i>CDC42EP2</i>	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 2	?
<i>CHST1</i>	carbohydrate (keratan sulfate Gal-6) sulfotransferase 1	?
<i>CLC</i>	cardiotrophin-like cytokine	?
<i>CMT4B2</i>	Charcot-Marie-Tooth neuropathy 4B2 (autosomal recessive, with myelin outfolding)	j
<i>COPB</i>	coatamer protein complex, subunit beta	j
<i>CORO1B</i>	coronin, actin binding protein, 1B	?
<i>CREB3L1</i>	cAMP responsive element binding protein 3-like 1	?
<i>CSTF3</i>	cleavage stimulation factor, 3' pre-RNA, subunit 3, 77kDa	?
<i>CTNND1</i>	catenin (cadherin-associated protein), delta 1	?
<i>DELGEF</i>	deafness locus associated putative guanine nucleotide exchange factor	?
<i>DKK3</i>	dickkopf homolog 3 (Xenopus laevis)	?
<i>DPF2</i>	D4, zinc and double PHD fingers family 2	?
<i>DPP3</i>	dipeptidylpeptidase 3	?
<i>EFEMP2</i>	EGF-containing fibulin-like extracellular matrix protein 2	?
<i>EHD1</i>	EH-domain containing 1	?
<i>FBXL11</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 11	?
<i>FBXO3</i>	F-box protein 3	?
<i>FGF19</i>	fibroblast growth factor 19	j
<i>FIBP</i>	fibroblast growth factor (acidic) intracellular binding protein	j
<i>FLRT1</i>	fibronectin leucine rich transmembrane protein 1	?
<i>FXC1</i>	fracture callus 1 homolog (rat)	?
<i>GAL3ST3</i>	galactose-3-O-sulfotransferase 3	?
<i>GALNTL4</i>	UDP-N-acetyl-alpha-D-galactosamine:polypeptide N-acetylgalactosaminyltransferase-like 4	?
<i>GAS2</i>	growth arrest-specific 2	?
<i>GLYAT</i>	glycine-N-acyltransferase	?
<i>GPR48</i>	G protein-coupled receptor 48	?
<i>GSTP1</i>	glutathione S-transferase pi	?
<i>HIPK3</i>	homeodomain interacting protein kinase 3	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>HPS5</i>	Hermansky-Pudlak syndrome 5	j
<i>HRASLS2</i>	HRAS-like suppressor 2	?
<i>HRASLS3</i>	HRAS-like suppressor 3	?
<i>HRLP5</i>	H-rev107-like protein 5	?
<i>HRMT1L3</i>	HMT1 hnRNP methyltransferase-like 3 (<i>S. cerevisiae</i>)	?
<i>HSPCAL3</i>	heat shock 90kDa protein 1, alpha-like 3	?
<i>HTATIP</i>	HIV-1 Tat interacting protein, 60kDa	?
<i>IPO7</i>	importin 7	?
<i>KBTBD4</i>	kelch repeat and BTB (POZ) domain containing 4	?
<i>KCNK1</i>	potassium voltage-gated channel, Shaw-related subfamily, member 1	?
<i>LIN7C</i>	lin-7 homolog C (<i>C. elegans</i>)	?
<i>LMO1</i>	LIM domain only 1 (rhombotin 1)	?
<i>LRP4</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 4	?
<i>LRP5</i>	low density lipoprotein receptor-related protein 5	?
<i>MAP3K11</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase 11	j
<i>MAP4K2</i>	mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 2	?
<i>MARK2</i>	MAP/microtubule affinity-regulating kinase 2	?
<i>MICAL2</i>	flavoprotein oxidoreductase MICAL2	?
<i>MRGPRD</i>	MAS-related GPR, member D	?
<i>MS4A10</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 10	?
<i>MS4A12</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 12	?
<i>MS4A4A</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 4	?
<i>MS4A6A</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 6A	?
<i>MS4A7</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 7	?
<i>MS4A8B</i>	membrane-spanning 4-domains, subfamily A, member 8B	?
<i>MUC15</i>	mucin 15	?
<i>NAV2</i>	neuron navigator 2	j
<i>NELL1</i>	NEL-like 1 (chicken)	j
<i>NRIP3</i>	nuclear receptor interacting protein 3	?
<i>NUCB2</i>	nucleobindin 2	?
<i>NXF1</i>	nuclear RNA export factor 1	j
<i>NYD-SP21</i>	testes development-related NYD-SP21	?
<i>OTOG</i>	otogelin	j
<i>PACSIN3</i>	protein kinase C and casein kinase substrate in neurons 3	?
<i>PARVA</i>	parvin, alpha	?
<i>PAX6</i>	paired box gene 6 (aniridia, keratitis)	j
<i>PIK3C2A</i>	phosphoinositide-3-kinase, class 2, alpha polypeptide	?
<i>PLCB3</i>	phospholipase C, beta 3 (phosphatidylinositol-specific)	j
<i>POLD4</i>	polymerase (DNA-directed), delta 4	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>POLR2G</i>	polymerase (RNA) II (DNA directed) polypeptide G	?
<i>PPFIA1</i>	protein tyrosine phosphatase, receptor type, f polypeptide (PTPRF), interacting protein (liprin),	?
<i>PPFIBP2</i>	PTPRF interacting protein, binding protein 2 (liprin beta 2)	?
<i>PPP1R14B</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14B	?
<i>PRDM11</i>	PR domain containing 11	?
<i>PRG3</i>	proteoglycan 3	?
<i>PRKCDBP</i>	protein kinase C, delta binding protein	?
<i>PTH</i>	parathyroid hormone	?
<i>RAB3IL1</i>	RAB3A interacting protein (rabin3)-like 1	?
<i>RAB6IP1</i>	RAB6 interacting protein 1	?
<i>RAD9A</i>	RAD9 homolog A (S. pombe)	?
<i>RBM14</i>	RNA binding motif protein 14	?
<i>RBM4</i>	RNA binding motif protein 4	?
<i>RCN1</i>	reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	?
<i>RHOD</i>	ras homolog gene family, member D	?
<i>RIC3</i>	RIC3 protein	?
<i>RNU22</i>	RNA, U22 small nucleolar	?
<i>RPS6KA4</i>	ribosomal protein S6 kinase, 90kDa, polypeptide 4	?
<i>RTN3</i>	reticulon 3	?
<i>RTN4RL2</i>	reticulon 4 receptor-like 2	?
<i>SCGB1A1</i>	secretoglobin, family 1A, member 1 (uteroglobin)	?
<i>SCGB1D2</i>	secretoglobin, family 1D, member 2	?
<i>SCGB2A1</i>	secretoglobin, family 2A, member 1	?
<i>SCYL1</i>	SCY1-like 1 (S. cerevisiae)	?
<i>SLC22A11</i>	solute carrier family 22 (organic anion/cation transporter), member 11	?
<i>SLC22A6</i>	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 6	?
<i>SLC22A8</i>	solute carrier family 22 (organic anion transporter), member 8	?
<i>SLC39A13</i>	solute carrier family 39 (zinc transporter), member 13	?
<i>SLC3A2</i>	solute carrier family 3 (activators of dibasic and neutral amino acid transport), member 2	?
<i>SMAP</i>	small acidic protein	?
<i>SSH3</i>	slingshot homolog 3 (Drosophila)	?
<i>SSSCA1</i>	Sjogren's syndrome/scleroderma autoantigen 1	?
<i>STIP1</i>	stress-induced-phosphoprotein 1 (Hsp70/Hsp90-organizing protein)	?
<i>STK33</i>	serine/threonine kinase 33	?
<i>STX5A</i>	syntaxin 5A	?
<i>SUV420H1</i>	suppressor of variegation 4-20 homolog 1 (Drosophila)	?
<i>SYT13</i>	synaptotagmin XIII	?
<i>SYVN1</i>	synovial apoptosis inhibitor 1, synoviolin	?
<i>TBX10</i>	T-box 10	j

Gen-Symbol	Name	?
<i>TEAD1</i>	TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)	?
<i>TMEM16C</i>	transmembrane protein 16C	?
<i>TMG4</i>	transmembrane gamma-carboxyglutamic acid protein 4	?
<i>TMX2</i>	thioredoxin-related transmembrane protein 2	?
<i>TP53I11</i>	tumor protein p53 inducible protein 11	?
<i>TRIM3</i>	tripartite motif-containing 3	?
<i>TRIM44</i>	tripartite motif-containing 44	?
<i>TRIM48</i>	tripartite motif-containing 48	?
<i>TRIM5</i>	tripartite motif-containing 5	?
<i>TRIM51</i>	tripartite motif-containing 51	?
<i>TRIM6</i>	tripartite motif-containing 6	?
<i>USH1C</i>	Usher syndrome 1C (autosomal recessive, severe)	j
<i>XLKD1</i>	extracellular link domain containing 1	?
<i>ZBTB3</i>	zinc finger and BTB domain containing 3	?
<i>ZDHHC13</i>	zinc finger, DHHC domain containing 13	?
<i>ZFPL1</i>	zinc finger protein-like 1	?
<i>ZNF143</i>	zinc finger protein 143 (clone pHZ-1)	?
<i>ZNF214</i>	zinc finger protein 214	?
<i>ZNF215</i>	zinc finger protein 215	?

Tabelle 13b: Chromosom 11. Krankheitsbilder in der Region 5.944.360 – 67.650.107 bp
 Von den in der Datenbank gefundenen 78 Krankheitsbildern kam nur eines in die engere Auswahl, 77 wurden verworfen. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 18 auf Seite 74.

OMIM-Nummer	Krankheitsbild(er)	Symbol
108985	Atrophia areata	AA

Tabelle 14: Chromosom 12. Region: 117.654.605 – 131.829.011 bp

154 Gene befinden sich in dieser Region; 39 davon kamen in die engere Auswahl. Die Darstellung der Daten ist in alphabetischer Reihenfolge der Gene gezeigt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 19 auf Seite 75.

Gen-Symbol	Name	?
<i>ARL6IP4</i>	ADP-ribosylation-like factor 6 interacting protein 4	?
<i>ABCB9</i>	ATP-binding cassette, sub-family B (MDR/TAP), member 9	?
<i>ATP6V0A2</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal V0 subunit a isoform 2	?
<i>BRI3BP</i>	BRI3 binding protein	?
<i>COX6A1</i>	cytochrome c oxidase subunit VIa polypeptide 1	?
<i>DENR</i>	density-regulated protein	?
<i>DIABLO</i>	diablo homolog (Drosophila)	?
<i>DNCL1</i>	dynein, cytoplasmic, light polypeptide 1	?
<i>EPIM</i>	epimorphin	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>FBXL10</i>	F-box and leucine-rich repeat protein 10	?
<i>FBXW8</i>	F-box and WD-40 domain protein 8	?
<i>FZD10</i>	frizzled homolog 10 (Drosophila)	?
<i>GPR109A</i>	G protein-coupled receptor 109A	?
<i>GPR109B</i>	G protein-coupled receptor 109B	?
<i>GPR133</i>	G protein-coupled receptor 133	?
<i>GOLGA3</i>	golgi autoantigen, golgin subfamily a, 3	?
<i>HIP1R</i>	huntingtin interacting protein-1-related	?
<i>KSR2</i>	kinase suppressor of Ras-2	?
<i>MONDOA</i>	Mlx interactor	?
<i>NCOR2</i>	nuclear receptor co-repressor 2	?
<i>PXN</i>	paxillin	?
<i>PXMP2</i>	peroxisomal membrane protein 2, 22kDa	?
<i>PLA2G1B</i>	phospholipase A2, group IB (pancreas)	?
<i>RAB35</i>	RAB35, member RAS oncogene family	?
<i>RAN</i>	RAN, member RAS oncogene family	?
<i>RHOF</i>	ras homolog gene family, member F (in filopodia)	?
<i>RNF10</i>	ring finger protein 10	?
<i>SPPL3</i>	signal peptide peptidase 3	?
<i>SIRT4</i>	sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 4 (S. cerevisiae)	?
<i>SFRS8</i>	splicing factor, arginine/serine-rich 8 (suppressor-of-white-apricot homolog, Drosophila)	?
<i>JIK</i>	STE20-like kinase	?
<i>ULK1</i>	unc-51-like kinase 1 (C. elegans)	?
<i>ZNF10</i>	zinc finger protein 10 (KOX 1)	?
<i>ZNF140</i>	zinc finger protein 140 (clone pHZ-39)	?
<i>ZNF26</i>	zinc finger protein 26 (KOX 20)	?
<i>ZNF268</i>	zinc finger protein 268	?
<i>ZNF605</i>	zinc finger protein 605	?
<i>ZNF84</i>	zinc finger protein 84 (HPF2)	?
<i>ZCCHC8</i>	zinc finger, CCHC domain containing 8	?

Für **Chromosom 12** konnten 15 Krankheitsbilder im Bereich des gemeinsamen Haplotypen der erkrankten Individuen gefunden werden. Allerdings konnten die aus dem Intervall 117.654.605 – 131.829.011 bp gefundene Krankheitsbilder anhand der Symptome ausgeschlossen werden.

Tabelle 15: Chromosom 13. Region: 102.774.320 – 111.843.600 bp

31 Gene befinden sich in dieser Region; 9 davon kamen in die engere Auswahl. Die Darstellung der Daten ist in alphabetischer Reihenfolge der Gene gezeigt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 20 auf Seite 76.

Gen-Symbol	Name	?
<i>ADPRHL1</i>	ADP-ribosylhydrolase like 1	?
<i>ANKRD10</i>	ankyrin repeat domain 10	?
<i>ARHGEF7</i>	Rho guanine nucleotide exchange factor (GEF) 7	?
<i>ATP11A</i>	ATPase, Class VI, type 11A	?
<i>CDC16</i>	CDC16 cell division cycle 16 homolog (<i>S. cerevisiae</i>)	?
<i>RAB20</i>	RAB20, member RAS oncogene family	?
<i>RASA3</i>	RAS p21 protein activator 3	?
<i>SOX1</i>	SRY (sex determining region Y)-box 1	j
<i>TPP2</i>	tripeptidyl peptidase II	?

Für **Chromosom 13** konnten 7 Krankheitsbilder im Bereich des gemeinsamen Haplotypen der erkrankten Individuen gefunden werden. Allerdings konnten die aus dem Intervall 102.774.320 – 111.843.600 bp gefundene Krankheitsbilder anhand der Symptome ausgeschlossen werden.

Tabelle 16a: Chromosom 14. Region: 77.727.920 – 94.366.617 bp

111 Gene befinden sich in dieser Region; 11 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 21 auf Seite 77.

Gen-Symbol	Name	?
<i>CLMN</i>	calmin (calponin-like, transmembrane)	?
<i>DIO2</i>	deiodinase, iodothyronine, type II	j
<i>FAM14A</i>	family with sequence similarity 14, member A	?
<i>GSC</i>	goosecoid	?
<i>JDP2</i>	jun dimerization protein 2	?
<i>NDUFB1</i>	NADH dehydrogenase (ubiquinone) 1 beta subcomplex, 1, 7kDa	?
<i>POMT2</i>	protein-O-mannosyltransferase 2	j
<i>RIN3</i>	Ras and Rab interactor 3	?
<i>SERPINA13</i>	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade A (alpha-1 antiproteinase, antitrypsin), member 13	?
<i>TCL6</i>	T-cell leukemia/lymphoma 6	?
<i>TGFB3</i>	transforming growth factor, beta 3	j

Tabelle 16b: Chromosom 14: Krankheitsbilder in der Region 77.727.920 – 94.366.617 bp
Von den in der Datenbank gefundenen 31 Krankheitsbildern kamen nur zwei in die engere Auswahl, 29 wurden verworfen. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 21 auf Seite 77.

OMIM-Nummer	Krankheitsbilder	Symbol
276900	Usher syndrome, type 1A	USH1
164210	Hemifacial microsomia	HFM

Tabelle 17: Chromosom 15. Regionen: 68.970.713 – 82.022.003 bp und 92.512.093 – 97.409.971 bp.

219 Gene befinden sich in diesen Regionen; 7 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 22 auf Seite 78.

DNA-Symbol	Name	?
<i>ALDH1A3</i>	aldehyde dehydrogenase 1 family, member A3	j
<i>ARRDC4</i>	arrestin domain containing 4	?
<i>ASB7</i>	ankyrin repeat and SOCS box-containing 7	?
<i>LRRC28</i>	leucine rich repeat containing 28	?
<i>LRRK1</i>	leucine-rich repeat kinase 1	?
<i>MCTP2</i>	multiple C2-domains with two transmembrane regions 2	?
<i>WINS1</i>	WINS1 protein with Drosophila Lines (Lin) homologous domain	?

Für **Chromosom 15** konnten 27 Krankheitsbilder im Bereich des gemeinsamen Haplotypen der erkrankten Individuen gefunden werden. Allerdings konnten diese aus den Intervallen 68.970.713 – 82.022.003 bp und 92.512.093 – 97.409.971 bp gefundenen Krankheitsbilder anhand der Symptome ausgeschlossen werden.

Für die **Chromosomen 16 und 17** konnten keine gemeinsamen Haplotypen bei den erkrankten Individuen gefunden werden. Somit sind diese Chromosomen komplett als Kandidatengenregionen für BOFS ausgeschlossen.

Tabelle 18a: Chromosom 18. Region: 51.522.056 – 75.965.572 bp

117 Gene befinden sich in dieser Region; 18 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 23 auf Seite 79.

Gen-Symbol	Name	?
<i>CDH19</i>	cadherin 19, type 2	?
<i>CNDP1</i>	carnosine dipeptidase 1 (metallopeptidase M20 family)	?
<i>CNDP2</i>	CNDP dipeptidase 2 (metallopeptidase M20 family)	?
<i>CTDPI</i>	CTD (carboxy-terminal domain, RNA polymerase II, polypeptide A) phosphatase, subunit 1	j

Gen-Symbol	Name	?
<i>HAK</i>	heart alpha-kinase	?
<i>KCNG2</i>	potassium voltage-gated channel, subfamily G, member 2	?
<i>PQLC1</i>	PQ loop repeat containing 1	?
<i>RNF152</i>	ring finger protein 152	?
<i>SALL3</i>	sal-like 3 (Drosophila)	j
<i>SERPINB8</i>	serine (or cysteine) proteinase inhibitor, clade B (ovalbumin), member 8	?
<i>SOCS6</i>	suppressor of cytokine signaling 6	?
<i>TXNL1</i>	thioredoxin-like 1	?
<i>TXNL4</i>	thioredoxin-like 4	?
<i>VPS4B</i>	vacuolar protein sorting 4B (yeast)	?
<i>ZADH2</i>	zinc binding alcohol dehydrogenase, domain containing 2	?
<i>ZCCHC2</i>	zinc finger, CCHC domain containing 2	?
<i>ZNF407</i>	zinc finger protein 407	?
<i>ZNF516</i>	zinc finger protein 516	?

Tabelle 18b: Chromosom 18. Krankheitsbilder in der Region 51.522.056 – 75.965.572 bp
 Von den in der Datenbank gefundenen 15 Krankheitsbildern kam nur eins in die engere Auswahl, 14 wurden verworfen. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 23 auf Seite 79.

