

Aus dem Institut für Humangenetik  
(Prof. Dr. med. B. Wollnik)  
im Zentrum Hygiene und Humangenetik  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Haplotypanalyse bei Familien mit einem Kind mit CHARGE-  
Syndrom und Kandidatengenscreening *CHD8* und *FAM124B***

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von

**Nina von Velsen**

aus Ibbenbüren

Göttingen 2017

Dekan:

Prof. Dr. rer. nat. H. K. Kroemer

I. Berichterstatter:

Frau PD Dr. med. S. J. Pauli

II. Berichterstatter:

Herr PD Dr. med. M. Henneke

Tag der mündlichen Prüfung:

31.Juli 2018

## Inhalt

<b>1</b>	<b>EINLEITUNG .....</b>	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>MATERIAL UND METHODEN .....</b>	<b>6</b>
2.1	<i>Materialien .....</i>	6
2.1.1	Geräte .....	6
2.1.2	Verbrauchsmaterialien.....	7
2.1.3	Chemikalien .....	8
2.1.4	Stammlösungen, Puffer, Medien.....	10
2.1.5	Autoklavierverfahren .....	12
2.1.6	Molekulargewichtstandards .....	12
2.1.7	Bakterienstämme .....	13
2.1.8	Vektoren.....	13
2.1.9	Antibiotika .....	13
2.1.10	OYA-Platten/Ampicillin-IPTG/X-Gal-Platten.....	13
2.1.11	Mäusestämme.....	13
2.1.12	Organe und Gewebeproben.....	13
2.1.13	Synthetische Oligonukleotide .....	14
2.1.13.1	Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierung des Kandidatengens <i>CHD8</i> .....	14
2.1.13.2	Oligonukleotide für die Amplifizierung und Sequenzierung des Kandidatengens <i>FAM124B</i> .....	17
2.1.13.3	Oligonukleotide für die Haplotypanalyse im Gen <i>CHD7</i> .....	18
2.1.13.4	Oligonukleotide für die RT-PCR .....	21
2.1.13.5	Oligonukleotide für die Amplifizierung der DNA und die Yq11-PCR.....	22
2.1.14	Datenbanken und Computeranalysen .....	23
2.2	<i>Methoden .....</i>	24
2.2.1	Isolierung genomischer DNA aus peripherem Blut .....	24
2.2.2	Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren .....	24
2.2.3	Isolierung von Gesamt-RNA aus peripherem Blut (PEQLAB Total RNA Kit) ....	25
2.2.4	Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgeweben .....	25
2.2.5	Polymerase-Kettenreaktion (PCR) .....	26
2.2.6	PCR an genomischer DNA zur Abklärung aussagekräftiger Polymorphismen .	26
2.2.7	PCR an genomischer DNA nach Auffinden eines aussagekräftigen Polymorphismus.....	27

2.2.7.1	Amplifizierung mit HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase .....	28
2.2.7.2	Amplifizierung mit <i>Phusion</i> High-Fidelity DNA-Polymerase .....	28
2.2.7.3	Amplifizierung mit <i>peqGOLD Pwo</i> -DNA-Polymerase.....	29
2.2.8	A-Überhänge.....	30
2.2.9	PCR nach reverser Transkription (RT-PCR) .....	31
2.2.10	Restriktionsanalyse von DNA .....	31
2.2.11	Auftrennung von DNA in Agarosegelen .....	32
2.2.12	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen.....	32
2.2.13	Aufreinigung von PCR-Produkten .....	33
2.2.13.1	Invisorb MSB®Spin PCRapace .....	33
2.2.13.2	NucleoFast®96PCR.....	33
2.2.14	Klonierung aufgereinigter PCR-Produkte.....	34
2.2.15	Transformation von Plasmiden in <i>E. coli</i> -DH5 $\alpha$ -Zellen.....	34
2.2.16	Isolierung von Plasmid-DNA mithilfe von Minipräparation.....	35
2.2.17	Sequenzierung von PCR-Produkten.....	35
2.2.18	Aufreinigung von Sequenzierprodukten für den Megabace-Sequenzierer .....	36
2.2.19	Mikrosatellitenanalyse zur Überprüfung der Familientriplets.....	37
2.2.20	Yq11-PCR .....	39
<b>3</b>	<b>ERGEBNISSE.....</b>	<b>41</b>
3.1	<i>Patientenkollektive</i> .....	41
3.2	<i>Patientenkollektive für Kandidatengenscreening</i> .....	41
3.2.1	Kandidatengen <i>CHD8</i> .....	41
3.2.2	Kandidatengen <i>FAM124B</i> .....	43
3.3	<i>Patientenkollektiv für Haplotypanalyse</i> .....	48
3.3.1	Familien mit informativen Polymorphismen .....	49
3.3.1.1	Familien mit nicht eindeutiger Zuordnung.....	65
3.3.2	Familien mit nicht aussagekräftigem Polymorphismus .....	72
<b>4</b>	<b>DISKUSSION.....</b>	<b>75</b>
4.1	<i>CHD-Familie</i> .....	75
4.1.1	<i>CHD7</i> .....	76
4.1.2	<i>CHD8</i> .....	77
4.2	<i>FAM124B</i> .....	79
4.3	<i>FAM124B</i> -Polymorphismus im Exon 3, c.612C>T .....	80
4.4	<i>Ursachen für die Entstehung von Neumutationen</i> .....	80