OMIM-Nummer	Krankheitsbild(er)	Symbol
600624	Cone-Rod Distrophy-1	CORD 1

Tabelle 19: Chromosom 19. Regionen: 3.265.135 – 8.056.405 bp und 58.797.196 – 67.711.695 bp

305 Gene befinden sich in diesen Regionen; 77 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 24 auf Seite 80.

Gen-Symbol	Name	?
<i>BC-2</i>	putative breast adenocarcinoma marker (32kD)	?
<i>CACNG6</i>	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 6	?
<i>CACNG8</i>	calcium channel, voltage-dependent, gamma subunit 8	?
<i>CDC42EP5</i>	CDC42 effector protein (Rho GTPase binding) 5	?
<i>CNOT3</i>	CCR4-NOT transcription complex, subunit 3	?
<i>GALP</i>	galanin-like peptide precursor	?
<i>HKR2</i>	GLI-Kruppel family member HKR2	?
<i>KLPI</i>	K562 cell-derived leucine-zipper-like protein 1	?
<i>LENG1</i>	leukocyte receptor cluster (LRC) member 1	?
<i>PPP1R12C</i>	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 12C	?
<i>PPP2R1A</i>	protein phosphatase 2 (formerly 2A), regulatory subunit A (PR 65), alpha isoform	?
<i>SUV420H2</i>	suppressor of variegation 4-20 homolog 2 (Drosophila)	?
<i>TFPT</i>	TCF3 (E2A) fusion partner (in childhood Leukemia)	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>TMC4</i>	transmembrane channel-like 4	j
<i>U2AF2</i>	U2 (RNU2) small nuclear RNA auxiliary factor 2	?
<i>UBE2M</i>	ubiquitin-conjugating enzyme E2M (UBC12 homolog, yeast)	?
<i>ZEC</i>	zinc finger protein Zec	?
<i>ZFP28</i>	zinc finger protein 28 homolog (mouse)	?
<i>ZNF132</i>	zinc finger protein 132 (clone pHZ-12)	?
<i>ZNF134</i>	zinc finger protein 134 (clone pHZ-15)	?
<i>ZNF135</i>	zinc finger protein 135 (clone pHZ-17)	?
<i>ZNF137</i>	zinc finger protein 137 (clone pHZ-30)	?
<i>ZNF154</i>	zinc finger protein 154 (pHZ-92)	?
<i>ZNF160</i>	zinc finger protein 160	?
<i>ZNF17</i>	zinc finger protein 17 (HPF3, KOX 10)	?
<i>ZNF211</i>	zinc finger protein 211	?
<i>ZNF256</i>	zinc finger protein 256	?
<i>ZNF272</i>	zinc finger protein 272	?
<i>ZNF274</i>	zinc finger protein 274	?
<i>ZNF28</i>	zinc finger protein 28 (KOX 24)	?
<i>ZNF304</i>	zinc finger protein 304	?
<i>ZNF324</i>	zinc finger protein 324	?
<i>ZNF347</i>	zinc finger protein 347	?
<i>ZNF350</i>	zinc finger protein 350	?
<i>ZNF415</i>	zinc finger protein 415	?
<i>ZNF42</i>	zinc finger protein 42 (myeloid-specific retinoic acid-responsive)	?
<i>ZNF444</i>	zinc finger protein 444	?
<i>ZNF471</i>	zinc finger protein 471	?
<i>ZNF494</i>	zinc finger protein 494	?
<i>ZNF495</i>	zinc finger protein 495	?
<i>ZNF497</i>	zinc finger protein 497	?
<i>ZNF499</i>	zinc finger protein 499	?
<i>ZNF524</i>	zinc finger protein 524	?
<i>ZNF528</i>	zinc finger protein 528	?
<i>ZNF530</i>	zinc finger protein 530	?
<i>ZNF534</i>	zinc finger protein 534	?
<i>ZNF542</i>	zinc finger protein 542	?
<i>ZNF543</i>	zinc finger protein 543	?
<i>ZNF544</i>	zinc finger protein 544	?
<i>ZNF547</i>	zinc finger protein 547	?
<i>ZNF548</i>	zinc finger protein 548	?
<i>ZNF549</i>	zinc finger protein 549	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>ZNF550</i>	zinc finger protein 550	?
<i>ZNF551</i>	zinc finger protein 551	?
<i>ZNF552</i>	zinc finger protein 552	?
<i>ZNF577</i>	zinc finger protein 577	?
<i>ZNF578</i>	zinc finger protein 578	?
<i>ZNF579</i>	zinc finger protein 579	?
<i>ZNF580</i>	zinc finger protein 580	?
<i>ZNF581</i>	zinc finger protein 581	?
<i>ZNF582</i>	zinc finger protein 582	?
<i>ZNF583</i>	zinc finger protein 583	?
<i>ZNF584</i>	zinc finger protein 584	?
<i>ZNF586</i>	zinc finger protein 586	?
<i>ZNF587</i>	zinc finger protein 587	?
<i>ZNF600</i>	zinc finger protein 600	?
<i>ZNF606</i>	zinc finger protein 606	?
<i>ZNF610</i>	zinc finger protein 610	?
<i>ZNF611</i>	zinc finger protein 611	?
<i>ZNF613</i>	zinc finger protein 613	?
<i>ZNF614</i>	zinc finger protein 614	?
<i>ZNF615</i>	zinc finger protein 615	?
<i>ZNF616</i>	zinc finger protein 616	?
<i>ZNF71</i>	zinc finger protein 71 (Cos26)	?
<i>ZNF8</i>	zinc finger protein 8 (clone HF.18)	?
<i>ZNF83</i>	zinc finger protein 83 (HPF1)	?
<i>ZSCAN1</i>	zinc finger and SCAN domain containing 1	?

In dieser Tabelle fällt sofort die Häufung von Zinkfinger-Proteinen auf. Diese Gene mussten als fraglich eingestuft werden, da Expression und Funktion der gelisteten Zinkfinger Proteine nur unvollständig bekannt sind. Dafür ist aber bekannt, dass Zinkfinger an wesentlichen Prozessen der DNA-Transkription beteiligt sind, und damit auch indirekt an der Regulation der Genexpression.

Für **Chromosom 19** konnten 51 Krankheitsbilder im Bereich des gemeinsamen Haplotypen der erkrankten Individuen gefunden werden. Allerdings konnten die aus den Intervallen 3.265.135 – 8.056.405 bp und 58.797.196 – 67.711.695 bp gefundene Krankheitsbilder anhand der Symptome ausgeschlossen werden.

Für **Chromosom 20** konnten keine gemeinsamen Haplotypen bei den erkrankten Individuen gefunden werden. Somit ist dieses Chromosom komplett als Kandidatengenregion für das BOFS ausgeschlossen.

Tabelle 20: Chromosom 21. Region: 15.062.513 – 18.989.945 bp

17 Gene finden sich in dieser Region; 9 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 25 auf Seite 81.

Gen-Symbol	Name	?
<i>ATP5J</i>	ATP synthase, H ⁺ transporting, mitochondrial F0 complex, subunit F6	?
<i>BACH1</i>	BTB and CNC homology 1, basic leucine zipper transcription factor 1	?
<i>CYYR1</i>	cysteine and tyrosine-rich 1	?
<i>MRPL39</i>	mitochondrial ribosomal protein L39	?
<i>RBM11</i>	RNA binding motif protein 11	?
<i>SAMSN1</i>	SAM domain, SH3 domain and nuclear localisation signals, 1	?
<i>STCH</i>	stress 70 protein chaperone, microsomal-associated, 60kDa	?
<i>USP16</i>	ubiquitin specific protease 16	?
<i>ZNF294</i>	zinc finger protein 294	?

Für **Chromosom 21** konnten 3 Krankheitsbilder im Bereich des gemeinsamen Haplotypen der erkrankten Individuen gefunden werden. Allerdings konnten die aus dem Intervall 15.062.513 – 18.989.945 bp gefundene Krankheitsbilder anhand der Symptome ausgeschlossen werden.

Tabelle 21: Chromosom 22. Region: 0 – 20.588.089 bp

167 Gene finden sich in dieser Region; 15 davon kamen in die engere Auswahl. Die Daten sind in alphabetischer Reihenfolge der Gene aufgeführt. Das dazugehörige HaploPaint-Diagramm findet sich in Abbildung 26 auf Seite 81.

Gen-Symbol	Name	?
<i>ATP6V1E1</i>	ATPase, H ⁺ transporting, lysosomal 31kDa, V1 subunit E isoform 1	?
<i>CECR1</i>	cat eye syndrome chromosome region, candidate 1	j
<i>CECR5</i>	cat eye syndrome chromosome region, candidate 5	j
<i>CECR6</i>	cat eye syndrome chromosome region, candidate 6	j
<i>CESK1</i>	T-complex protein 1	?
<i>GGTL4</i>	gamma-glutamyltransferase-like 4	?
<i>HIC2</i>	hypermethylated in cancer 2	?
<i>LZTR1</i>	leucine-zipper-like transcriptional regulator 1	?
<i>PEX26</i>	peroxisome biogenesis factor 26	j
<i>RANBP1</i>	RAN binding protein 1	?
<i>RTDR1</i>	rhabdoid tumor deletion region gene 1	?
<i>SCARF2</i>	scavenger receptor class F, member 2	?

Gen-Symbol	Name	?
<i>TBX1</i>	T-box 1	j
<i>TIMP3</i>	tissue inhibitor of metalloproteinase 3 (Sorsby fundus dystrophy, pseudoinflammatory)	j
<i>YPEL1</i>	yippee-like 1 (Drosophila)	j

Für **Chromosom 22** konnten 20 Krankheitsbilder im Bereich des gemeinsamen Haplotypen der erkrankten Individuen gefunden werden. Allerdings konnten die aus den Intervall 0 – 20.588.089 bp gefundene Krankheitsbilder anhand der Symptome ausgeschlossen werden.

Die HaploPaint-Diagramme auf den folgenden Seiten 68 bis 81 zeigen diejenigen Chromosomen, bei denen nach der Markeranalyse eine Co-Segregation von Markerallelen mit dem Krankheitsbild gefunden wurde. Somit kann das Chromosom als Träger eines krankheitsverursachenden Allels eines Gens für das BOFS nicht ausgeschlossen werden.

Die Darstellung der Stammbäume wurde so gewählt, dass links außen die untersuchten Marker gezeigt werden. Rechts davon ist deren Position in Mbp, gemessen vom Telomer des kurzen Arms. Danach folgen die Allele der Marker bei den Individuen.

Die Positionen der Marker stimmen nur vage mit den Daten aus NCBI Mapview release 35.1 überein, so dass z.T. Abweichungen von über 1 Mbp möglich sind. Dies liegt an den unterschiedlichen Quellen für die Darstellungen. Die absoluten Positionen aller Marker und gemeinsamer Haplotypen, wie sie jeweils in den Legenden der Abbildungen beschrieben sind, stammen aus der NCBI-Datenbank, während die relativen Angaben in den Abbildungen selbst aus einer öffentlich zugänglichen Steuerdatei für den ABI-Genotyper® stammen, so dass leichte Diskrepanzen entstehen können. Diese Diskrepanzen sind auch durch die kontinuierliche Genforschungsaktivität und entsprechende Sequenzierung von bisher unbekanntem Regionen (Lücken) des menschlichen Genoms erklärt, so dass sich die Daten in der NCBI-Datenbank sehr schnell ändern.

Die eckigen Klammern neben den Allelen zeigen das Intervall, welches den gemeinsamen Haplotyp definiert.

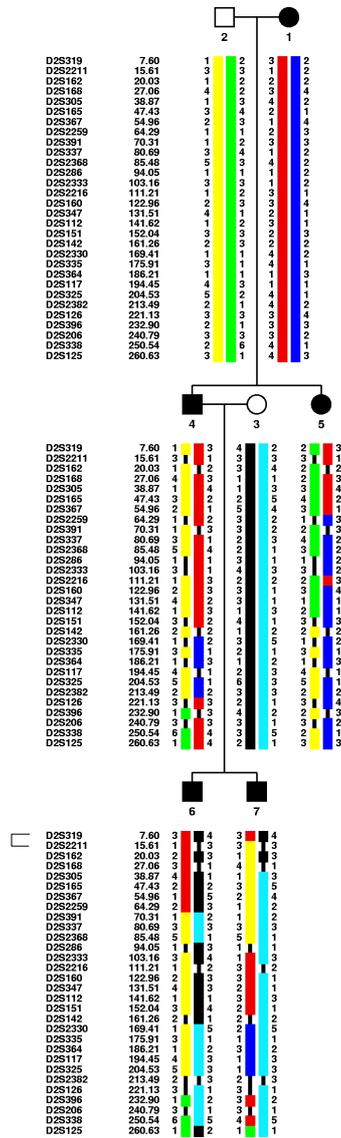


Abbildung 12: Chromosom 2

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 0 – 7.389.274 bp. 44 Gene finden sich in dieser Region. Davon ist eine Auswahl der für das BOFS verdächtigen Gene in Tabelle 7 ab Seite 45 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

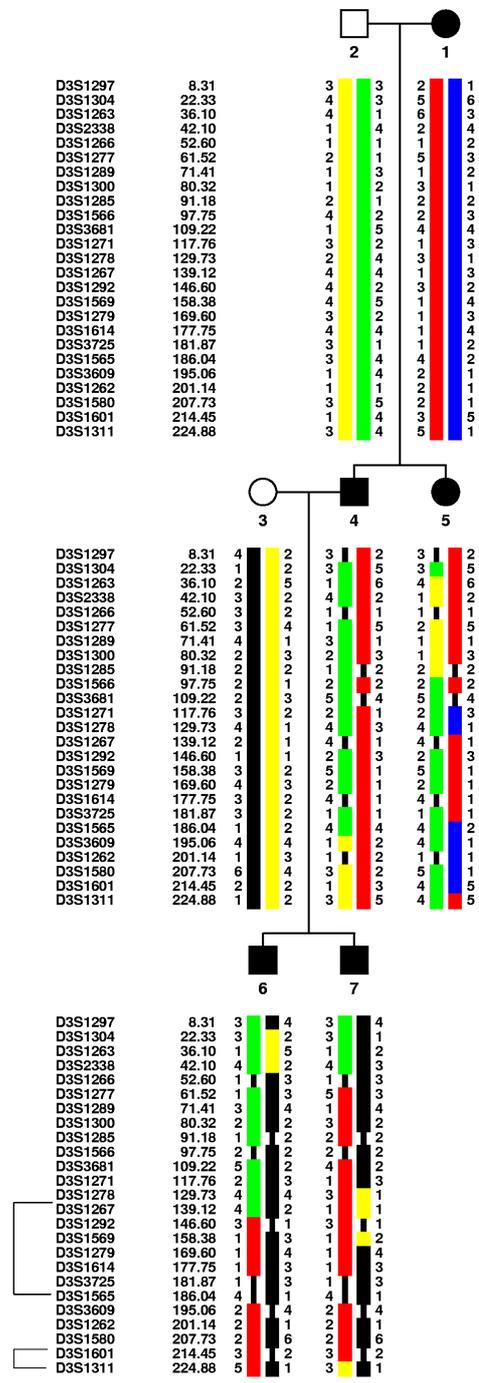


Abbildung 13: Chromosom 3

Gemeinsamer Haplotyp der Regionen: 124.525.825 – 174.965.717 bp und 193.159.931 – 198.502.745 bp. 442 Gene finden sich in diesen Regionen. Gene und OMIM-Krankheitsbilder sind in den Tabellen 8 a/b ab Seite 46 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

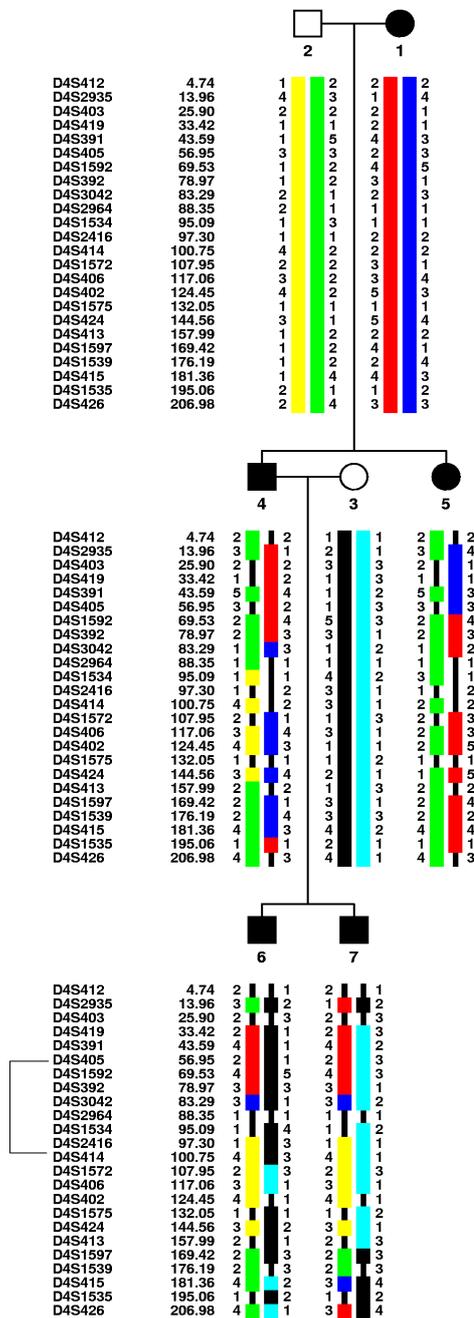


Abbildung 14: Chromosom 4

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 40.047.136 – 122.344.093 bp. 528 Gene finden sich in dieser Region. Gene und OMIM-Krankheitsbilder sind in den Tabellen 9 a/b auf Seite 48 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

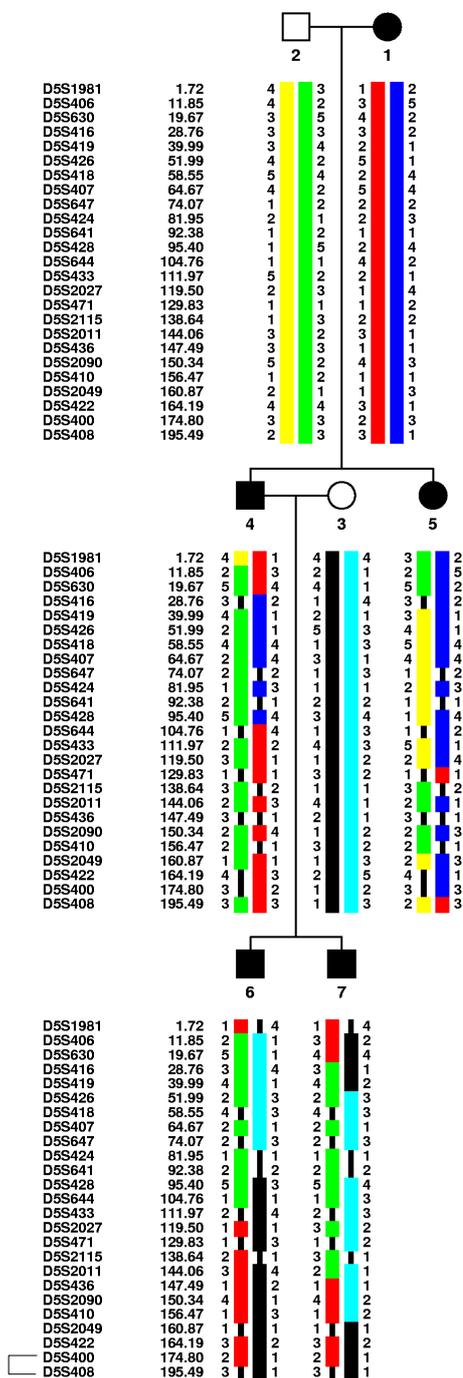


Abbildung 15: Chromosom 5

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 168.375.302 – 179.921.252 bp. 161 Gene finden sich in dieser Region. Gene und OMIM-Krankheitsbilder sind in den Tabellen 10 a/b ab Seite 49 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