---

4.5	<i>Alterseffekte</i> .....	83
4.5.1	Paternales Alter .....	83
4.5.2	Maternales Alter .....	84
<b>5</b>	<b>Literaturverzeichnis</b> .....	<b>86</b>

---

**Abkürzungsverzeichnis:**

A	Ampère
Bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CHD	<i>chromodomain-helicase-DNA binding protein</i>
del	Deletion
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
dH <sub>2</sub> O	destilliertes Wasser
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dup	Duplikation
<i>E.coli</i>	Escherichia coli
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
et al.	<i>et alii</i> (und andere)
EtOH	Ethanol
FGFR	<i>fibroblast growth factor receptor</i>
g	Gramm; Erdbeschleunigung
GAPDH	Glycerinaldehydphosphatdehydrogenase
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
IPTG	Isopropyl-beta-D-thiogalactopyranosid
k	Kilo (10 <sup>3</sup> )
Kb	Kilobasen
KHCO <sub>3</sub>	Kaliumhydrogencarbonat
l	Liter
<i>lacZ</i> -Gen	Beta Galaktosidase Lactase-kodierendes Gen von <i>E.coli</i>
LB	<i>Lysogeny broth</i>
m	Meter; Milli (10 <sup>-3</sup> )
μ	Mikro (10 <sup>-6</sup> )
M	Molar
MDTT	1-Methyl-1,4-dihydro-5H-tetrazole-5-thione

---

MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute
MLPA	<i>multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
mRNA	<i>messenger ribonucleic acid</i>
n	Nano (10 <sup>-9</sup> )
N.	Nervus
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumhydroxid
NH <sub>4</sub> Cl	Ammoniumchlorid
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	Dinatriumhydrogenphosphat
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	Natriumdihydrogenphosphat
o. g.	oben genannt
Pa	Pascal
p. c.	<i>post conceptionem</i>
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
<i>PTPN 11</i>	<i>Protein Tyrosine Phosphatase Non-Receptor Type 11</i>
RT	Raumtemperatur
RNAse	Ribonuklease
RT-PCR	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
s.	siehe
SDS	Natriumlaurylsulfat
sec	Sekunde
SE	Saline-EDTA-Puffer
Seq	Sequenzierprimer
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
S.O.C.	Medium zur Anzucht von <i>E.coli</i>
SSC	<i>standard sodium citrate</i>
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris-EDTA
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
u. a.	unter anderem

---

U	<i>unit</i> = definierte Enzymeinheit
UV	ultraviolett
ü. N.	über Nacht
V	Volt
V. a.	Verdacht auf
v. a.	vor allem
Vol	Volumen
w/v	<i>weight per volume</i>
X-Gal	5-Brom-4-Chlor-3-Indolyl-beta-D-Galaktopyranosid

### **Code der Aminosäuren**

A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asn	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin



P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

**Code der Nukleinsäuren**

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

---

**Abbildungsverzeichnis:**

<b>Abb. 1.1:</b> Struktur des <i>CHD7</i> -Gens .....	2
<b>Abb. 3.1:</b> Auszug der Yq11-PCR-Produkte.....	40
<b>Abb. 3.2:</b> <i>CHD8</i> -Screening-Auszug eines 1 %igen Agarosegels .....	42
<b>Abb. 3.3:</b> FAM124B Isoformen beim Menschen .....	43
<b>Abb. 3.4:</b> RT-PCR-Produkte von Fam124B bei der Maus .....	44
<b>Abb. 3.5:</b> Sequenzdarstellung des Produktes FAM124B Ex.3.1 .....	45
<b>Abb. 3.6:</b> Restriktionsverdau mit BsmA1.....	46
<b>Abb. 3.7:</b> Stammbaum Familie 1 .....	49
<b>Abb. 3.8:</b> Schema des <i>Mega-Priming</i> .....	50
<b>Abb. 3.9:</b> Stammbaum Familie 2 .....	52
<b>Abb. 3.10:</b> Sequenzauszug mit dem Primer SNP CHD7 E28I28F der väterlichen DNA .....	53
<b>Abb. 3.11:</b> Grafische Darstellung der Allelzuordnung in Familie 2 .....	53
<b>Abb. 3.12:</b> Stammbaum Familie 3 .....	55
<b>Abb. 3.13:</b> Stammbaum Familie 4 .....	56
<b>Abb. 3.14:</b> Stammbaum Familie 5 .....	58
<b>Abb. 3.15:</b> Stammbaum Familie 6 .....	59
<b>Abb. 3.16:</b> Stammbaum Familie 7 .....	60
<b>Abb. 3.17:</b> Stammbaum Familie 8 .....	62
<b>Abb. 3.18:</b> Stammbaum Familie 9 .....	63
<b>Abb. 3.19:</b> Stammbaum Familie 10 .....	64
<b>Abb. 3.20:</b> Stammbaum Familie 11 .....	65
<b>Abb. 3.21:</b> Stammbaum Familie 12 .....	67
<b>Abb. 3.22:</b> PCR-Produkte einer RT-PCR auf einem Agarosegel 1 % .....	69
<b>Abb. 3.23:</b> Stammbaum Familie 13 .....	70

---

**Tabellenverzeichnis:**

<b>Tab. 1.1:</b> Klinisch-diagnostische Kriterien für das CHARGE-Syndrom nach Blake et al. (1998) und Verloes (2005) .....	1
<b>Tab. 1.2:</b> Häufigkeit der verschiedenen Mutationen in Prozent bei 528 <i>CHD7</i> -positiven Patienten .....	3
<b>Tab. 3.1:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte der Patientin der Familie 1 .....	49
<b>Tab. 3.2:</b> Ergebnisse der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte der Patientin 1 .....	51
<b>Tab. 3.3:</b> Auswertung der Sequenzen der Colony-PCR-Produkte der Patientin 2 .....	54
<b>Tab. 3.4:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 3 .....	55
<b>Tab. 3.5:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 4 .....	56
<b>Tab. 3.6:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 4. Ausgangsprodukt: HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase .....	57
<b>Tab. 3.7:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 4. Ausgangsprodukt: peqGOLD Pwo-DNA-Polymerase .....	57
<b>Tab. 3.8:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 5 .....	58
<b>Tab. 3.9:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 6 .....	59
<b>Tab. 3.10:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 7 .....	60
<b>Tab. 3.11:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 7. Ausgangs-PCR-Produkt: peqGOLD Pwo-DNA-Polymerase .....	61
<b>Tab. 3.12:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 8 .....	62
<b>Tab. 3.13:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 9 .....	63
<b>Tab. 3.14:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 10 .....	64
<b>Tab. 3.15:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 11 .....	66
<b>Tab. 3.16:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des neuen PCR- Produktes des Patienten 11 .....	66
<b>Tab. 3.17:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 12 .....	67
<b>Tab. 3.18:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte mit der peqGOLD Pwo- DNA-Polymerase des Patienten 12 .....	68
<b>Tab. 3.19:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR des Patienten 13 .....	70
<b>Tab. 3.20:</b> Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des 2. PCR-Produktes des Patienten 13 .....	70
<b>Tab. 3.21:</b> Auflistung der untersuchten Polymorphismen in den übrigen 17 Familien .....	72
<b>Tab. 4.1:</b> Auswahl von autosomal dominant und X-chromosomal vererbten Krankheitsbildern .....	81