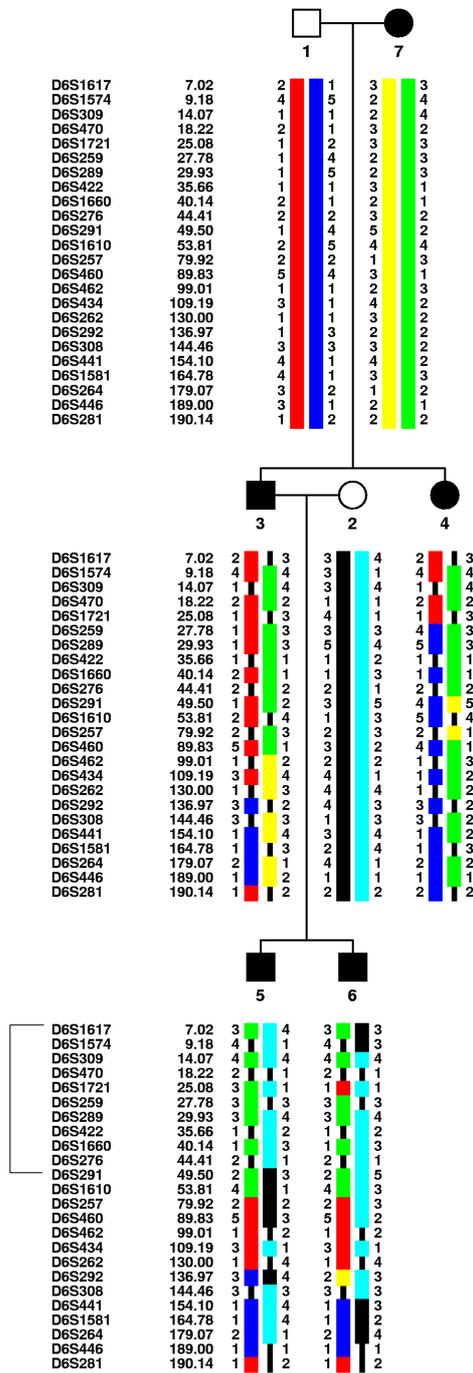


Abbildung 16: Chromosom 6

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 0 – 36.373.842 bp. 612 Gene finden sich in dieser Region. Gene und OMIM-Krankheitsbilder sind in den Tabellen 11 a/b ab Seite 50 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

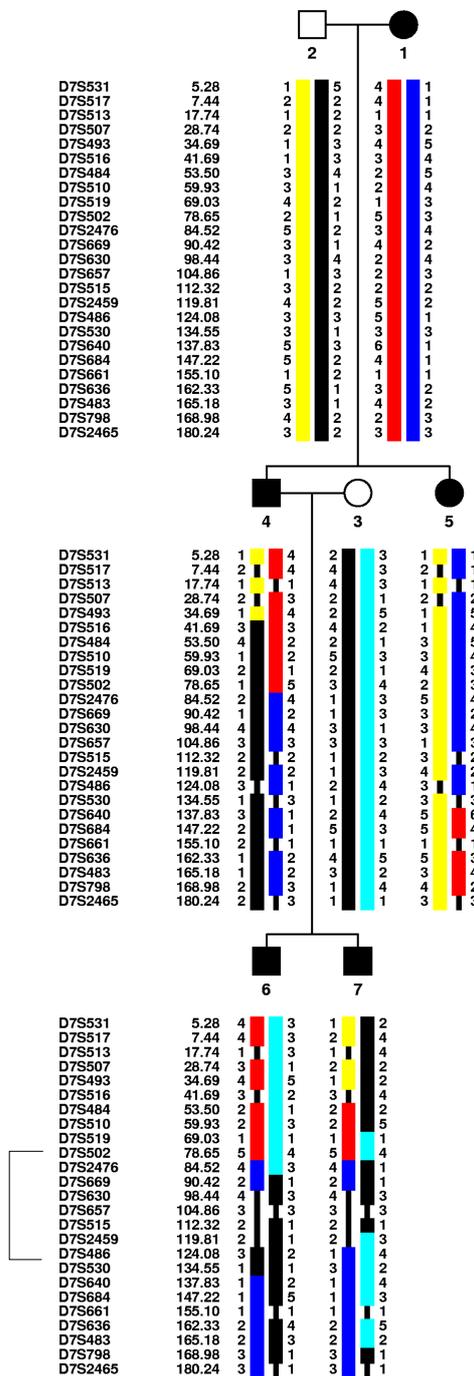


Abbildung 17: Chromosom 7

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 66.694.958 – 115.682.245 bp. 404 Gene finden sich in dieser Region. Davon ist eine Auswahl der für das BOFS verdächtigen Gene in Tabelle 12 ab Seite 53 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

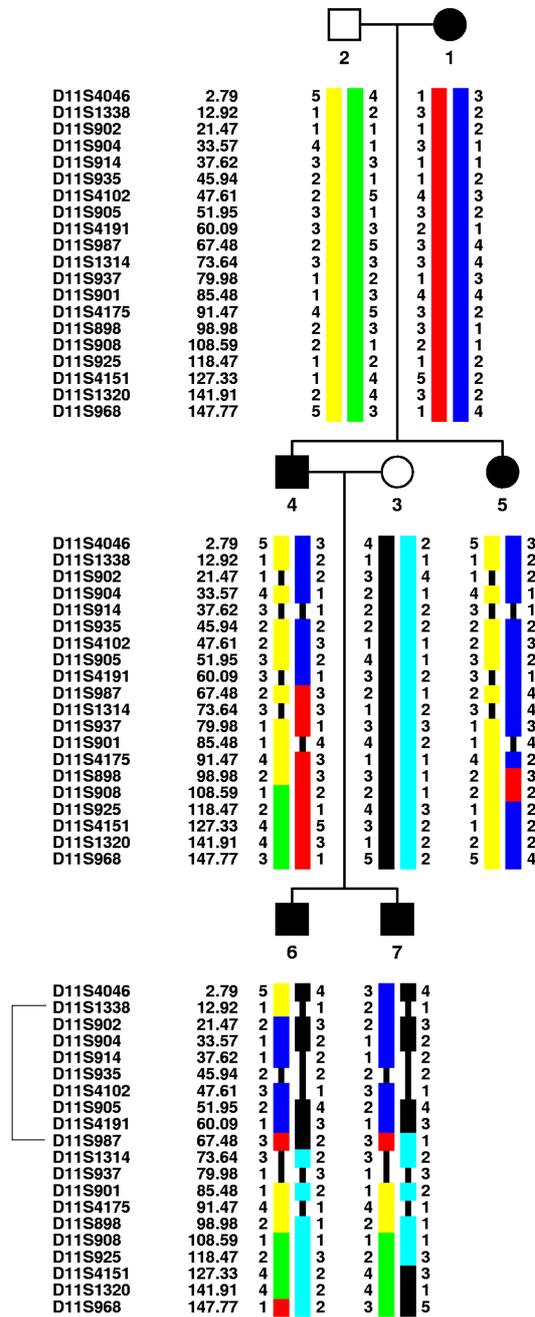


Abbildung 18: Chromosom 11

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 5.944.360 – 67.650.107 bp. 948 Gene finden sich in dieser Region. Gene und OMIM-Krankheitsbilder sind in den Tabellen 13 a/b ab Seite 56 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

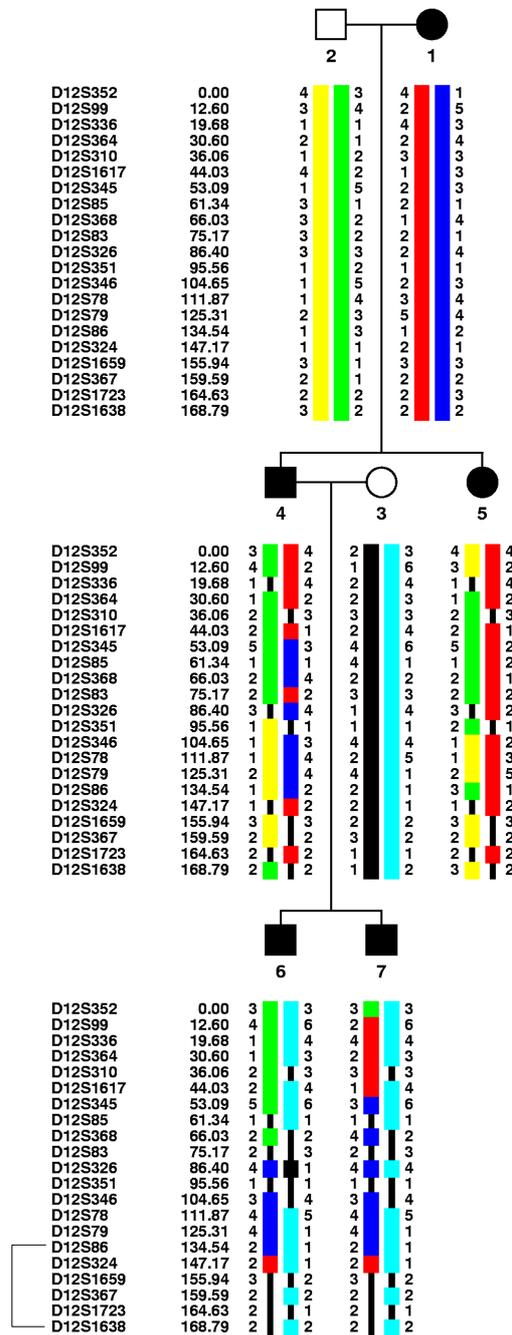


Abbildung 19: Chromosom 12

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 117.654.605 – 131.829.011 bp. 154 Gene finden sich in dieser Region. Davon ist eine Auswahl der für das BOFS verdächtigen Gene in Tabelle 14 ab Seite 59 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

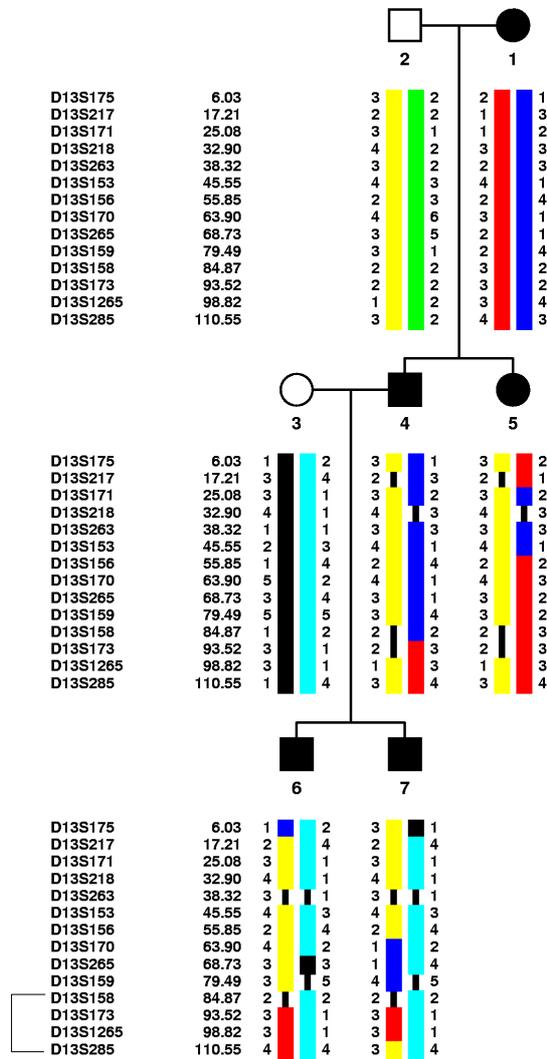


Abbildung 20: Chromosom 13

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 102.774.320 – 111.843.600 bp. 31 Gene finden sich in dieser Region. Davon ist eine Auswahl der für das BOFS verdächtigen Gene in Tabelle 15 auf Seite 61 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

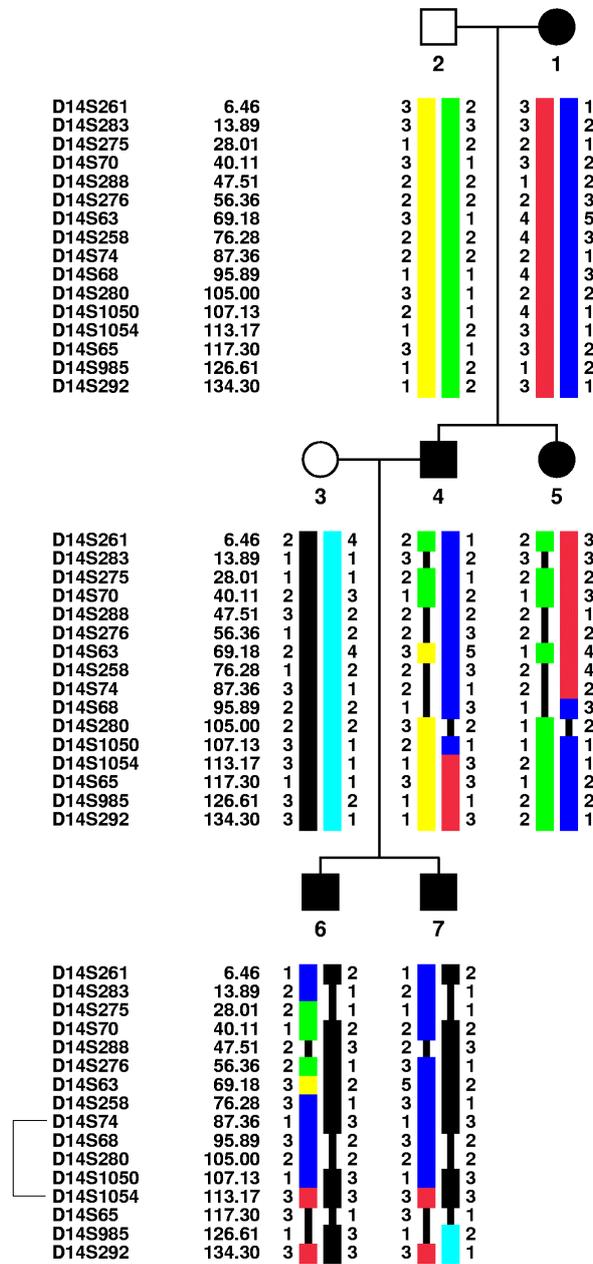


Abbildung 21: Chromosom 14

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 77.727.920 – 94.366.617 bp. 111 Gene finden sich in dieser Region. Gene und OMIM-Krankheitsbilder sind in den Tabellen 16 a/b ab Seite 61 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

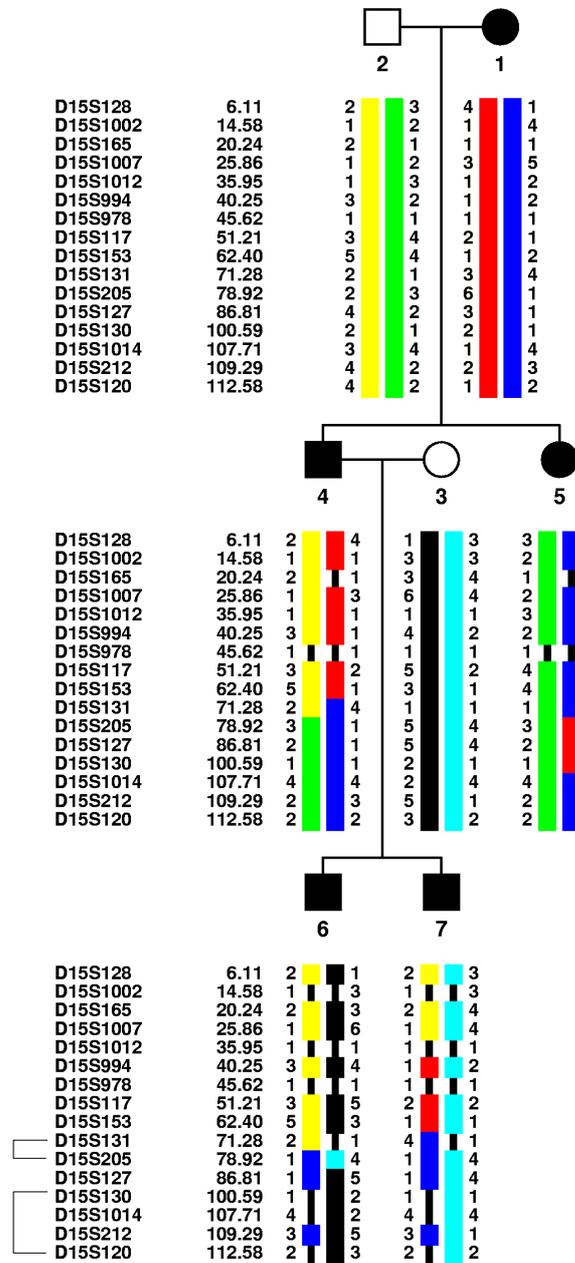


Abbildung 22: Chromosom 15

Gemeinsamer Haplotyp der Regionen: 68.970.713 – 82.022.003 bp und 92.512.093 – 97.409.971 bp. 219 Gene finden sich in diesen Regionen. Davon ist eine Auswahl der für das BOFS verdächtigen Gene in Tabelle 17 auf Seite 62 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

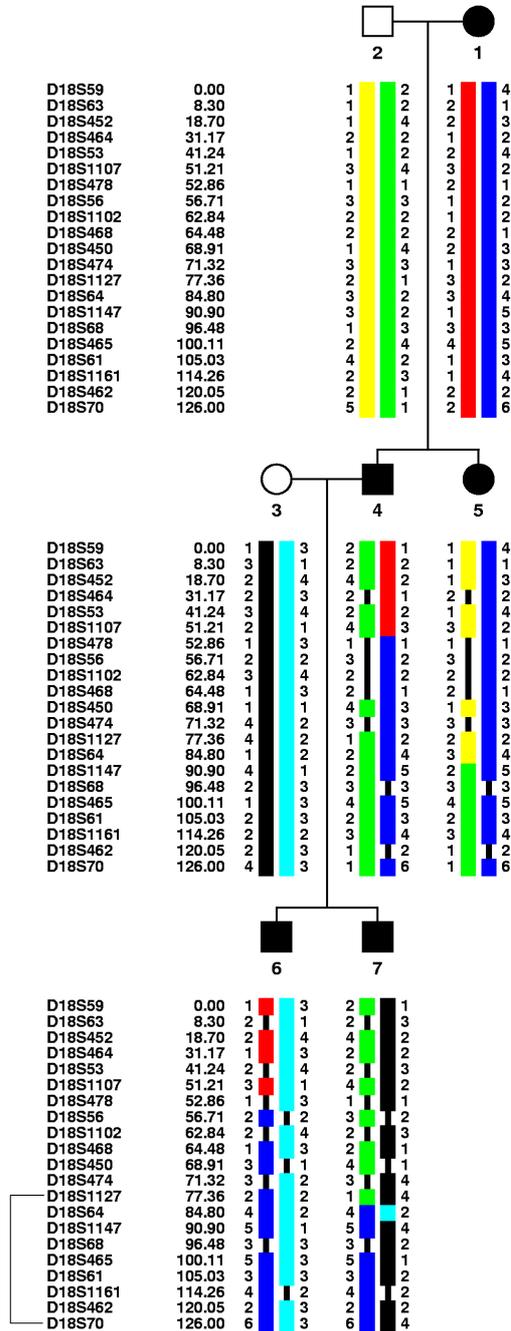


Abbildung 23: Chromosom 18
 Gemeinsamer Haplotyp der Region: 51.522.056 – 75.965.572 bp. 117 Gene finden sich in dieser Region. Gene und OMIM-Krankheitsbilder sind in den Tabellen 18 a/b ab Seite 62 aufgelistet.
 HaploPaint-Diagramm
 (Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

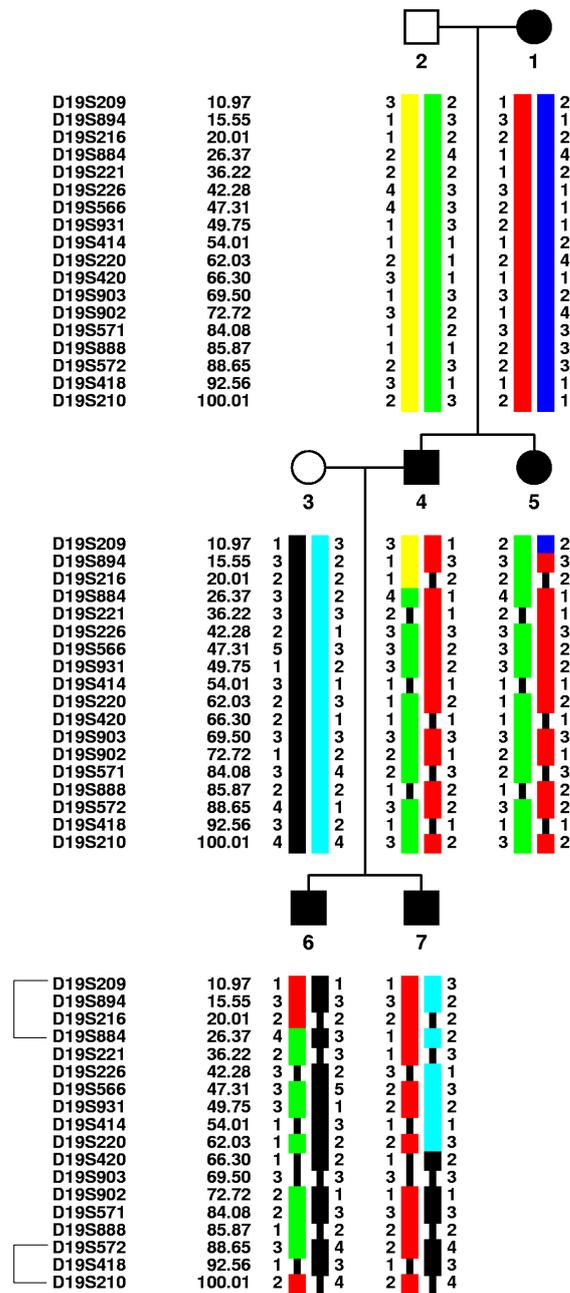


Abbildung 24: Chromosom 19

Gemeinsamer Haplotyp der Regionen: 3.265.135 – 8.056.405 bp und 58.797.196 – 67.711.695 bp. 305 Gene finden sich in diesen Regionen. Davon ist eine Auswahl der für das BOFS verdächtigen Gene in Tabelle 19 ab Seite 63 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

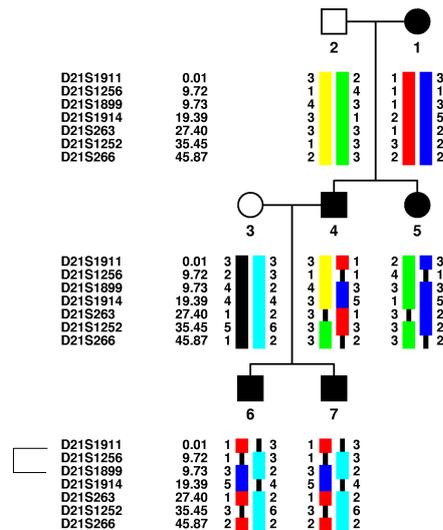


Abbildung 25: Chromosom 21

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 15.062.513 – 18.989.945 bp. 17 Gene finden sich in dieser Region. Davon ist eine Auswahl der für das BOFS verdächtigen Gene in Tabelle 20 auf Seite 66 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

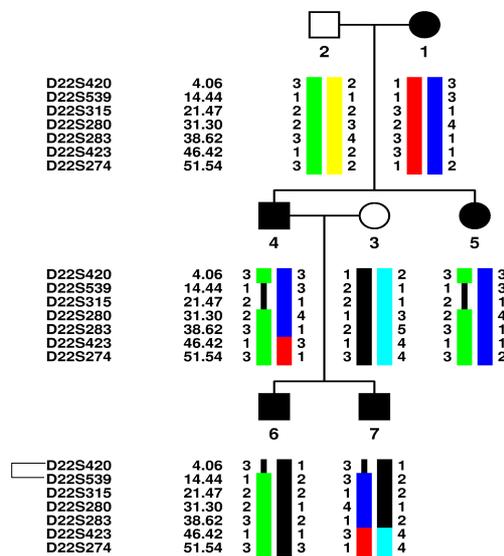


Abbildung 26: Chromosom 22

Gemeinsamer Haplotyp der Region: 0 – 20.588.089 bp. 167 Gene finden sich in dieser Region. Davon ist eine Auswahl der für das BOFS verdächtigen Gene in Tabelle 21 ab Seite 66 aufgelistet.

HaploPaint-Diagramm

(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

Die nachfolgenden HaploPaint-Diagramme zeigen diejenigen Chromosomen, bei denen nach der Markeranalyse eine Co-Segregation aller Markerallele mit dem Krankheitsbild ausgeschlossen werden konnte. Somit kann das komplette Chromosom als Träger eines krankheitsverursachenden Allels eines Gens des BOFS ausgeschlossen werden.

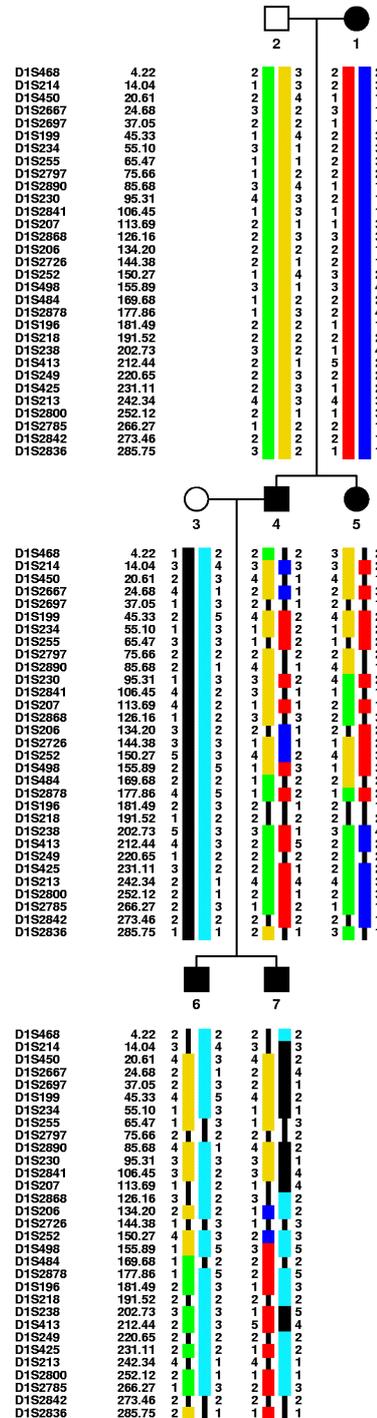


Abbildung 27: Chromosom 1 (HaploPaint-Diagramm)
(Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

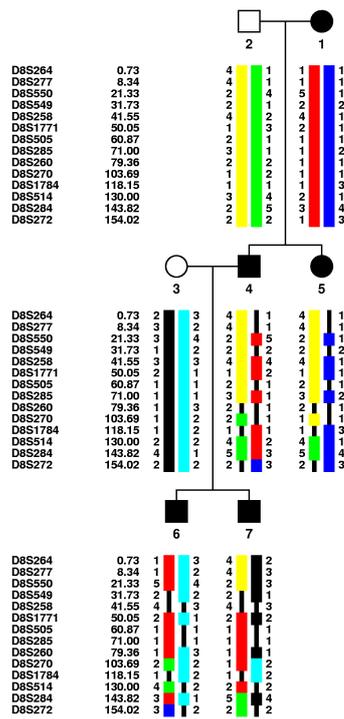


Abbildung 28: Chromosom 8 (HaploPaint-Diagramm); (Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

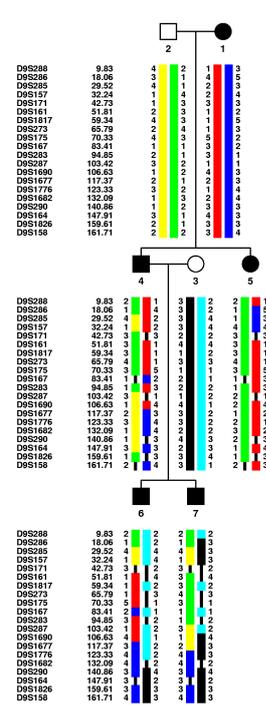


Abbildung 29: Chromosom 9 (HaploPaint-Diagramm); (Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

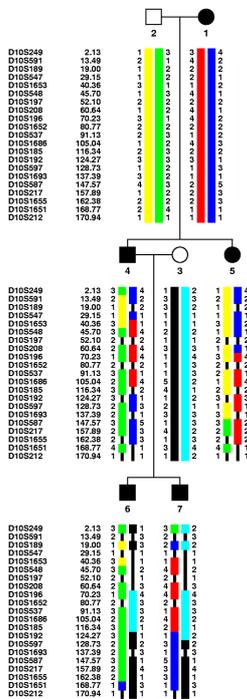


Abbildung 30: Chromosom 10 (HaploPaint-Diagramm); (Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

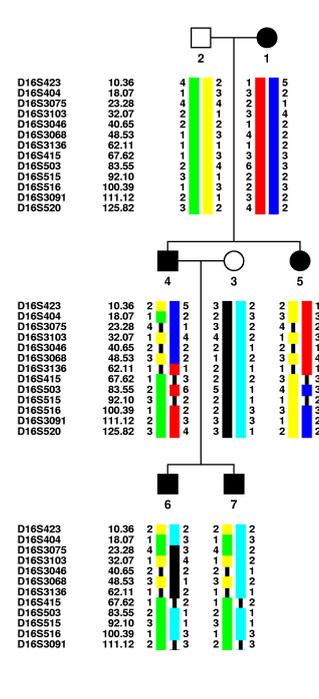


Abbildung 31: Chromosom 16 (HaploPaint-Diagramm); (Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

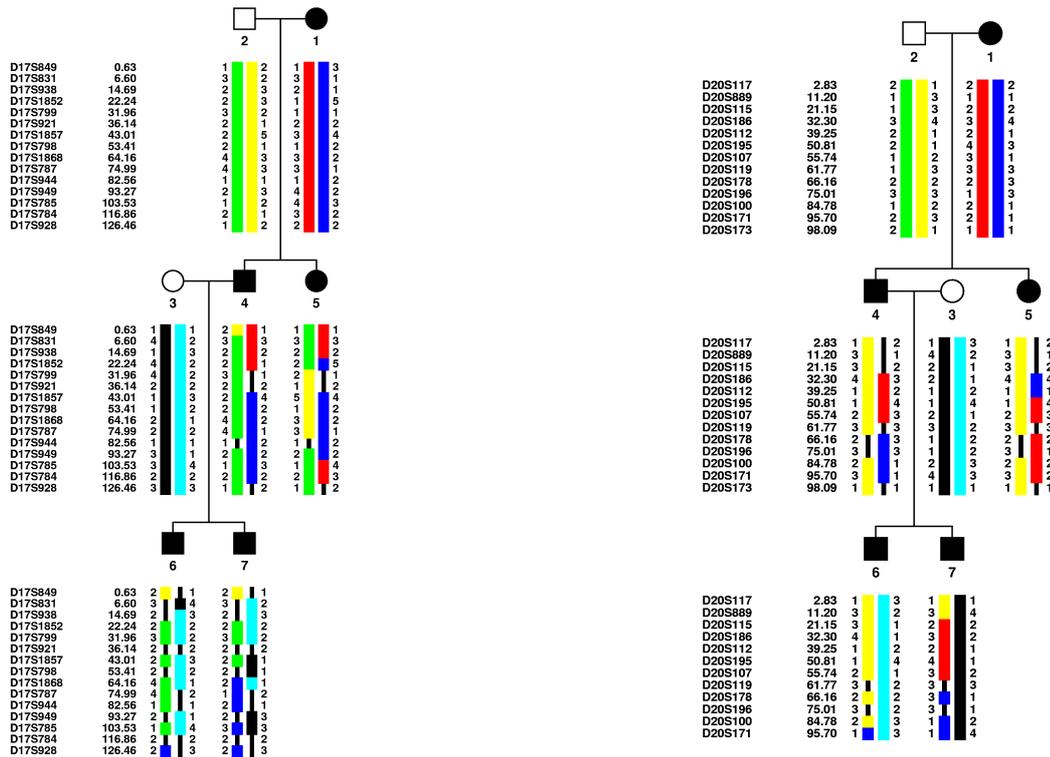


Abbildung 32: Chromosom 17 (HaploPaint-Diagramm); **Abbildung 33:** Chromosom 20 (HaploPaint-Diagramm); (Stammbaum-Symbole, siehe Legende Abb.4)

Insgesamt wurden in dieser Arbeit ca. 363 Mbp (genau 362.872.373 bp) des menschlichen Genoms als Kandidatenregion erhalten und anhand des Inhalts von Datenbanken untersucht. Die dadurch gewonnene Liste von Genen und Krankheitsbildern, die eine Verbindung mit dem BOFS haben könnten, ist nun deutlich reduziert auf „nur“ noch 651 Gene und 11 Krankheitsbildern was einen wichtigen Schritt bei der Suche nach der Pathogenese des BOF-Syndroms darstellt. Solche Informationen können bei weiteren BOFS-Analysen hilfreich sein. Diese könnten vielleicht eine engere Begrenzung dieser Regionen, bzw. den Ausschluss mehrerer Regionen und/oder Gene als Ursachenkandidaten für das BOFS nach sich ziehen. Voraussetzung dafür ist allerdings die Verfügbarkeit weiterer Familien mit BOFS-Betroffenen, um weitere Segregationsanalysen durchführen zu können.

4. DISKUSSION

Derzeit sind ca. 2.000 genetisch bedingte Erkrankungen mit bekannter genetischer Ursache in der OMIM-Datenbank (Stand: 31.7.2006) veröffentlicht. Bei weiteren ca. 4.000 Phänotypen ist der genetische Defekt noch unbekannt, bzw. wird der Mendel'sche Erbgang nur vermutet. Dem stehen aus der Ensembl-Datenbank 21.561 Gene gegenüber, welche jedoch RNA-Gene oder Pseudogene nicht einschließen (Stand: März 2006). Viele menschliche Erkrankungen, die auffällige morphologische Anomalien zeigen, sind durch Störungen in der Differenzierung und der Morphogenese verursacht. Das Branchio-Oculo-Facial-Syndrom (BOFS), welches Untersuchungsgegenstand der vorliegenden Arbeit war, gehört zu den sehr seltenen, autosomal dominant vererbten Krankheitsbildern. Aufgrund der Seltenheit ist die genetische Ursache dieses Syndroms bislang noch nicht aufgeklärt worden. Wie bereits in der Einleitung erwähnt wurde, wird nach Betrachtung der typischen BOFS-Symptome vermutet, dass Fehlbildungen der Branchialbögenderivate dieses Syndrom verursachen. Diese Art von Fehlbildungen ist eindeutig auf Entwicklungsstörungen während der Embryonalentwicklung zurückzuführen. Deshalb kommen Mutationen in Genen aus denjenigen Netzwerken als Ursache des BOFS in Frage, deren Faktoren bei der Entwicklung des Kopf-/Hals-Bereiches eine Rolle spielen. Einige der somit als Kandidatengene betrachteten Gene wurden bereits in anderen Untersuchungen analysiert, beziehungsweise sequenziert und konnten ausgeschlossen werden. Dies geschah einerseits über einen *Candidate gene approach*, d.h. man ging davon aus, dass das BOFS in einer bestimmten chromosomalen Region lokalisiert sei und gründete diese Annahme auf einer Ähnlichkeit des Krankheitsbildes mit den chromosomal lokalisierten BOR- oder BO-Syndromen. Durch Untersuchungen an Genen, die aus den BORS/BOS-Untersuchungen nominiert worden waren und deren Funktion eine Beteiligung an der BOFS-Genese vermuten lassen, sollten diese bestätigt oder ausgeschlossen werden. Andererseits erfolgten die meisten Untersuchungen zum BOFS über ein sogenanntes *Positional cloning*, das über Co-Segregations-/Kopplungsanalysen eine möglichst kleine Region definierte, in der das krankheitsverursachende Gen lokalisiert ist.

Auf der Suche nach den genetischen Ursachen bekannter vererbter Krankheitsbilder sind die Sequenzierung von vorher ausgewählten Kandidatengenen oder die Analyse ihrer Allelseggregation die am häufigsten verwendeten Techniken. In der vorliegenden Arbeit

wurde die Grundlage für ein *Positional cloning* durch genomweite Segregationsanalysen geschaffen. Es handelt sich dabei um eine Untersuchung aller Chromosomen, ohne ein Kandidatengen als Anfangspunkt zu haben. Durch diese Vorgehensweise vermeidet man durch strenge Vorauswahl eine „blinde“ Sequenzierung auf der Suche nach verantwortlichen Genen. Diese Methode dient sozusagen als Filter auf dem Weg zur Entdeckung der genetischen Ursache des BOFS und bringt dieses Ziel durch Einschränkung der Kandidatengenmenge näher. Die Methode der Segregationsanalyse wurde gewählt, da eine aussagekräftige Kopplungsanalyse bei der geringen Anzahl informativer Meiosen nicht möglich gewesen wäre. Da das BOFS eine autosomal vererbte Krankheit ist, sind in diesem Fall die Geschlechtschromosomen von vornherein ausgeschlossen. Für diese Untersuchung braucht man wenigstens eine Familie mit mehreren BOFS-Fällen oder ein erkranktes Elternteil und ein gesundes Elternteil mit betroffenem Kind und gesundem Geschwister. Die größte bekannte BOFS-Familie über drei Generationen wurde in Deutschland entdeckt, und DNA dieser Familie stand für diese Arbeit zur Verfügung. Da die DNA dieser Familie eine kostbare Rarität darstellt, wurde der Verbrauch an ursprünglich zur Verfügung stehendem Material minimiert, indem wenige Nanogramm der Nukleinsäure linear über GenomiPhi ohne Qualitätsverluste (z.B. Allelverlust) amplifiziert wurden. Für die Segregationsanalyse wurden primär 382 Marker mit einem durchschnittlichen Abstand von ca. 10 cM über PCR der DNA jedes Familienmitgliedes untersucht. Bei nicht-informativer Datenlage wurden zusätzliche Marker verwendet, die entweder aus dem kommerziellen Panel mit 5 cM Abstand der Firma AppliedBiosystems stammten, oder über eigene Recherchen definiert wurden. Die PCR-Produkte und damit die Allele der Marker wurden durch eine fluoreszenzbasierte automatisierte Fragmentanalyse untersucht. Die Übertragung der Allele in einen schematischen Stammbaum erfolgte über die Software Cyrillic. Die maximale Wahrscheinlichkeit von Rekombination innerhalb der Haplotypen wurde mit SimWalk berechnet und die grafische Darstellung erfolgte mit HaploPaint.