## 1 EINLEITUNG

Beim CHARGE-Syndrom handelt es sich um ein autosomal dominantes Dysmorphiesyndrom, das erstmals 1979 durch Hall und Hittner beschrieben wurde (Hall 1979, Hittner et al. 1979). Der Begriff CHARGE wurde 1981 durch Pagon et al. geprägt und stellt ein Akronym für die Hauptsymptome dieser Erkrankung dar: Kolobome (engl.: *coloboma*), Herzfehler, Atresie der Choanen, Retardierung des Wachstums und der psychomotorischen Entwicklung, Genitalhypoplasien und Ohranomalien (engl.: *ear anomalies*), insbesondere Innenohrschwerhörigkeit. Weiterhin werden zahlreiche andere Fehlbildungen wie Lippen-Kiefer-Gaumenspalten, Bogengangskanalaplasien, Fazialisparesen, tracheo-ösophageale Fisteln oder Fehlbildungen des Urogenitaltraktes bei den Patienten beobachtet (Lalani et al. 2006, Jongmans et al. 2006, Zentner et al. 2010, Bergman et al. 2011). Aufgrund dieser vielfältigen Symptome lässt sich die große Variabilität im klinischen Phänotyp erkennen, welche die klinische Diagnosestellung erschwert. Deshalb wurden die genannten Symptome in Haupt- und Nebenkriterien eingeteilt (Blake et al. 1998), die durch Verloes (2005) überarbeitet wurden (s. Tabelle 1.1).

<b>Hauptkriterien</b>	
nach Blake et al. 1998	nach Verloes 2005
Kolobome mit/ ohne Mikroophthalmie	Kolobome mit/ ohne Mikroophthalmie
Choanalatresie	Choanalatresie
Dysfunktion einzelner Hirnnerven (VII-XII)	
Charakteristische Anomalien des Innenohrs und des äußeren Ohrs	Hypoplastische Bogengänge
<b>Nebenkriterien</b>	
nach Blake et al. 1998	nach Verloes 2005
Dysmorphien des Gesichts	Dysfunktion des Rhombenzephalons (Hirnstammdysfunktion, neurosensorische Schwerhörigkeit, Lähmungen der Hirnnerven VII-XII)
Kardiovaskuläre Fehlbildungen	Anomalien des Herzens, Ösophagusfehlbildungen
Tracheo-ösophageale Fisteln	Hypothalamo-hypophysäre Fehlfunktionen
Wachstumsretardierung	Anomalien des äußeren Ohrs/ Mittelohrs

Nebenkriterien	
nach Blake et al. 1998	nach Verloes 2005
Genitalhypoplasie, verzögerte und unvollständige Pubertät	Geistige Behinderung
Lippen-Kiefer-Gaumen-Spalte	
Psychomotorische Entwicklungsretardierung	
Hypotonie	

**Tab.1.1:** Klinisch-diagnostische Kriterien für das CHARGE-Syndrom nach Blake et al. (1998) und Verloes (2005): Ein klassisches CHARGE-Syndrom liegt vor, wenn drei Hauptkriterien oder zwei Hauptkriterien mit mindestens zwei Nebenkriterien vorliegen. Wenn zwei Hauptkriterien mit einem Nebenkriterium bestehen, spricht man von einem partiellen CHARGE-Syndrom. Ein atypisches CHARGE-Syndrom liegt bei Vorhandensein von zwei Hauptkriterien oder einem Hauptkriterium mit zwei Nebenkriterien vor.