Haplotypen, welchen allen Erkrankten gemeinsam waren und bei Gesunden nicht beobachtet wurden, wurden als potenzielle Regionen für das BOFS-Kandidatengen definiert. Umgekehrt konnten Regionen, die nicht allen Betroffenen gemeinsam waren, als Kandidatenregion ausgeschlossen werden. Anschließend wurde der Inhalt verschiedener Datenbanken von Genen und genetisch bedingten Krankheiten mit den Intervallen aus den Ergebnissen verglichen, um Hinweise auf ähnliche Krankheiten oder eventuelle Kandidatengene zu erhalten.

Mit der vorliegenden Untersuchung gelang es, die Chromosomen 1, 8, 9, 10, 16, 17, 20 (und die Geschlechtschromosomen X und Y) als Träger eines BOFS verursachenden Gens auszuschließen. Von den verbleibenden Chromosomen wurden zum Teil nur kleine Intervalle des gemeinsamen Haplotyps gefunden, mitunter aber auch relativ große Chromosomenregionen. Durch einfache Addition entsteht ein Gesamtbereich von 362.872.373 bp, so dass sich bei einer haploiden Genomgröße von 3,27 Gbp der gemeinsame Haplotyp nur noch über 11% des Genoms erstreckt. Dieser Ausschluss geht weit über die bisherigen Ergebnisse aus Untersuchungen zur genetischen Ursache des BOFS hinaus, welche ausschließlich wegen Gemeinsamkeit von genetisch heterogenen Syndromen wie Townes-Brocks-Syndrom (TBS), Branchio-Otic-Syndrom (BOS), Branchio-Oto-Renal-Syndrom (BORS) und BOFS durchgeführt worden waren.

4.1 Verwandte Krankheitsbilder

4.1.1 Branchio-Oto-Renal-Syndrom (BOR-Syndrom; BORS)

Eines der dem Branchio-Oculo-Facial-Syndrom ähnlichen Syndrome ist das BOR-Syndrom (Melnick-Fraser-Syndrom; MIM 113650). Die Betroffenen dieser autosomal dominant vererbten Krankheit zeigen Symptome, die auf Entwicklungsstörungen zurückgehen. Diese bestehen aus Kombinationen von Branchialfisteln, Sinus, Zysten, präaurikulären Grübchen (*preauricular pits*), Gehörlosigkeit (sensorineural oder Schallleitungsdefekt) und Nierenanomalien. Obwohl dieser Phänotyp extrem variabel ist, tritt er immer in Verbindung mit Gehörlosigkeit auf. Ursache des Branchio-Oto-Renal-Syndroms sind *EYAI*-Mutationen auf Chromosom 8q13.3 (123). Dieser Locus (20) und das gesamte Chromosom 8 wurden in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen, so dass die bisher geführte Diskussion über einen gemeinsamen genetischen Ursprung von BOFS und BORS endgültig hinfällig ist.

4.1.2 Branchio-Otic-Syndrom (BO-Syndrom; BOS)

Das Branchio-Otic-Syndrom ist genetisch heterogen, wobei 3 Loci bekannt sind: BO-Syndrom 1-3 (BOS1-3, MIM 602588, 120502, 608389). Die verursachenden respektiven Gene sitzen auf den Chromosomen 8q13.3, 1q31 und 14q21.2-q24.3. Dieses Krankheitsbild ist mit dem BOR-Syndrom auf Chromosom 8q13.3 allelisch und unterscheidet sich von ihm

nur durch die Abwesenheit von Nierenanomalien. Die BOS-Loci auf Chromosom 1 (51) und 8 wurden in dieser Arbeit als Loci für das BOFS ausgeschlossen. Lediglich auf Chromosom 14 wurde ein gemeinsamer Haplotyp für alle BOFS-Individuen aus der untersuchten Familie gefunden. Dieser erstreckt sich über einen Bereich von ca. 16 Mbp von Marker D14S74 in 14q24.1 bis Marker D14S1054 in 14q31. Damit ist eine Teilüberlappung mit dem BO-Syndrom Typ 3 möglich. Das dort lokalisierte BOS3-Kandidatengen *SIX1* wurde allerdings in einer vorangegangenen Arbeit durch Sequenzierung der kompletten kodierenden Sequenz als Kandidatengen für das BOFS ausgeschlossen (53), was aber nicht zwingend flankierende Gene aus genau dieser Region ebenfalls ausschließt.

4.1.3 Townes-Brocks-Syndrom (TB-Syndrom; TBS)

Das Townes-Brocks-Syndrom (TBS, MIM 107480) wurde 1972 entdeckt. Zytogenetische Untersuchungen an TBS-Patienten ergaben anhand der Lokalisation einen indirekten Hinweis auf das Gen *SALL1* in der Region 16q12.1, welches nachfolgend durch Mutationsuche als Ursache des TBS bestätigt wurde (57). Das TBS besteht aus einer Reihe autosomal dominant vererbter angeborener Fehlbildungen. Charakteristisch sind Außenohranomalien in Form kleiner Ohren mit oder ohne gefalteter oberer Helix und kleiner Anti-Helix, sowie gelegentlich beobachteten präaurikulären Grübchen. Die Patienten sind oft von Gehörlosigkeit betroffen (sensorineural, als Schalleitungsdefekt, oder beides). Unter den Anomalien des Urogenitalsystems kommen Nierenmalformationen in Form von hypoplastischen, dysplastischen, aplastischen oder multizystischen Nieren vor. Weitere urogenitale Beschwerden sind vesikoureteraler Reflux und Meatusstenosen. Außerdem treten Analstenosen auf, die häufigste Analanomalie ist jedoch die Analtresie (*Anus imperforatus*). Weiterhin sind rektovaginale oder rektouretrale Fisteln beschrieben worden. An den Händen sind oft präaxiale Polydactylien zu sehen, seltener auch an den Füßen. Bei einem TBS-Patient wurde ein bilaterales Kolobom beschrieben (97), wobei nach dem derzeitigen Stand der Literatur wohl kein direkter Zusammenhang zwischen Augenanomalien und dem TBS besteht.

Aufgrund von Segregationsstudien wurde *SALL1* als Kandidat des BOFS ausgeschlossen (51). In der vorliegenden Arbeit wurde sogar das komplette Chromosom 16 ausgeschlossen.

4.2 Kriterien zur Eingrenzung der Ergebnisse aus der Segregationsanalyse

4.2.1 Auswahl der Gene

Anhand der Ergebnisse ist ersichtlich, dass sich die Summe aller durch einen gemeinsamen Haplotyp definierten Intervalle über ca. 363 Mbp erstreckt. In diesen Abschnitten gemeinsamer Marker-Allele bei allen erkrankten BOFS-Betroffenen finden sich in den genetischen Datenbanken exakt 3.856 Gene (Stand: NCBI mapview Genome Build 35.1) und 289 Krankheitsbilder (Stand: OMIM vom: Dezember 2006). Durch Vergleich mit Daten aus Literaturangaben sowie anderen Charakteristika dieser Gene konnte die Anzahl der tatsächlich in Frage kommenden Gene auf 651 reduziert werden, womit ca. 83% der Gene aus den Bereichen gemeinsamer Haplotypen ausgeschlossen werden konnten.

Selbstverständlich können nicht alle gefundenen 3.856 Gene auch Kandidatengene für das BOFS sein. Viele der aus dem GeneRetriever erhaltenen Gene waren als Pseudogene definiert. Diese konnten direkt ausgeschlossen werden, da sie aus nicht-funktionellen DNA-Sequenzen bestehen und deshalb keine BOFS auslösende Mutation tragen können. Die Bestätigung ihres Zustandes als Pseudogen oder die Suche nach Informationen darüber erfolgte *online* in Gen- und Literaturdatenbanken. Durch eine grobe Vorauswahl konnten ferner die Gene ausgeschlossen werden, von denen bekannt war, dass sie verantwortlich für nicht-verwandte monogene Erbkrankheiten sind. Die weitere Reduktion der Datenmenge erfolgte vor allem anhand des räumlichen und zeitlichen Expressionsprofils der Gene, des Proteintyps und Daten aus Mausmodellen.

Der BOF-Syndrom-Phänotyp manifestiert sich in mehreren Organsystemen. Deshalb konnten die Gene, die in diesen Organen oder ihren ursprünglichen Embryonalanlagen niemals Expression zeigen, als Kandidatengen direkt ausgeschlossen werden. Andererseits wurden Entwicklungsgene, die bei der Bildung von Nieren, Augen, Ohr und anderen Gesicht-Hals-Regionen eine Rolle spielen, von vornherein verdächtig; wie zum Beispiel viele Mitglieder der schon in der Einleitung näher beschriebenen Entwicklungsgene aus den *EYA*-, *SIX*-, *PAX*-, *FOX*-, *HOX*-, *FGF*- und *POU*-Familien. In der Literatur sind Interaktionen zwischen Genen dieser Familien oft als nötig für die Kontrolle einer normalen Entwicklung beschrieben worden. Eines der in der Einleitung aufgeführten Beispiele ist die synergistische Wirkung des *Pax-Six-Eya-Dach*-Netzwerkes, das bei Wirbeltieren die Muskelentwicklung und bei Drosophila die Augenentwicklung reguliert. Somit ist die Funktion eines Gens durch seine Beziehung mit anderen Genen im Kontext von Netzwerken und Genkas-

kaden bestimmt. Die Genwege von allen in den eingegrenzten Regionen kartierten Genen waren deshalb bei der Suche nach der genetischen Ursache des BOFS sehr wichtig. Beispielsweise konnte das auf Chromosom 13 kartierte *DACHI* ausgeschlossen werden, da es außerhalb des gemeinsamen Haplotyps liegt. *PAX3* auf Chromosom 2 konnte ebenfalls ausgeschlossen werden, *PAX6* auf Chromosom 11 liegt jedoch in dem Intervall der gemeinsamen Haplotypen und wurde daher als potenzielles Kandidatengen betrachtet. Die Entwicklung von Organen erfolgt durch das Zusammenspiel bestimmter Gene in Netzwerken, welche während der Evolution mehr oder weniger konserviert sind. Über 39.000 Netzwerke und Kaskaden finden sich in der mit *Genecards* verknüpften Datenbank *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (Kegg)*. Dort wurde in den vorhandenen Datensätzen nach potenzieller Interaktion von beliebigen Genen aus den Ergebnistabellen der Segregationsanalyse mit Genen des *Pax-Six-Eya-Dach*-Netzwerkes gesucht und damit ein weiterer Filter zur Datenreduktion angewandt. Auch Ergebnisse aus Tiermodellen wurden berücksichtigt. Wenn aus *Genecards* ersichtlich war, dass im Knockout-Maus-Experiment durch das mutierte Gen ein veränderter Phänotyp verursacht wurde, wurde der entsprechende Datensatz in der Datenbank MGI (*Mouse Genome Informatics*) am Jackson Laboratory aufgerufen und in die Bewertung eines Kandidatengens einbezogen.

Eine sehr wichtige Information war das Expressionsprofil der Gene. Haushaltsgene, die stets ubiquitär in allen Zelltypen und Organen exprimiert werden, sind so essentiell, dass Mutationen in ihnen nicht nur während der Entwicklungsphase eines Organismus, sondern lebenslang beeinträchtigend sein müssten – falls diese überhaupt mit dem Leben vereinbar sind. Hier waren vor allem die Daten aus den mit der *Genecards*-Datenbank verlinkten Datenbanken wie SAGE, UniGene, CGAP und GeneNote ein wertvolles Auswahlkriterium. Neben Literaturangaben war die Höhe der normalisierten Expressionsintensität in verschiedenen Geweben für die Entscheidung ausschlaggebend, ob das Gen in die engere Auswahl gelangen oder gleich verworfen werden konnte.

Für die Pathogenese des BOFS müssen bei der Auswahl potenzieller Kandidatengene noch weitere Aspekte berücksichtigt werden, da sich das Syndrom phänotypisch in multiplen Organsystemen manifestiert. Die Symptome des BOFS äußern sich vor allem im cranio-facialen und im Halsbereich sowie bei der Nierenentwicklung. Gehörlosigkeit, Fisteln als Relikte der Branchialbogenentwicklung und Augenanomalien sind alles typische Entwicklungsdefekte. Die Auswirkung auf multiple Organsysteme kann durch Störungen innerhalb einer Genkaskade, aber auch durch eine sogenannte *contiguous gene deletion* verursacht sein (79), bei der durch eine interstitielle Deletion eines Chromosomenabschnitts mehrere

Gene verloren gehen, wie dies z.B. beim WAGR-Syndrom (Wilms Tumor; Aniridia; Genitourinary Anomalies; Mental Retardation) der Fall ist. In besonderem Maß wurden daher diejenigen Gene berücksichtigt, von denen eine Beteiligung an der Bildung von beim BOFS betroffenen Organsystemen, d.h. eine Expression in den Embryonalanlagen der oben genannten Organsysteme, bekannt ist. Die einzelnen Organe, welche bei BOFS-Individuen betroffen sind, sind nachfolgend zusammenfassend beschrieben.

4.2.2 Embryonalentwicklung der orofacialen Strukturen aus den Branchialbögen

Die Bildung der verschiedenen Gesichtsstrukturen erfolgt durch viele komplizierte Entwicklungswege, die während der Embryogenese zusammenwirken. Die Branchialbögen (Synonym: Pharyngealbögen oder Kiemenbögen) sind embryonale Strukturen, deren Entwicklung zur Bildung der meisten Gefäße, Nerven, Muskeln, Knochen, Knorpel und Sinnesorgane in Kopf und Hals führen. Die Branchialbögen sind fünf schräg verlaufende spangenförmige Wülste, die in der 4./5. Woche in der lateralen Wand des Kopfdarmes, dem primitiven Pharynx, entstehen. Von außen erkennt man vier von ektodermalem Epithel bedeckte Einstülpungen (Schlundfurchen (*Sulci branchiales*)), die die Branchialbögen voneinander trennen. Von innen gesehen sind es fünf Aussackungen zwischen den Branchialbögen. Diese sind als Schlundtaschen (*Sacci pharyngeales*) bekannt und von entodermalem Ursprung (135). Für das BOFS sind die Derivate der ersten zwei Branchialbögen (Mandibularbogen und Hyoidbogen) und die dazugehörigen Schlundtaschen und Schlundfurchen besonders relevant.

Der Gaumen wird durch Verschmelzung von primärem und sekundären Gaumen gebildet. Der primäre Gaumen entsteht aus dem Zwischenkiefersegment und trägt später die Schneidezähne. Der sekundäre Gaumen entsteht, indem die beiden lateralen Gaumenfortsätze (Gaumeplatten) zusammen wachsen. Fehlerhafte Mesenchymbildung führt zur Verschmelzungsdefekten zwischen medialem Nasenwulst und Oberkieferwulst. Das Resultat sind uni- oder bilaterale Lippen- und Kieferspalt am Oberkiefer, die durch ganz oder teilweise fehlende Vereinigung der Gaumenfortsätzen auftreten. Kombinationen dieser Entwicklungsdefekte sind Lippen-Kiefer-Gaumenspalten (LKG), die mit einer Häufigkeit von 1:500 bis 1:700 bei Neugeborenen zu den häufigsten angeborenen Fehlbildungen gehören (135). Dies belegt, dass LKG paradigmatisch für genetische Heterogenität stehen und daher beim BOFS eher als Assoziation denn als Leitsymptom betrachtet werden müssen.

Durch inkorrekte Entwicklung der Halsstrukturen und des Gehörorgans können Fehlbildungen auftreten, die typischen Zeichen des BOFS entsprechen können. Ein wichtiger Schritt während der Hals- und Ohrentwicklung ist die Bildung des sogenannten *Sinus cervicalis*. Dieser besteht aus einer mit ektodermalem Epithel ausgekleideten Höhle. Diese Struktur bildet sich durch eine starke Proliferation des Mesenchyms des 2. Branchialbogens, dabei verlieren die Schlundfurchen ihre Verbindung zur Oberfläche. Bei inkorrektter Entwicklung kann ein bleibender *Sinus cervicalis* zu lateralen Halszysten oder/und Fisteln führen (135); typische Befunde bei BOFS-Patienten.

Innen-, Mittel- und Außenohr entwickeln sich aus verschiedenen Strukturen. Aus der 1. Schlundtasche wächst der *Recessus tubotympanicus*. Daraus bilden sich die Paukenhöhle, das Trommelfell und die *Tuba auditiva* (Ohrtrumpete), welche später die Paukenhöhle mit dem Nasenrachenraum verbindet. Aus den ersten beiden Branchialbögen entstehen die Gehörknöchelchen, die kleinen verbindenden Muskeln und ihre Nerven, aus der ersten Schlundfurchen der äußere Gehörgang, der röhrenförmig in Richtung des *Recessus tubotympanicus* wächst. Die Ohrmuschelhöcker entstehen im 2. Monat am Rand der 1. Schlundtasche aus Mesenchymverdichtungen. Durch ihre Verschmelzung entwickeln sich die Ohrmuscheln. Erst nach ihrer Entstehung erhalten sie ihre definitive Position in der Halsregion auf Höhe der Augen (137). Sehr oft treten beim BOFS Fehlbildungen des Außen- und Mittelohres zusammen mit Gesichtsfehlbildungen auf.

4.2.3 Augenentwicklung

Die verschiedenen embryonalen Anteile, aus denen sich das Auge entwickelt, kommen weder von Branchialbögen, noch Schlundtaschen, noch Schlundfurchen. Das Augenbläschen entwickelt sich zum Beispiel aus einem Teil des Vorderhirns. Augenfehlbildungen treten bei BOFS-Betroffenen häufig auf, oft als Kolobome. Diese Fehlbildungen entstehen durch einen fehlerhaften Verschluss der Augenbecherspalte. Dadurch bildet sich ein partieller oder kompletter Spalt der Iris, Linse, Aderhaut (*Chorioidea*) und/oder Sehnerv (*Nervus opticus*) (137). Das auf Chromosom 2p21 lokalisierte *SIX3*, welches bei der Entwicklung der Linsenplakode beteiligt ist, konnte als BOFS-Kandidatengenen in der vorliegenden Arbeit ausgeschlossen werden.

4.2.4 Nierenbildung

Störungen während der Nierenentwicklung können zu typischen BOFS-Nierenbefunden führen: hypoplastische, dysplastische oder aplastische Nieren. Die Nierenentwicklung des Menschen ist dreigliedrig. Vor-, Ur-, und Nachniere entstehen während der Embryonalentwicklung chronologisch aus dem intermediären Mesoderm. Zuerst bildet sich die Vorniere. Noch während deren Regression beginnt die Entstehung der Urniere. Mit der Rückbildung der Urniere beginnt die Bildung der Nachniere. Mit Hilfe der Induktion der Ureterknospe, die ab der 6. Woche aus dem metanephrogenen Blastem wächst, bildet sich aus der Nachniere die definitive Niere. Vor-, Ur- und Nachniere stehen während dieses Prozesses mit dem mesonephrogenen Gang (Wolffscher Gang) in Verbindung (136).

Vermutlich durch eine geringere Verzweigung der Ureterknospe entstehen zu kleine Nieren mit normaler Struktur, die hypoplastisch genannt werden. Eine fehlerhaft ausgebildete Nierenanlage wird Nierendysplasie genannt. Im strengen Sinn ist damit das Vorhandensein von Knorpelzellen, primitiven Tubuli oder fetalen Glomeruli gemeint. Im klinischen Alltag wird dieser Begriff ausgeweitet und auch für die oft gemeinsam auftretenden zystischen Veränderungen der Niere benutzt. Eine histologisch rudimentäre Niere wird aplastisch genannt. Eine komplett fehlende Nierenanlage entspricht einer Nierenagenesie. Diese entsteht, wenn die Ureterknospe den mesonephrogenen Gang (Wolffscher Gang) nicht erreicht und damit keine Induktion für die Nierenentwicklung stattfindet. Bei aplastischen Nieren fehlen oft auch Nierenarterien und Uretern, alles in Folge einer frühzeitigen Degeneration der Ureterknospe (21). Lebewesen mit beidseitiger Nierenaplasie sind nicht lebensfähig. Bei einer einseitigen Nierenaplasie kompensiert eine gesunde Niere die fehlende.

4.3 Beispiele putativer BOFS-Kandidatengene

Die BOFS-Symptome betreffen hochspezialisierte Differenzierungsprozesse während der Embryonalentwicklung. Die Entwicklung der Branchialbögen mit Schlundfurchen und Schlundtaschen ist das Ergebnis komplexer Prozesse, in welchen auf alle Fälle Gene der Apoptose, der Gewebeinduktion und Differenzierungsfaktoren beteiligt sein müssen. Aus der Anzahl gefundener Gene der vorliegenden Studie ist es daher sehr schwer, eine Vorhersage über das Kandidatengen zu machen. Die auf Chromosom 2, 7, 12 und 17 lokalisierten Gene der *HOX*-Familie tragen vor allem zur metameren Gliederung in der Anterior-

Posterior-Achse bei. Andererseits zeigt die *HOXA2*-Expression eine Beteiligung an der Branchialbogenmusterbildung. Die Expression hängt von *FGF8*-Signalwegen ab (131), wobei sich eine veränderte Expression von *FGF8* umgekehrt proportional auf die Intensität von Apoptose auswirken kann (127). Es ist bekannt, dass *HOX1* und *HOX3* bei der Determinierung der Rhombomere im Rhombencephalon beteiligt sind, während über ihre Beteiligung bei der Bildung von Branchialbögenderivaten nichts bekannt ist. Lediglich der bereits in der Einleitung erwähnte kompensatorische Effekt der *HOX*-Gene *Hoxa4*, *~11*, *~13* bei murinen Nierenanomalien könnte ein Indiz für deren Beteiligung am BOFS sein. Diese Genintervalle sind in dieser Arbeit ausgeschlossen worden und mit ihnen die eingangs diskutierten Gene *HOX1*, *HOXA2*, *HOX3*, *HOXA4*, *HOXA9*, *HOXA10* und *HOXA13*. Das Homöobox-Gen *TLX1* (Syn: *HOX11*) auf Chromosom 10 konnte ebenfalls durch vorherige Genuntersuchungen ausgeschlossen werden (53). So kann man nur vage postulieren, dass die streng regionalisierten Störungen des BOFS nicht auf *HOX*-Mutationen zurückzuführen sind.

Wie in der Einleitung erwähnt, steht *GDNF* als wichtiges Gen für die Nierenbildung bei Säugetieren. Es interagiert mit anderen Genen wie z.B. *SALL1*, *SIX1*, *PAX8* oder *FOXC1* in der Entwicklung des Metanephros (ursprüngliche Niere) (9). Als Ligand von *Tyrosin-Kinase*-Rezeptoren steht *GDNF* für ein Schlüsselmolekül des Wachstums der Ureterknospe. Verschiedene Studien haben die Aktivität von GDNF als Ligand des *Tyrosin-Phospho-Kinase*-Rezeptors RET in Nerven- und Nierengewebe bestätigt (133; 66). Als beteiligtes Gen der Nierenentwicklung stand es auf der Liste der BOFS-Kandidatengene. Allerdings konnte *GDNF* aufgrund seiner Lokalisation auf Chromosom 5 durch die vorliegende Arbeit ausgeschlossen werden. Mit Ausschluss von Chromosom 10 kommt das ebenfalls auf diesem Chromosom lokalisierte *RET*-Protooncogen nicht mehr als BOFS-Kandidatengene in Frage.

Unter den wichtigsten Entwicklungsgenen sind Transkriptionsfaktoren oder Gene, die in regulatorischen Prozessen mitwirken. Viele der in den Tabellen zusammengefassten Gene kodieren für solche Transkriptionsfaktoren. Ihre mögliche Mitwirkung in Entwicklungsprozessen des Embryonallebens macht diese Gene jedenfalls zu Verdächtigen. Eine Vielzahl von, bei der Transkription eine entscheidende Rolle spielende Zinkfinger-Proteinen (man könnte beinahe von einem Zinkfinger-Cluster sprechen) wurden auf Chromosom 19 gefunden, wobei auch vereinzelt Zinkfinger-Gene in gemeinsamen Intervallen auf anderen Chromosomen gefunden wurden. Insgesamt sind in den Tabellen, die durch gemeinsame Haplotypen definiert sind, 105 Zinkfinger-Gene enthalten. Allerdings stehen für diese ge-

listeten Gene keine Daten transgener Mäuse oder Knockouts zur Verfügung und es sind keine Phänotypen aus der OMIM-Datenbank bekannt. Deshalb ist die Entscheidung, ob man hier einen Zusammenhang einzelner Gene mit dem BOFS herstellen kann oder nicht, sehr schwierig.

Die Zinkfinger-Proteine haben mit ihrer DNA-bindenden Funktion eine funktionelle Parallele zu den Transkriptionsfaktoren aus der *forkhead-box*-Familie (FOX). Die in der Einleitung genannten Gene für die *forkhead*-Proteine *FOXC2* (Chromosom 16), *FOXE3* (Chromosom 1), *FOXH1* (Chromosom 8), *FOXO1* (Chromosom 13) und *FOXE1* (Chromosom 9) konnten aufgrund ihrer Lokalisation in Relation zu den Haplotypintervallen ausgeschlossen werden. Das auf Chromosom 3 kartierte *FOXL2* wurde aufgrund des Phänotyps (Blepharophimose, vorzeitige Menopause) ausgeschlossen.

Auch Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren sind als Komponenten der Differenzierung bekannt. Als Beispiel seien nur durch Mutationen in *FGFR*-Genen verursachte Krankheiten wie die Cephalosyndactylien oder Störungen der Chondrogenese genannt. So können diese Gene oder deren Homologe durchaus auch als Kandidatengene des BOFS postuliert werden. Ein Beispiel dafür ist der *platelet-derived growth factor receptor* (*PDGFRA*) auf Chromosom 4. Aber auch das auf Chromosom 5 kartierte Gen für den Fibroblastenwachstumsfaktor *FGF18* und ein *FGF*-Rezeptor-Gen *fibroblast growth factor 4* (*FGFR4*) können genauso wie das *forkhead-box*-Gen *FOXI1* auf diesem Chromosom als Kandidatengene betrachtet werden. Dies gilt z.B. auch für den *transforming growth factor beta 3* (*TGFB3*) auf Chromosom 14. Ausgeschlossen werden konnten die in der Einleitung genannten *FGF*-Gene *FGF2* und *FGF8*, während das auf Chromosom 5 liegende Gen *FGF1* in die Auswahl kam. Die dazugehörigen Rezeptoren konnten für folgende Gene ausgeschlossen werden: *FGFR1* (Chromosom 8); *FGFR2* (Chromosom 10) und *FGFR3* (Chromosom 4).

Allein die Vielzahl der in den Bereichen gemeinsamer Haplotypen gefundenen Gene macht eine Kandidatengenominierung für das BOFS ohne weitere gesicherte Anhaltspunkte sehr schwierig. Nicht nur diese Gene selbst, sondern auch die diese in Entwicklungsprozessen einschließenden Genkaskaden sind in der Evolution oft sehr konserviert. Wie in anderen Spezies spielen diese Wachstumsfaktoren beim Menschen während der Organogenese eine sehr wichtige Rolle (manchmal auch in gleichen Prozessen bei evolutiv sehr entfernten Spezies).

Die Signalübertragung membranständiger Rezeptoren erfolgt über den MAP-Kinase-Weg. Hier sind Proteine zu nennen, die vor allem an Zellproliferation und Apoptose beteiligt

sind, typische Prozesse, deren Störung für das BOFS verantwortlich sein dürfte. Anomalien oder Veränderungen in der Expression dieser Gene können zur Veränderung von Form und Funktion von Zellen führen und damit Entwicklungsprozesse, an denen diese Zellen teilnehmen, beeinflussen. Gene, die Strukturkomponenten von Zellen und extrazellulärer Matrix kodieren, spielen deshalb in Entwicklungsprozessen eine Rolle. Ihre Mutationen können zu schwerwiegenden Krankheitsphänotypen führen. Die durch extrazelluläre Signale aktivierten Interaktionswege zeichnen sich durch Protein-Phosphorylierung und damit Aktivierung von Proteinen, insbesondere nukleären Transkriptionsfaktoren, aus. Hier wird der enge Zusammenhang zwischen Rezeptormolekülen, Signaltransduktionswegen, Transkriptionsfaktoren und Differenzierung erkennbar. In den in dieser Arbeit dargestellten Tabellen sind Proteine bzw. ihre kodierenden Gene aufgelistet, die im Zellzyklus mitwirken oder auf andere Weise die Länge des Zellebens beeinflussen können. In den Regionen gemeinsamer Haplotypen wurden u.a. folgende Proteine gefunden und in die engere Wahl aufgenommen: *fas apoptotic inhibitory molecule (FAIM)* auf Chromosom 3, *cyclinG2 (CCNG2)*, *cyclin I (CCNI)* und *cyclin-dependent kinase-like (CDC2-related kinase)-(CDKL2)* auf Chromosom 4, oder die *kinasen family member 13A (KIF13A)* auf Chromosom 6 – viele davon Komponenten des MAP-Kinase-Wegs.

Neben Rezeptoren wie den FGF-Rezeptoren sind auch andere Proteine integraler Bestandteil der Zellmembran, z.B. Ionenkanäle, die für das elektrische Potential und den Salzhaushalt von Zellen essentiell sind. Membranständige Proteine sind auch in den im Ergebnisteil dargestellten Tabellen zu finden. Beispiele davon sind das *transmembrane protein 16C (TMEM16C)*, das *transmembrane gamma-carboxyglutamic acid protein 4 (TMG4)* auf Chromosom 11 und *Integrin, beta 5 (ITGB5)* auf Chromosom 3.

In den Regionen gemeinsamer Haplotypen wurden auch einige Gene gefunden, die für Proteine kodieren, die Enzymeigenschaften besitzen. Diese Gruppe sehr unterschiedlicher Proteine wirkt in fast jedem biologischen Prozess mit, von der Modifikation von DNA-Molekülen (z.B. Topoisomerasen, die über DNA-Strangbrüche die Topologie der DNA verändern) bis hin zur Funktion im Metabolismus, z.B. in Leberzellen. Natürlich spielen sie auch während der Organogenese und Embryonalentwicklung oft auf molekularer Ebene eine sehr wichtige Rolle. Aus diesem Grund sind in den in dieser Arbeit dargestellten Tabellen viele Enzyme aufgelistet. Einige Beispiele davon sind das auf Chromosom 3 lokalisierte Enzym der Chondroitin-Sulfatierung *carbohydrate (chondroitin 4) sulfotransferase 13 (CHST13)*, oder die ebenfalls auf Chromosom 3 kartierte *receptor-like tyrosine kinase (RYK)*. Ebenso findet sich neben der auf Chromosom 5 kartierten *dual specificity*

phosphatase 1 (DUSP1) in der Rubrik der Enzyme ein Mitglied der cyclin-abhängigen Kinasen *CDKL2* auf Chromosom 4, welche bereits bei den Zielgenen des MAP-Kinase-Wegs besprochen wurden.

Unabhängig von deren Funktion wurde es auch als wichtig erachtet, Gene bzw. Proteine, die einen direkten oder indirekten Zusammenhang mit Symptomen des BOFS nahelegen, in diesen Tabellen aufzulisten. So befindet sich auf Chromosom 7 das Gen *ocular development-associated gene (ODAG)*, oder auf Chromosom 11 der Faktor *deafness locus associated putative guanine nucleotide exchange factor (DELGEF)*.

Außerdem wurden auf verschiedenen Chromosomen Gene gefunden, die Ursachen BOFS-ähnlicher Syndrome sind, und zumindest teilweise im Zusammenhang mit dem BOFS stehen könnten. Wie eingangs bereits erwähnt, fanden auch diese Gene in Form eines *in silico candidate gene approach* Berücksichtigung in der Zusammenstellung der Tabellen. So liegt auf Chromosom 11 das Gen für das *Usher Syndrome 1C (USH1C)*, welches möglicherweise mitwirkendes Kandidatengen für das BOFS ist. Weitere Beispiele sind *Charcot-Marie-Tooth neuropathy (CMT4B2)* auf Chromosom 11, verschiedene *cat eye syndrome (CECR)*-Kandidatenregionen (1, 5 und 6) auf Chromosom 22 oder das *Hermansky-Pudlak-Syndrom 5 (HPS5)* auf Chromosom 11.

Das BOFS verursachende Gen muss folglich nach dem Ausschlussprinzip unter den restlichen in dieser Arbeit erfassten Genen sein. Eine weitere Eingrenzung dieses reduzierten, mit 651 Genen aber dennoch noch sehr umfassenden Genpools, kann nur erfolgen, wenn andere vom BOFS betroffene Familien zur Verfügung stehen.

4.4 Inhalt der Krankheitsbildtabellen und Syndromologie

Neben den Daten aus den Gendatenbanken waren natürlich auch die Daten aus der OMIM-Datenbank über genetisch bedingte Erkrankungen eine wertvolle Ressource. Mit Hilfe dieser Datenbank wurden in den eingegrenzten Regionen Krankheitsbilder gefunden und mit den Symptomen des BOFS verglichen. Die gefundenen genetisch bedingten Erkrankungen wurden in den Krankheitsbildtabellen im Ergebnisteil dargestellt. Hauptsächlich wurden dabei Phänotyp und Form der Vererbung von jedem Krankheitsbild beachtet und als Inklusionskriterium herangezogen. Viele dieser Krankheitsbilder bestehen aus syndromalen Erkrankungen, deren Symptome entweder gemeinsam mit dem BOFS vorkommen, oder in enger Verbindung mit diesem Syndrom stehen könnten. Ausführliche Informationen über

molekulare, pathogenetische und klinische Aspekte jedes Krankheitsbildes wurden mit Hilfe der OMIM-Datenbank und den darin verknüpften Datenbanken erhalten.

In den Genlisten wurden zwei Loci (*USH3A* auf Chromosom 3 sowie *USH1C* auf Chromosom 11) für verschiedene Formen des Usher-Syndroms gefunden. Auch bei der Liste der genetisch bedingten Erkrankungen erscheint Usher-Syndrom Typ IA auf Chromosom 14 in den Tabellen. Dies ist nicht zufällig. Zu den Auffälligkeiten des Usher-Syndroms zählt eine beidseitige Gehörlosigkeit mit Verlust des Sichtfelds. Im Gegensatz zum Usher-Syndrom sind beim BOFS die Fehlbildungen der Augen angeboren und ab Geburt manifest. Die Übereinstimmung mit dem Usher-Syndrom kann jedoch auch zufällig sein, wenn man berücksichtigt, dass es mindestens 40 Krankheitsbilder mit Gehörlosigkeit und Blindheit gibt. Jedoch liegen die restlichen Krankheitsbilder außerhalb der durch die vorliegende Untersuchungen definierten Intervalle gemeinsamer Haplotypen beim BOFS. Die Abgrenzung des BOFS anhand seiner Symptome von anderen Krankheitsbildern ist für den Syndromologen eine Herausforderung, die nicht immer zur richtigen Interpretation des Krankheitsbildes führt. Dies führte in der Vergangenheit auch dazu, dass das BOFS fälschlicherweise diagnostiziert und publiziert wurde. So sind zum Beispiel die drei in der Arbeit von Kulkarni (59) dargestellten Fälle laut der Syndromologin und BOFS-Expertin Angela Lin falsch diagnostiziert (72). Die Problematik der richtigen Diagnose zeigte sich auch bei einer anderen Publikation, die das zum Formenkreis gehörende BOR-Syndrom mit dem BO-Syndrom beim ersten Einreichen der Arbeit beim Verlag verwechselte (126).

Gehörlosigkeit oder Nierenfehlbildungen können Phänokopien darstellen bzw. auf genetischer Heterogenität basieren. Aus diesem Grund ist auch die Erkennung des BOFS-Leitsymptoms „Branchialsinusdefekte“ grundlegend für die Diagnose des BOFS (89). Postulierte Mutationen oder Genveränderungen im putativen BOFS-Kandidatengen zeigen pleiotrope Effekte, so dass eine phänotypische Variabilität entstehen kann. Ob diese Variabilität auf allelische Heterogenität zurückzuführen ist, kann nur spekuliert werden. Auch eine Locusheterogenität, wie sie vom BOS bekannt ist, kann nicht ausgeschlossen werden. Dies zu berücksichtigen ist vor allem dann wichtig, wenn in Zukunft unter Einbeziehung weiterer Familien eventuell Kopplungsanalysen durchgeführt werden sollen. Es ist ferner wichtig zu beachten, dass der Phänotyp des BOFS bei Betroffenen sehr variabel ist.

Die Informationen aus den in dieser Arbeit zusammengestellten Tabellen sind ein guter Ausgangspunkt für eine weiterführende Forschung nach den Ursachen des BOFS. Dem Ziel, die Pathogenese des BOFS aufzuklären, kann man durch das Verständnis möglicher Zusammenhänge zwischen dem BOFS und die in den Tabellen dargestellten Krankheits-

bildern, sowie der Funktion der verursachenden Gene und ihren Mutationen, näher kommen.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Das Branchio-Oculo-Facial Syndrom (BOFS) ist eine sehr seltene autosomal-dominant vererbte Erkrankung. Bis heute sind in der Literatur nur wenige Fälle beschrieben worden. Die genetische Ursache von BOFS ist noch nicht bekannt. Deshalb und aufgrund der Vielfalt von Symptomen bei Betroffenen, sowie den unterschiedlichen Ausprägungsformen, ist eine zuverlässige Diagnose des Syndroms nicht einfach.

Auf der bisherigen Suche nach der Pathogenese des BOFS sind einzelne Kandidatengene sequenziert worden. Bisher wurde keine Mutation gefunden. In dieser Arbeit ist zum ersten Mal in der Erforschung der Ursache des BOFS eine genomweite Segregationsanalyse durchgeführt worden. Mit dieser Methode kann man die Allelseggregation von genetischen Markern über mehrere Generationen in einer Familie verfolgen. Es wurde dafür DNA von der größten bekannten, über drei Generationen reichenden, BOFS-Familie verwendet. Weil das BOFS autosomal vererbt wird, beschränkten sich die Analysen auf die 22 Autosomenpaare.