Ursächlich für das CHARGE-Syndrom sind Mutationen im *CHD7*-Gen, das auf dem Chromosom 8q12.1 lokalisiert ist (Vissers et al. 2004). Das Gen besteht aus 38 Exons und kodiert für ein 2997 Aminosäuren umfassendes Protein. Es gehört zu der Familie der CHD-Gene, welche für Proteine kodieren, die unter Energieverbrauch den Histon-DNA-Kontakt in Nukleosomen verändern und folglich eine Konformationsänderung des Chromatins bewirken können (Becker und Hörz 2002). Das *CHD7*-Gen ist gekennzeichnet durch das Vorhandensein von zwei N-terminalen Chromodomänen, einer SWI2/ SNF2-ähnlichen ATPase/ Helicase, drei konservierten Regionen (CR1-3), einer SANT-Domäne und zwei BRK-Domänen (Flaus et al. 2006) (s. Abbildung 1.1).



**Abb.1.1:** Struktur des *CHD7*-Gens: Es umfasst zwei N-terminale Chromodomänen, eine SWI2/ SNF2 ähnliche ATPase/ Helicase, drei konservierte Regionen [CR1, CR2, CR3], eine SANT-Domäne und

zwei BRK-Domänen (Flaus et al. 2006). (Abb. modifiziert nach Pauli 2010, S. 22. Die Verwendung des Bildes erfolgt mit freundlicher Genehmigung des Median-Verlags.)

Durch die Veränderungen der Chromatinstruktur können wichtige Prozesse im Organismus wie Transkriptionsregulation, DNA-Reparaturmechanismen oder die Replikation beeinflusst werden. Dabei sind die genauen Funktionen des CHD7, das ausschließlich im Zellkern nachweisbar ist (Schnetz et al. 2009), noch nicht hinreichend untersucht worden. Anhand der Domänenarchitektur und unter Berücksichtigung der Ergebnisse bei Knockout-Mäusen kann vermutet werden, dass diesem Protein eine entscheidende Bedeutung in der Entwicklung des Embryos und der Zellzyklusregulation zugeschrieben werden kann (Bosman et al. 2005, Schnetz et al. 2009). Beim Menschen wird *CHD7* bis zum 22. Tag p. c. ubiquitär exprimiert. In späteren Entwicklungsperioden findet man eine *CHD7*-Expression in Geweben, wie z. B. in Auge und Ohr, die vom CHARGE-Syndrom betroffen sind. Diese Ergebnisse beruhen auf Untersuchungen an elektiv abortierten menschlichen Embryonen (Sanlaville et al. 2006). Ein Großteil der im *CHD7*-Gen beschriebenen Mutationen sind *Nonsense*- oder *Frameshift*-Mutationen, aber auch von *Splice-site*- und *Missense*-Mutationen wird in der Literatur berichtet (vgl. Tabelle 1.2). Die Mutationen sind über den gesamten kodierenden Bereich des Gens verteilt, sodass keine sog. *hot spots* ermittelt werden können.

Mutationstyp	Frequenz ( %)
Nonsense	44
Frameshift	34
Missense	8
Splice-site	11
Inframe Deletion	<1
Deletion/ Duplikation	2
Translokation	<1

**Tab.1.2:** Häufigkeit der verschiedenen Mutationen in Prozent bei 528 *CHD7*-positiven Patienten, zusammengefasst aus verschiedenen Studien durch Janssen et al. (2012).

Bei ca. 2/3 der Patienten mit der klinischen Diagnose CHARGE-Syndrom findet sich eine Mutation im *CHD7*-Gen. Bei den Patienten ohne Mutation im kodierenden Bereich sind

Mutationen im nicht-translatierten Bereich, in regulatorischen Elementen oder in anderen bisher nicht bekannten Genen denkbar.

Aufgrund von Literaturdaten kann vermutet werden, dass CHD7 Bestandteil eines großen Chromatin-remodelling-Komplexes ist. So wurde in der Arbeitsgruppe bei der Suche nach möglichen Interaktionspartnern des CHD7-Proteins in einem *yeast two hybrid library screen* CHD8 als putativer Interaktionspartner detektiert (vgl. Batsukh et al. 2010).

*CHD8* gehört ebenfalls zur Familie der CHD-Gene und liegt auf dem Chromosom 14q11.2. Im Rahmen der Forschungsarbeit unserer Arbeitsgruppe wurde zusätzlich das Gen *FAM124B* entdeckt, welches eventuell als ein Ankerprotein zwischen CHD7 und CHD8 fungiert (Batsukh et al. 2012). Zu *FAM124B* gibt es bisher keine Publikationen über die möglichen Funktionen im Organismus.

Die Inzidenz des CHARGE-Syndroms wird derzeit auf 1: 8500 geschätzt (Issekutz et al. 2005). Die meisten Fälle treten sporadisch auf. Allerdings wird in der Literatur über einige wenige familiär auftretende Fälle berichtet. Entweder konnte dabei ein somatisches Mosaik bei einem der Elternteile gefunden werden (Jongmans et al. 2006 und 2008, Bartels et al. 2010, Janssen et al. 2012) oder es wurden Gonadenmosaiken postuliert (Lanani et al. 2006, Jongmans et al. 2008) oder ein Gonadenmosaik konnte in den Spermien des Vaters nachgewiesen werden (Pauli et al. 2009). Systematische Studien hinsichtlich der Rate an Gonadenmosaiken sind bisher beim CHARGE-Syndrom nicht durchgeführt worden. Die Rate an Gonadenmosaiken wird gegenwärtig auf ca. 3% geschätzt (Jongmans et al. 2008). Ebenfalls wird postuliert, dass das Auftreten eines CHARGE-Syndroms mit einem erhöhten väterlichen Zeugungsalter assoziiert ist (Tellier et al. 1996). Angaben, ob das mütterliche oder väterliche Allel bevorzugt von einer *CHD7*-Neumutation betroffen ist und ob *CHD7*-Mutationen mit einem erhöhten väterlichen Alter zu sehen sind, waren zum damaligen Zeitpunkt nicht möglich. Eine *CHD7*-Mutationsanalytik und somit ein molekulargenetischer Nachweis, dass es sich bei den Symptomen des Betroffenen in der Tat um ein CHARGE-Syndrom handelt, war nicht verfügbar.

Bei vielen weiteren autosomal dominant vererbten Krankheiten wie der Tuberösen Sklerose, Neurofibromatose 2, Keratitis-Ichothyosis-Taubheitssyndrom, Campomelie-Dysplasie, Ehlers-Danlos-Syndrom oder Timothy-Syndrom wurde in Einzelfällen das Vorhandensein von Gonadenmosaiken beschrieben, jedoch ist hier eine allgemein einheitliche Zuordnung zum maternalen oder paternalen Allel nicht möglich (vgl. Cameron et al. 1996, Splawski et al. 2004, Mazereeuw-Hautier et al. 2007). Bisher sind keine Erkrankungen bekannt, bei denen eine *de novo*-Mutation ausschließlich das maternale Allel betrifft.

Sollte es sich beim CHARGE-Syndrom um eine Erkrankung handeln, bei der die Mutationen in der männlichen Keimbahn entstehen, so kann im Rahmen einer weiteren Studie systematisch die Rate an Gonadenmosaikern bestimmt werden, indem bei Vätern mit einem betroffenen Kind eine Spermienanalyse durchgeführt wird.

Somit ergaben sich im Rahmen der vorliegenden Arbeit zwei verschiedene Aufgabenstellungen:

Bei 30 Patienten mit einer Mutation im *CHD7*-Gen wurde eine Haplotypbestimmung durchgeführt, um festzustellen, ob die jeweilige Neumutation beim CHARGE-Patienten maternalen oder paternalen Ursprungs ist und ob das Auftreten einer *CHD7*-Mutation mit einem erhöhten väterlichen Zeugungsalter einhergeht.

Die Kandidatengene *CHD8* und *FAM124B* wurden bei Patienten mit der klinisch gestellten Diagnose CHARGE-Syndrom, aber ohne Mutationsnachweis im *CHD7*-Gen, mithilfe einer Sequenzanalyse auf Punktmutationen untersucht.