Für die Chromosomen 1, 8, 9, 10, 16, 17 und 20 wurden keine gemeinsam Haplotypen bei den Erkrankten ermittelt. Deshalb konnten diese Chromosomen als Genorte für ein mögliches BOFS-Kandidatengen komplett ausgeschlossen werden. Von anderen Chromosomen konnten nur Teile ausgeschlossen werden. Insgesamt gelang es, allein anhand der Segregationsanalyse mit ca. 400 Markern, 89% des menschlichen Genoms auszuschließen. So befindet sich das BOFS-Kandidatengen in einem Bereich von „nur“ noch 363 Mbp. Diese durch gemeinsame Haplotypen definierte Region schließt 3.856 Gene ein, wobei durch Datenbankrecherchen ca. 83% davon ausgeschlossen werden konnten und letztendlich 651 Gene in die engere Auswahl kommen.

Dieser Ausschluss erfolgte durch Recherche in Datenbanken des NCBI und vernetzten Datenbanken nach Genen und Krankheitsbildern für diese Kandidatenregionen. Ein möglicher Zusammenhang zwischen den in diesen Regionen gefundenen Genen und/oder Krankheitsbildern und dem BOFS wurde diskutiert. Dafür wurden unter anderem Informationen der Gendatenbanken über räumliche und zeitliche Expressionsprofile, Charakteristika jedes Gens und Knockoutexperimente sowie Literaturdaten berücksichtigt.

Das BOFS-verursachende Gen in seiner mutierten Form sollte in dieser Arbeit kartiert werden. Die Liste von Kandidatengenen ist dabei aber noch sehr lang. Nur durch Untersu-

chungen weiterer BOFS-Familien kann man diese Liste reduzieren, um in Zukunft eine gezielte Gensequenzierung auf der Suche nach der Ursache des BOFS durchführen zu können. Lediglich die gefundenen Favoriten *PAX6*, *FGFR4* und *FOXII* sollten in naher Zukunft einer Mutationsanalyse bei BOFS-Individuen unterzogen werden.

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. Abdelhak S, Kalatzis V, Heilig R, Compain S, Samson D, Vincent C, Levi-Acobas F, Cruaud C, Le Merrer M, Mathieu M, Konig R, Vigneron J, Weissenbach J, Petit C, Weil D: Clustering of mutations responsible for branchio-oto-renal (BOR) syndrome in the eyes absent homologous region (eyaHR) of EYA1. *Hum Mol Genet* 6:2247-2255 (1997)
2. Alvarez-Bolado G, Rosenfeld MG, Swanson LW: Model of forebrain regionalization based on spatiotemporal patterns of POU-III homeobox gene expression, birthdates, and morphological features. *J Comp Neurol* 355:237-295 (1995)
3. Andersen B, Rosenfeld MG: POU domain factors in the neuroendocrine system: lessons from developmental biology provide insights into human disease. *Endocr Rev* 22:2-35 (2001)
4. Balling R, Deutsch U, Größ P: Undulated, a mutation affecting the development of the mouse skeleton, has a point mutation in the paired box of Pax 1. *Cell* 55:531- 535 (1988)
5. Bennicelli JL, Edwards RH, Barr FG: Mechanism for transcriptional gain of function resulting from chromosomal translocation in alveolar rhabdomyosarcoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 93:5455-5459 (1996)
6. Bopp D, Burri M, Baumgartner S, Frigerio G, Noll M: Conservation of a large protein domain in the segmentation gene paired and in functionally related genes of *Drosophila*. *Cell* 47:1033-1040 (1986)
7. Brandenberger R, Wei H, Zhang S, Lei S, Murage J, Fisk GJ, Li Y, Xu C, Fang R, Guegler K, Rao MS, Mandalam R, Lebkowski J, Stanton LW: Transcriptome characterization elucidates signaling networks that control human ES cell growth and differentiation. *Nat Biotechnol* 22: 707-716 (2004)

8. Brice G, Mansour S, Bell R, Collin JRO, Child AH, Brady AF, Sarfarazi M, Burnand KG, Jeffery S, Mortimer P, Murday VA: Analysis of the phenotypic abnormalities in lymphoedema-distichiasis syndrome in 74 patients with FOXC2 mutations or linkage to 16q24. *J Med Genet* 39:478-483 (2002)
9. Brodbeck S, Englert C: Genetic determination of nephrogenesis: the Pax/Eya/Six gene network. *Pediatr Nephrol* 19:249-255 (2004)
10. Bui QT, Zimmerman JE, Liu H, Bonini NM: Molecular analysis of *Drosophila* eyes absent mutants reveals features of the conserved Eya domain. *Genetics* 155:709-720 (2000)
11. Burke D, Wilkes D, Blundell TL, Malcolm S. Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes. *Trends Biochem Sci* 23:59-62 (1998)
12. Castanet M, Park SM, Smith A, Bost M, Leger J, Lyonnet S, Pelet A, Czernichow P, Chatterjee K, Polak M: A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate. *Hum Mol Genet* 11:2051-2059 (2002)
13. Cederberg A, Gronning LM, Ahren B, Tasken K, Carlsson P, Enerback S: FOXC2 is a winged helix Gene that counteracts obesity, hypertriglyceridemia, and diet-induced insulin resistance. *Cell* 106:563-573 (2001)
14. Chen R, Amoui M, Zhang Z, Markon G: Dachshund and eyes absent proteins form a complex and function synergistically to induce ectopic eye development in *Drosophila*. *Cell* 91:893-903 (1997)
15. Cheng W, Liu J, Yoshida H, Rosen D, Naora H: Lineage infidelity of epithelial ovarian cancers is controlled by HOX genes that specify regional identity in the reproductive tract. *Nat Med* 11:531- 537 (2005)

16. Cheyette BN, Green PJ, Martin K, Garren H, Hartenstein V, Zipursky SL: The *Drosophila sine oculis* locus encodes a homeodomain-containing protein required for the development of the entire visual system. *Neuron* 12:977-996 (1994)
17. Clement-Ziza M, Brody Y, Munnich A, Lyonnet S, Besmond C: GeneRetriever: software to extract all genes and transcripts in between two genetic markers to assist design of human custom microarrays. *Biotechniques* 39:180-184 (2005)
18. Clifton-Bligh RJ, Wentworth JM, Heinz P, Crisp MS, John R, Lazarus JH, Ludgate M, Chatterjee VK: Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia. *Nat Genet* 19:399-401 (1998)
19. Cobourne MT: Construction for the modern head: current concepts in craniofacial development. *J Orthod* 27:307-314 (2000)
20. Correa-Cerro L, Kennerknecht I, Just W, Vogel W, Müller D: The gene for branchio-oculo-facial syndrome does not colocalize to the EYA 1-4 genes. *J Med Genet* 37:620-623 (2000)
21. Conrad S, Huland H: Nierenfehlbildungen. In: Hautmann RE, Huland H (Hrsg) *Urologie*, 3. Aufl, Springer, Berlin, S.377-379 (2006)
22. Crisponi L, Deiana M, Loi A, Chiappe F, Uda M, Amati P, Bisceglia L, Zelante L, Nagaraja R, Porcu S, Ristaldi MS, Marzella R, Rocchi M, Nicolino M, Lienhardt-Roussie A, Nivelon A, Verloes A, Schlessinger D, Gasparini P, Bonneau D, Cao A, Pilia G: The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome. *Nat Genet* 27:159-166 (2001)
23. Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kuo A, Leder P: Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth. *Cell* 84:911-921 (1996)

24. Deutsch U, Dressler GR, Gruss P: Pax 1, a member of a paired box homologous murine gene family, is expressed in segmented structures during development. *Cell* 53:617-625 (1988)
25. Dressler GR, Deutsch U, Chowdhury K, Nornes HO, Gruss P: Pax2, a new murine paired-box-containing gene and its expression in the developing excretory system. *Development* 109:787-95 (1990)
26. Edwards JH. Exclusion mapping: *J Med Genet* 24:539-543 (1987)
27. El Darouti MA, Marzouk SA, Azzam OA, Nada HR, Sobhi RM, El Nabarawi I: Branchio-oculo-facial syndrome with bilateral linear scars of the neck. *Int J Dermatol* 44:674-676 (2005)
28. Epstein DJ, Vekemans M, Gros P: Splotch (Sp2H), a mutation affecting development of the mouse neural tube, shows a deletion within the paired homeodomain of Pax-3. *Cell* 67:767-74 (1991)
29. Erickson RP, Dagenais SL, Caulder MS, Downs CA, Herman G, Jones MC, Kerstjens-Frederikse WS, Lidral AC, McDonald M, Nelson CC, Witte M, Glover TW: Clinical heterogeneity in lymphoedema-distichiasis with FOXC2 truncating mutations. *J Med Genet* 38:761-766 (2001)
30. Erkman L, McEvelly RJ, Luo L, Ryan AK, Hooshmand F, O'Connell SM, Keithley EM, Rapaport DH, Ryan AF, Rosenfeld MG: Role of transcription factors Brn-3.1 and Brn-3.2 in auditory and visual system development. *Nature* 381:603-606 (1996)
31. Estefania E, Ramirez-Camacho R, Gomar M, Trinidad A, Arellano B, Garcia-Berrocal JR, Verdaguer JM, Vilches C: Point mutation of an EYA1-gene splice site in a patient with oto-facio-cervical syndrome. *Ann Hum Genet* 70:140-144 (2006)
32. Ferguson MW: A hole in the head. *Nat Genet* 24:330-331 (2000)

33. Fujimoto A, Lipson M, Lacro RV, Shinno NW, Boelter WD, Jones KL, Wilson MG: New autosomal dominant branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Genet* 27:943-951 (1987)
34. Fujita H, Ohta M, Kawasaki T, Itoh N: The expression of two isoforms of the human fibroblast growth factor receptor (flg) is directed by alternative splicing. *Biochem and Biophys Res Commun* 174:946-951 (1991)
35. Gallardo ME, Rodriguez De Cordoba S, Schneider AS, Dwyer MA, Ayuso C, Bovolenta P: Analysis of the developmental SIX6 homeobox gene in patients with anophthalmia/microphthalmia. *Am J Med Genet A* 129:92-94 (2004)
36. Gehring WJ, Ikeo K: PAX6: mastering eye morphogenesis and eye evolution. *Trends Genet* 15:371-377 (1999)
37. Gendrom-Maguire M, Mallo M, Zhang M, Gridley T: Hoxa-2 mutant mice exhibit homeotic transformation of skeletal elements derived from cranial neural crest. *Cell* 75:1317-1331 (1993)
38. Gensburger C, Labourdette G, Sensenbrenner M: Brain basic fibroblast growth factor stimulates the proliferation of rat neuronal precursor cells in vitro. *FEBS Lett* 217:1-5 (1987)
39. Gould DB, Mears AJ, Pearce WG, Walter MA: Autosomal dominant Axenfeld-Rieger anomaly maps to 6p25. *Am J Hum Genet* 61:765-768 (1997)
40. Gruss P, Walther C: Pax in Development. *Cell* 69:719-722 (1992)
41. Halder G, Callaerts P, Flister S, Walldorf U, Kloter U, Gehring WJ: Eyeless initiates the expression of both sine oculis and eyes absent during Drosophila compound eye development. *Development* 125:2181-2191 (1998)

42. Hall BD, deLorimier A, Foster LH: Brief clinical report: A new syndrome of hemangiomatic branchial clefts, lip pseudoclefts, and unusual facial appearance. *Am J Med Genet* 14:135-138 (1983)
43. Harris SE, Chand AL, Winship IM, Gersak K, Aittomaki K, Shelling AN: Identification of novel mutations in FOXL2 associated with premature ovarian failure. *Mol Hum Reprod* 8(8):729-733 (2002)
44. Heanue TA, Reshef R, Davis RJ, Mardon G, Oliver G, Tomarev S, Lassar AB, Tabin CJ: Synergistic regulation of vertebrate muscle development by Dach2, Eya2, and Six1, homologs of genes required for Drosophila eye formation. *Genes Dev* 13:3231-3243 (1999)
45. Holger Thiele and Peter Nürnberg: HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics* 21(8):1730-1732 (2004)
46. Hulander M, Wurst W, Carlsson P, Enerbäck S: The winged helix transcription factor Fkh10 is required for normal development of the inner ear. *Nat Genet* 20: 374-376 (1998)
47. Iida K, Koseki H, Kakinuma H, Kato N, Mizutani-Koseki Y, Ohuchi H, Yoshioka H, Noji S, Kawamura K, Kataoka Y, Ueno F, Taniguchi M, Yoshida N, Sugiyama T, Miura N: Essential roles of the winged helix transcription factor MFH-1 in aortic arch patterning and skeletogenesis. *Development* 124:4627-4638 (1997)
48. Ikeda K, Watanabe Y, Ohto H, Kawakami K: Molecular interaction and synergistic activation of promoter by Six, Eya, and Dach proteins mediated through CREB binding protein. *Mol Cell Biol* 22:6759-6766 (2002)
49. Itoh N, Ornitz DM: Evolution of the Fgf and Fgfr gene families. *Trends Genet* 20:563-569 (2004)

50. Johnson D, Kan SH, Oldridge M, Trembath RC, Roche P, Esnouf RM, Giele H, Wilkie AO: Missense mutations in the homeodomain of HOXD13 are associated with brachydactyly types D and E. *Am J Hum Genet* 72:284-297 (2003)
51. Just W, Trautmann T, Baumstark A, Müller D: Research Letter. Exclusion of the SALL1 gene as a cause of branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Med Genet A*. 117:196-198 (2003)
52. Kaestner KH, Knöchel W, Martínez DE: Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. *Genes Dev* 14:142-146 (2000)
53. Kaiser R: Branchio-Oculo-Facial-Syndrom. Segregationsanalysen und Mutationssuche zur Identifizierung von Kandidatengenen. Med Dissertation, Universität Ulm 2006
54. Kalchauer C: Basic fibroblast growth factor stimulates survival of nonneuronal cells developing from trunk neural crest. *Dev Biol* 134:1-10 (1989)
55. Katoh M, Katoh M: Human FOX gene family (Review). *Int J Oncol* 25:1495-1500 (2004)
56. Kawakami K, Sato S, Ozaki H, Ikeda K: Six family genes-structure and function as transcription factors and their roles in development. *Bioessays* 22:616-626 (2000)
57. Kohlhaase J, Wischermann A, Reichenbach H, Froster U, Engel W: Mutations in the SALL1 putative transcription factor gene cause Townes-Brocks syndrome. *Nat Genet* 18:81-83 (1998)
58. Kozmik Z: Pax genes in eye development and evolution. *Curr Opin in Genet Dev* 15:430-438 (2005)
59. Kulkarni ML, Deshmukh S, Kumar A, Kulkarni PM: Branchio-oculo-facial syndrome. *Indian J Pediatr* 72:701-703 (2005)

60. Kumar S, Deffenbacher K, Marres HA, Cremers CW, Kimberling WJ: Genomewide search and genetic localization of second gene associated with autosomal dominant branchio-oto-renal syndrome: clinical and genetic implications. *Am J Hum Genet* 66:1715-1720 (2000)
61. Kumar S, Marres HA, Cremers CW, Kimberling WJ: Autosomal dominant branchio-otic (BO) syndrome is not allelic to branchio-oto-renal (BOR) gene at 8q13. *Am J Med Genet* 76:395-401 (1998)
62. Kume T, Deng K, Hogan BLM: Murine forkhead/winged helix genes *Foxc1* (*Mf1*) and *Foxc2* (*Mfh1*) are required for the early organogenesis of the kidney and urinary tract. *Development* 127:1387-1395 (2000)
63. Kume T, Jiang H, Topczewska JM, Hogan BL: The murine winged helix transcription factors, *Foxc1* and *Foxc2*, are both required for cardiovascular development and somitogenesis. *Genes Dev* 15:2470-2482 (2001)
64. Lappin TR, Grier DG, Thompson A, Halliday HL: HOX genes: seductive science, mysterious mechanisms. *Ulster Med J* 75:23-31 (2006)
65. Lathrop GM, Lalouel JM, Julier C, Ott J: Strategies for multilocus linkage analysis in humans. *Proc Natl Acad Sci USA* 81:3443-3446 (1984)
66. Lee DC, Chan KW, Chan SY: RET receptor tyrosine kinase isoforms in kidney function and disease. *Oncogene* 21:5582-5592 (2002)
67. Lehmann OF, Sowden JC, Carlsson P, Jordan T, Bhattacharya SS: Fox's in development and disease. *Trends Genet* 19:339-344 (2003)
68. Lewis EB: A gene complex controlling segmentation in *Drosophila*. *Nature* 276:565-570 (1978)
69. Li X, Oghi KA, Zhang J, Krones A, Bush KT, Glass CK, Nigam SK, Aggarwal AK, Maas R, Rose DW, Rosenfeld MG: Eya protein phosphatase activity regulates Six1-

- Dach-Eya transcriptional effects in mammalian organogenesis. *Nature* 426:247-254 (2003)
70. Lin AE, Gorlin RJ, Lurie IW, Brunner HG, van der Burgt I, Naumchik IV, Rumyantseva NV, Stengel-Rutkowski S, Rosenbaum K, Meinecke P, Muller D: Further delineation of the branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Genet* 56:42-59 (1995)
71. Lin AE, Semina EV, Daack-Hirsch S, Roeder ER, Curry CJ, Rosenbaum K, Weaver DD, Murray JC: Exclusion of the branchio-oto-renal syndrome locus (EYA1) from patients with branchio-oculo-facial syndrome. *Am J Genet* 91:387-390 (2000)
72. Lin AE: (2006 persönliche Mitteilung)
73. Liu W, Lagutin OV, Mende M, Streit A, Oliver G: Six3 activation of Pax6 expression is essential for mammalian lens induction and specification. *EMBO J* 25:5383-5395 (2006)
74. Lopez-Rios J, Gallardo ME, Rodriguez de Cordoba S, Bovolenta P: Six9 (Optx2), a new member of the six gene family of transcription factors, is expressed at early stages of vertebrate ocular and pituitary development. *Mech Dev* 83:155-159 (1999)
75. Maciag T, Hoover GA, Stemerman MB, Weinstein R: Serial propagation of human endothelial cells in vitro. *J Cell Biol* 91:420-426 (1981)
76. Mansouri A, Chowdhury K, Gruss P: Follicular cells of the thyroid gland require Pax8 gene function. *Nat Genet* 19:87-90 (1998)
77. Mansouri A, Stoykova A, Grub P: Pax genes in development. *J Cell Sci Suppl* 18:35-42 (1994)
78. Maulbecker C, Gruss P: The oncogenic potential of Pax genes. *EMBO J* 12:2361-2367 (1993)