## 2 MATERIAL UND METHODEN

Alle Chemikalien, die nachfolgend nicht gesondert aufgeführt sind, wurden von der Firma Merck (Darmstadt) bezogen. Alle molekularbiologischen Standardmethoden, die nicht dargestellt sind, wurden nach den Angaben von Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

### 2.1 Materialien

#### 2.1.1 Geräte

ABI genetic Analyzer 3130	Invitrogen, Karlsruhe
Abzug Captair® 4000NU	Erlab, Pont de L` Arche, Frankreich
Acht-Kanal-Pipette	Eppendorf, Hamburg
Bio Photometer	Eppendorf, Hamburg
Dampfdruckautoklav	Webeco, Bad Schwartau
Dispergierwerkzeug Ultraturrax T25	Schütt, Göttingen
Horizontale Mini Gel-Kammer	Medizintechnik, Universität Göttingen
Horizontales Gel-Elektrophorese-System Horizon™ 11.14	BRL Life Technologies, Inc., Gaithersburg, USA
Kühlzentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Multipipette Multipipette® plus (10-100 µl)	Eppendorf, Hamburg
Pipetman-Pipetten (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Gilson Medical Electronics, Villiers-le-Bel, Frankreich
Primus 25 advanced® Thermal Cycler	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Photogerät E.A.S.Y. RH3	Herolab, Wiesloch
PTC-100™ Thermal Cycler	MJ Research Incorporated, Alameda, USA
Rüttler IKA-Vibrax-VXR	IKA Labortechnik, Staufen

---

Sequenzierer MegaBace1000	Amersham Biosciences, Freiburg
Spannungsgerät Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia, Freiburg
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Thermomagnetrührer RCT basic	Schütt Labortechnik, Göttingen
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg
UV-Bank UVT-25 M 3022 nm	Bachofer, Reutlingen
Vortex-Genie2™	Bender & Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage 1574 A MP8-2	Sartorius, Göttingen
Wärmerüttler Clim-O-Shake®	Adolf Kühner AG, Basel, Schweiz
Wärmeschrank Heraeus 6000	Heraeus, Hamburg
Zentrifugen	Sigma Laborzentrifugen GmbH, Osterode am Harz

### 2.1.2 Verbrauchsmaterialien

96-Loch-Platte für Sephadex	Medizintechnik, Göttingen
96-Well PCR-Plate mit Rand	4titude, Berlin
96-Well PCR-Plate ohne Rand	4titude, Berlin
Adhesive Pcr Foil Seals	4titude, Berlin
Aufreinigungsplatte NucleoFast® 96PCR	Macherey-Nagel, Düren
Epi-Cup	Sarstedt, Nümbrecht
Falcon-Röhrchen	Sarstedt, Nümbrecht
Filterpipettenspitzen (10 µl, 20 µl, 100 µl, 200 µl, 1000 µl)	Kisker Biotech GmbH & Co. KG, Steinfurt
Invisorb MSB® Spin PCRapace	Invitex, Berlin

---

Millipore-MAHV-N45-Platte	Millipore, Schwalbach
Parafilm®	Ochs Laborbedarf, Bovenden/ Lenglern
Peha-soft-Handschuhe	Paul Hartmann AG, Heidenheim
Peel Seal	4titude, Berlin
Petrischalen	Greiner Bio-One International GmbH, Frickenhausen
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Quarzküvette	Omnilab-Krannich GmbH, Göttingen

### 2.1.3 Chemikalien

Agar-Agar	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Capillary Array (16 capillaries)	GE-Healthcare, München
my-Budget Universal Agarose	Bio-Budget, Krefeld
Antibiotika	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Ampuwa	Fresenius Kabi GmbH, Bad Homburg
Borsäure	Scharlau, Barcelona, Spanien
Chloroform	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen
Diethylpyrocarbonat (DEPC)	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
dNTPs (100 mM Set, PCR Grade)	Low Budget, Krefeld; Invitrogen, Karlsruhe
DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
EDTA	MP Biomedicals, Eschwege
Ethidiumbromid	Eurobio, Courtaboeuf, Frankreich
EtOH	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
ET-Mix	GE-Healthcare, München
Expand Long Template PCR System	Roche Diagnostics, Mannheim