79. McCool M, Weaver DD. Branchio-oculo-facial syndrome: broadening the spectrum. *Am J Med Genet* 49:414-421 (1994)
80. McKusick VA: Mendelian inheritance in man. A catalog of human gens and genetic disorders (12th edition). Johns Hopkins Univerity Press, Baltimore (1998)
81. Mears AJ, Jordan T, Mirzayans F, Dubois S, Kume T, Parlee M, Ritch R, Koop B, Kuo WL, Collins C, Marshall J, Gould DB, Pearce W, Carlsson P, Enerback S, Morissette J, Bhattacharya S, Hogan B, Raymond V, Walter MA: Mutations of the forkhead/winged-helix gene, FKHL7, in patients with Axenfeld-Rieger anomaly. *Am J Hum Genet* 63:1316-1328 (1998)
82. Mears AJ, Mirzayans F, Gould DB, Pearce WG, Walter MA: Autosomal dominant iridogoniodygenesis anomaly maps to 6p25. *Am J Hum Genet* 59:1321-1327 (1996)
83. Meyers EN, Lewandoski M, Martin GR: An Fgf8 mutant allelic series generated by Cre- and Flp-mediated recombination. *Nat Genet* 18:136-141 (1998)
84. Miller SA, Dykes DD, Polesky HF: A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucleic Acids Res* 16:1215 (1988)
85. Montesano R, Vassalli JD, Baird A, Guillemin R, Orci L: Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:7297-7301 (1986)
86. Morgan R: Hox genes: a continuation of embryonic patterning?. *Trends Genet* 22:67-69 (2006)
87. Moscatelli DA, Presta M, Rifkin DB: Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:2091-2095 (1986)
88. Murphy M, Reid K, Ford M, Furness JB, Bartlett PF: FGF2 regulates proliferation of neural crest cells, with subsequent neuronal differentiation regulated by LIF or related factors. *Development* 120:3519-3528 (1994)

89. Müller. Dr. (Chemnitz): (2002 persönliche Mitteilung)
90. Nishimura DY, Swiderski R, Alward WL, Searby CC, Patil SR, Bennet SR, Kanis AB, Gastier JM, Stone EM, Sheffield VC: The forkhead transcription factor gene FKHL7 is responsible for glaucoma phenotypes which map to 6p25. *Nat. Genet* 19: 140-147 (1998)
91. Oliver G, Mailhos A, Wehr R, Copeland NG, Jenkins NA, Gruss P: Six3, a murine homologue of the sine oculis gene, demarcates the most anterior border of the developing neural plate and is expressed during eye development. *Development* 121: 4045-4055 (1995)
92. Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M: Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J Biol Chem* 271:15292-15297 (1996)
93. Ozturk O, Tokmak A, Demirci L, Silan F, Guclu E: Branchio-oculo-facial syndrome with the atresia of external ear. *Int J of Pediatr Otorhinolaryngol* 69:1575-1578 (2005).
94. Partanen J, Vainikka S, Alitalo K: Structural and functional specificity of FGF receptors. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 340:297-303 (1992)
95. Pichaud F, Desplan C: Pax genes and eye organogenesis. *Curr Opin Genet Dev* 12:430-434 (2002)
96. Pignoni F, Hu B, Zavitz KH, Xiao J, Garrity PA, Zipursky SL: The eye-specification proteins So and Eya form a complex and regulate multiple steps in *Drosophila* eye development. *Cell* 91:881-891 (1997)
97. Powell MR, Michaelis RC: Townes-Brocks syndrome. *M Med Genet* 36:89-93 (1999)

98. Qiu M, Bulfone A, Ghattas I, Meneses JJ, Christensen L, Sharpe PT, Presley R, Pedersen RA, Rubenstein JL: Role of the Dlx homeobox genes in proximodistal patterning of the branchial arches: mutations of Dlx-1, Dlx-2, and Dlx-1 and -2 alter morphogenesis of proximal skeletal and soft tissue structures derived from the first and second arches. *Dev Biol* 185:165-184 (1997)
99. Rebhan M, Chalifa-Caspi V, Prilusky J, Lancet D: GeneCards: encyclopedia for genes proteins and diseases. Weizmann Institute of Science, Bioinformatics Unit and Genome Center, Rehovot, Israel, (1997)
100. Relaix F, Buckingham M: From insect eye to vertebrate muscle: redeployment of a regulatory network. *Genes Dev* 13:3171-3178 (1999)
101. Ribeiro LA, El-Jaick KB, Muenke M, Richieri-Costa A: SIX3 mutations with holoprosencephaly. *Am J Med Genet A* 140:2577-2583 (2006)
102. Rickard S, Parker M, van't Hoff W, Barnicoat A, Russell-Eggitt I, Winter RM, Bitner-Glindzicz M: Oto-facio-cervical (OFC) syndrome is a contiguous gene deletion syndrome involving EYA1: molecular analysis confirms allelism with BOR syndrome and further narrows the Duane syndrome critical region to 1 cM. *Hum Genet* 108:398-403 (2001)
103. Rijli FM, Mark M, Lakkaraju S, Dierich A, Dollé P, Chambon P: A homeotic transformation is generated in the rostral branchial region of the head by disruption of Hoxa-2, which acts as a selector gene. *Cell* 75:1333-1349 (1993)
104. Rivera-Perez JA, Mallo M, Gendrom-Maguire M, Gridley T, Behringer RR: Goosecoid is not an essential component of the mouse gastrula organizer but is required for craniofacial and rib development. *Development* 121:3005-3012 (1995)
105. Robel L, Ding M, James AJ, Lin X, Simeone A, Leckman JF, Vaccarino FM: Fibroblast growth factor 2 increases Otx2 expression in precursor cells from mammalian telencephalon. *J Neurosci* 15:7879-7891 (1995)

106. Ruf RG, Berkman J, Wolf MT, Nurnberg P, Gattas M, Ruf EM, Hyland V, Kromberg J, Glass I, Macmillan J, Otto E, Nurnberg G, Lucke B, Hennies HC, Hildebrandt F: A gene locus for branchio-otic syndrome maps to chromosome 14q21.3-q24.3. *J Med Genet* 40:515-519 (2003)
107. Ruf RG, Xu PX, Silvius D, Otto EA, Beekmann F, Muerb UT, Kumar S, Neuhaus TJ, Kemper MJ, Raymond RM Jr, Brophy PD, Berkman J, Gattas M, Hyland V, Ruf EM, Schwartz C, Chang EH, Smith RJ, Stratakis CA, Weil D, Petit C, Hildebrandt F: SIX1 mutations cause branchio-oto-renal syndrome by disruption of EYA1-SIX1-DNA complexes. *Proc Natl Acad Sci USA* 101:8090-8095 (2004)
108. Ryan AK, Rosenfeld MG: POU domain family values: flexibility, partnerships, and developmental codes. *Genes Dev* 11:1207-1225 (1997)
109. Saiki RK, Scharf JS, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N: Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Biotechnology* 24:476-480 (1992)
110. Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T: *Molecular cloning. A laboratory manual* (second edition). Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York (1989)
111. Sanyanusin P, Schimmenti LA, McNoe LA, Ward TA, Pierpont ME, Sullivan MJ, Dobyens WB, Eccles MR: Mutation of the PAX2 gene in a family with optic nerve colobomas, renal anomalies and vesicoureteral reflux. *Nat Genet* 9:358-364 (1995)
112. Sarkar PS, Appukuttan B, Han J, Ito Y, Ai C, Tsai W, Chai Y, Stout JT, Reddy S: Heterozygous loss of Six5 in mice is sufficient to cause ocular cataracts. *Nat Genet* 25:110-114 (2000)
113. Schedl A, Ross A, Lee M, Engelkamp D, Rashbass P, van Heyningen V, Hastie ND: Influence of PAX6 gene dosage on development: overexpression causes severe eye abnormalities. *Cell* 86:71-82 (1996)

114. Schonberger J, Wang L, Shin JT, Kim SD, Depreux FF, Zhu H, Zon L, Pizard A, Kim JB, Macrae CA, Mungall AJ, Seidman JG, Seidman CE: Mutation in the transcriptional coactivator EYA4 causes dilated cardiomyopathy and sensorineural hearing loss. *Nat Genet* 37:418-422 (2005)
115. Schwarz M, Cecconi F, Bernier G, Andrejewski N, Kammandel B, Wagner M, Größ P. Spatial specification of mammalian eye territories by reciprocal transcriptional repression of Pax2 and Pax6. *Development* 127:4325-4334 (2000).
116. Scott MP: Vertebrate homeobox gene nomenclature. *Cell* 71:551-553 (1992)
117. Semina EV, Brownell I, Mintz-Hittner HA, Murray JC, Jamrich M: Mutations in the human forkhead transcription factor FOXE3 associated with anterior segment ocular dysgenesis and cataracts. *Hum Mol Genet* 10:231-236 (2001)
118. Senior RM, Huang SS, Griffin GL, Huang JS: Brain-derived growth factor is a chemoattractant for fibroblasts and astroglial cells. *Biochem Biophys Res Commun* 141:67-72 (1986)
119. Seo H-C, Curtiss J, Mlodzik M, Fjose A: Six class homeobox genes in *Drosophila* belong to three distinct families and are involved in head development. *Mech Dev* 83 :127-139 (1999)
120. Serikaku MA, O'Tousa JE: Sine oculis is a homeobox gene required for *Drosophila* visual system development. *Genetics* 138:1137-1150 (1994)
121. Shimamura K, Rubenstein JL: Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. *Development* 124:2709-2718 (1997)
122. Silver SJ, Rebay I. Signaling circuitries in development: insights from the retinal determination gene network. *Development* 132:3-13 (2005)

123. Smith RJ, Coppage KB, Ankerstjerne JK, Capper DT, Kumar S, Kenyon J, Tinley S, Comeau K, Kimberling WJ: Localization of the gene for branchiootorenal syndrome to chromosome 8q. *Genomics* 14:841-844 (1992)
124. Sobel E, Lange K: Descent graphs in pedigree analysis: applications to haplotyping, location scores, and marker-sharing statistics. *Am J Hum Genet* 58:1323-1337 (1996)
125. Sobel E, Papp JC, Lange K: Detection and integration of genotyping errors in statistical genetics. *Am J Hum Genet* 70:496-508 (2002)
126. Spruijt L, Hoefsloot LH, van Schaijk GH, van Waardenburg D, Kremer B, Brackel HJ, de Die-Smulders CE: Identification of a novel EYA1 mutation presenting in a newborn with laryngomalacia, glossoptosis, retrognathia, and pectus excavatum. *Am J Hum Genet* 140:1343-1345 (2006)
127. Storm EE, Rubenstein JL, Martin GR: Dosage of Fgf8 determines whether cell survival is positively or negatively regulated in the developing forebrain. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:1757-1762 (2003)
128. Su CS, O'lagen SB, Sullivan TJ: Ocular anomalies in the branchio-oculo-facial syndrome. *Aust N Z J Ophtalmol* 26:43-46 (1998)
129. Tassabehji M, Read AP, Newton VE, Patton M, Gruss P, Harris R, Strachan T: Mutations in the PAX3 gene causing Waardenburg syndrome type 1 and type 2. *Nat Genet* 3:26-30 (1993)
130. Terranova VP, DiFlorio R, Lyall RM, Hic S, Friesel R, Maciag T: Human endothelial cells are chemotactic to endothelial cell growth factor and heparin. *J Cell Biol* 101:2330-2334 (1985)
131. Trainor PA, Ariza-McNaughton L, Krumlauf R: Role of the isthmus and FGFs in resolving the paradox of neural crest plasticity and pre patterning. *Science* 295:1288-1291 (2002)

132. Trummer T, Müller D, Schulze A, Vogel W, Just W: Branchio-oculo-facial syndrome and branchio-otic/branchio-oto-renal syndromes are distinct entities. *J Med Genet* 39:71-73 (2002)
133. Trupp M, Arenas E, Fainzilber M, Nilsson AS, Sieber BA, Grigoriou M, Kilkenny C, Salazar-Gruoso E, Pachnis V, Arumae U: Functional receptor for GDNF encoded by the c-ret-proto-oncogene. *Nature* 381:785-789 (1996)
134. Uda M, Ottolenghi C, Crisponi L, Garcia JE, Deiana M, Kimber W, Forabosco A, Cao A, Schlessinger D, Pilia G: Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development. *Hum Mol Genet* 13(11):1171-1181 (2004)
135. Ulfig N: Kopf und Hals. In: Ulfig N (Hrsg), *Kurzlehrbuch Embryologie*, Georg Thieme, KG Stuttgart, S.69-74 (2005)
136. Ulfig N: Urogenitalsystem. In: Ulfig N (Hrsg), *Kurzlehrbuch Embryologie*, Georg Thieme, KG Stuttgart, S.117-118 (2005)
137. Ulfig N: Sinnesorgane: Auge und Ohr. In: Ulfig N (Hrsg), *Kurzlehrbuch Embryologie*, Georg Thieme, KG Stuttgart, S.147-153 (2005)
138. Vaccarino FM, Schwartz ML, Raballo R, Rhee J, Lyn-Cook R: Fibroblast growth factor signaling regulates growth and morphogenesis at multiple steps during brain development. *Curr Top Dev Biol* 46:179-200 (1999)
139. Vahava O, Morell R, Lynch ED, Weiss S, Kagan ME, Ahituv N, Morrow JE, Lee MK, Skvorak AB, Morton CC, Blumenfeld A, Frydman M, Friedman TB, King MC, Avraham KB: Mutation in transcription factor POU4F3 associated with inherited progressive hearing loss in humans. *Science* 279:1950-1954 (1998)
140. Vilain C, Rydlewski C, Duprez L, Heinrichs C, Abramowicz M, Malvaux P, Renneboog B, Parma J, Costagliola S, Vassart G: Autosomal dominant transmission

- of congenital thyroid hypoplasia due to loss-of-function mutation of PAX8. *J Clin Endocrinol Metab* 86:234-238 (2001)
141. Vincent C, Kalatzis V, Abdelhak S, Chaib H, Compain S, Helias J, Vaneecloo FM, Petit C: BOR and BO syndromes are allelic defects of EYA1. *Eur J Hum Genet* 5:242-246 (1997)
 142. Wallis DE, Roessler E, Hehr U, Nanni L, Wiltshire T, Richieri-Costa A, Gillessen-Kaesbach G, Zackai EH, Rommens J, Muenke M: Mutations in the homeodomain of the human SIX3 gene cause holoprosencephaly. *Nat Genet* 22:196-198 (1999)
 143. Walther C, Guenet JL, Simon D, Deutsch U, Jostes B, Goulding MD, Plachov D, Balling R, Gruss P: Pax: a murine multigene family of paired box-containing genes. *Genomics* 11:424-434 (1991)
 144. Wawersik S, Maas RL: Vertebrate eye development as modeled in *Drosophila*. *Hum Mol Genet* 9:917-925 (2000)
 145. Wayne S, Robertson NG, DeClau F, Chen N, Verhoeven K, Prasad S, Tranebjarg L, Morton CC, Ryan AF, Van Camp G, Smith RJ: Mutations in the transcriptional activator EYA4 cause late-onset deafness at the DFNA10 locus. *Hum Mol Genet* 10:195-200 (2001)
 146. Wellik DM, Hawkes PJ, Capecchi MR: Hox11 paralogous genes are essential for metanephric kidney induction. *Genes Dev* 16:1423-1432 (2002)
 147. Xiang M, Gan L, Li D, Chen ZY, Zhou L, O'Malley BW Jr, Klein W, Nathans J: Essential role of POU-domain factor Brn-3c in auditory and vestibular hair cell development. *Proc Natl Acad Sci USA* 94:9445-9450 (1997)
 148. Xu PX, Adams J, Peters H, Brown MC, Heaney S, Maas R: Eya1-deficient mice lack ears and kidneys and show abnormal apoptosis of organ primordia. *Nat Genet* 23:113-117 (1999)

149. Xu PX, Woo I, Her H, Beier DR, Maas RL: Mouse Eya homologues of the *Drosophila* eyes absent gene require Pax6 for expression in lens and nasal placode. *Development* 124:219-231 (1997)
150. Yamada G, Mansouri A, Torres M, Stuart ET, Blum M, Shultz M, De Robertis EM, Gruss P: Targeted mutation of the murine gooseoid gene results in craniofacial defects and neonatal death. *Development* 121:2917-2922 (1995)
151. Zhao Y, Potter SS: Functional comparison of the Hoxa 4, Hoxa 10, and Hoxa 11 homeoboxes. *Dev Biol* 244:21-36 (2002)
152. Zannini M, Francis-Lang H, Plachov D, Di Lauro R: Pax-8, a paired domain-containing protein, binds to a sequence overlapping the recognition site of a homeodomain and activates transcription from two thyroid-specific promoters. *Mol Cell Biol* 12:4230-4241 (1992)
153. Zimmerman JE, Bui QT, Steingrimsson E, Nagle DL, Fu W, Genin A, Spinner NB, Copeland NG, Jenkins NA, Bucan M, Bonini NM: Cloning and characterization of two vertebrate homologs of the *Drosophila* eyes absent gene. *Genome Res* 7:128-141 (1997)
154. Zou D, Silvius D, Rodrigo-Blomqvist S, Enerback S, Xu PX: Eya1 regulates the growth of otic epithelium and interacts with Pax2 during the development of all sensory areas in the inner ear. *Dev Biol* 298:430-441 (2006)

Danksagung

Hiermit möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Entstehung dieser Arbeit unterstützt haben.

Mein besonderer Dank gebührt meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Walter Just für die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe im Institut für Humangenetik der Universität Ulm, sein Interesse an meiner Arbeit und seine große Unterstützung und Zuverlässigkeit während der gesamten Zeit.

Ein herzliches Dankeschön an Frau Trautmann, Marlies Miersch und Angela Schulze für das Einlernen in die Laborwelt bei sehr angenehmer Atmosphäre und die weitere Unterstützung.

Auch allen anderen Mitgliedern des Instituts für Humangenetik der Universität Ulm vielen Dank für das unkomplizierte und angenehme Arbeitsklima und die gute Zusammenarbeit.

Vielen Dank an Alexandra Süß für die Korrektur meiner Arbeit.

Vielen Dank an Jakob Völker für seine Zeit.

Lebenslauf

Elena Guillén Posteguillo

Persönliche Daten

Geburtsdatum/-ort 14.09.1981, Guardamar del Segura (Spanien)
Staatsangehörigkeit spanisch
Familienstand ledig

Schulbildung

1985-1995 Gesamtschule, Guardamar del Segura (Spanien)
1995-1999 Gymnasium, Guardamar del Segura (Spanien)

Studium

1999 - 2002 Medizin, Universität Elche (Spanien)
2002 - 2003 Medizin, Universität Göttingen (Deutschland)
2003 - 2005 Medizin, Universität Elche (Spanien)

Promotion

seit September 2005 molekulargenetische Arbeit zum Thema:
„Suche eines Kandidatengens für das Branchio-Oculo-Facial-Syndrom durch genomweites Screening“
Prof. Dr. W. Just, Institut für Humangenetik, Universität Ulm

Publikation

Kaiser R, Posteguillo EG, Müller D, Just W: Exclusion of Genes From the EYA-DACH-SIX-PAX Pathway as Candidates for Branchio-Oculo-Facial Syndrome (BOFS). Am J Med Genet A 143(18):2185-8 (2007)

Berufstätigkeit

07/2004 – 08/2004 Famulatur Kinderheilkunde, Universitäts-Kinderklinik, Leipzig
09/2006 Famulatur Allg. Chirurgie, Elisabeth Krankenhaus, Leipzig
10/2006 – 11/2006 Gastärztin, Allgemeinmedizin (Praxis), Ulm
01/2007 – 09/2007 Gastärztin, Dermatologie (Universitätsklinik), Ulm
Assistenzärztin, Innere Medizin (Kreisklinik), Laupheim

Stipendien

1999 - 2000 Ehrenmatrikulation auf Grund schulischer Leistungen
2002 - 2003 Sokrates-/Erasmusprogramm der EU

Sprachen

Spanisch Muttersprache
Katalanisch Muttersprache
Deutsch fließend
Englisch gute Kenntnisse
Französisch Grundkenntnisse

Ulm, den 23.10.2007

.....
(Elena Guillén Posteguillo)