---

Ficoll 400	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
Glycerin	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Glykogen	Invitrogen, Karlsruhe
Hefe	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase	QIAGEN GmbH, Hilden
Hot Star <i>Taq</i> Master Mix	QIAGEN GmbH, Hilden
Immolase™ DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
IPTG	Biomol GmbH, Hamburg
Isopropanol	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
LongRange PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
Long Read Matrix	GE Healthcare, München
Mega Bace 10x Running-Buffer	GE-Healthcare, München
Multiplex PCR Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
NaCl	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Orange G	Sigma-Aldrich Chemie, Taufkirchen
peqGOLD <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Pepton	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Phenol (ss)	Biomol GmbH, Hamburg
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Promega, Mannheim
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	Finnzymes, Espoo, Finnland
Platinum® <i>Taq</i> DNA-Polymerase	Invitrogen, Karlsruhe
Proteinase K	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
<i>Pwo</i> SuperYield DNA-Polymerase	Roche Diagnostics, Mannheim
QIAGEN Plasmid Kit	QIAGEN GmbH, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	QIAGEN GmbH, Hilden

---

Restriktionsenzyme	Biolabs, Beverly, USA; Invitrogen, Karlsruhe
RNAse	QIAGEN GmbH, Hilden
RNAse-freies Wasser	QIAGEN GmbH, Hilden
SDS	Serva, Heidelberg
6x Loading Dye solution	MBI Fermentas, St. Leon-Rot
Sephadex G50	Amersham Biosciences Europe GmbH, Freiburg
S.O.C.-Medium	Invitrogen, Karlsruhe
SuperScript™ II Reverse Transcriptase	Invitrogen, Karlsruhe
Synthetische Oligonukleotide	Eurofins MWG Synthesis GmbH, Ebersberg;
100 pmol/μl	QIAGEN GmbH, Hilden
Total RNA Kit	PEQLAB Biotechnologie GmbH, Erlangen
Tris	Carl Roth GmbH & Co, Karlsruhe
Trizol® RNA Total Isolation Reagent	Invitrogen, Karlsruhe
T4-DNA-Ligase	Roche Diagnostics, Mannheim
X-Gal	Biomol GmbH, Hamburg

#### 2.1.4 Stammlösungen, Puffer, Medien

DEPC-H <sub>2</sub> O	0,1 % (v/v) Diethylpyrocarbonat Inkubation für 24 h unter Rühren und anschließend Dampfdrucksterilisation
dNTP-Mix	10 mM dATP 10 mM dCTP 10 mM dGTP 10 mM dTTP
Erythrozyten-Lysepuffer	155 mM NH <sub>4</sub> Cl

---

	10 mM KHCO <sub>3</sub>
	0,1 mM EDTA
IPTG	100 mM in H <sub>2</sub> O
Ladepuffer	15 % Ficoll 400
	1 mM EDTA
	0,01 % Orange G
	10 % Glycerin
LB-Medium	1 % (w/v) Pepton
	0,5 % (w/v) Hefeextrakt
	1 % (w/v) NaCl
	pH 7,2 mit 5 M NaOH einstellen
Lysepuffer	100 mM NaCl
	100 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	100 mM EDTA
	0,2 mg/ml Proteinase K
	0,5 % SDS
PBS	130 mM NaCl
	7 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	3 mM NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> x 2H <sub>2</sub> O
Puffer P1 für Plasmidisolation	50 mM Tris/HCl (pH 8,0)
	10 mM EDTA
	100 µg/ml RNase A
Puffer P2 für Plasmidisolation	200 mM NaOH
	1 % SDS
Puffer P3 für Plasmidisolation	3 M K-Acetat-H-Acetat (pH 5,5)
TBE-Puffer (5x)	10 mM EDTA
	225 mM Tris (pH 8,3)

---

	225 mM Borsäure
TE- Puffer	10 mM Tris/HCl (pH 8) 1 mM EDTA
SE-Puffer	75 mM NaCl 1 mM EDTA (pH 8,0)
SSC (20x)	3 M NaCl 0,3 M Natriumcitrat (pH 7 mit NaOH)
Stoppmix	40 % Saccharose 0,25 % Bromphenolblau 0,25 % Xylencyanol
Waschlösung I	2 x SSC 1 % SDS
Waschlösung II	0,2 x SSC 1 % SDS
X-Gal-Stammlösung	20 mg X-Gal/ml in N,N-Dimethylformamid

### 2.1.5 Autoklavierverfahren

Vor der Nutzung von Gebrauchslösungen wurden diese für 20 min bei 120 °C und 10<sup>5</sup> Pa in einem Dampfdruckautoklaven sterilisiert. Die Gebrauchswaren wurden zunächst gewaschen und getrocknet und abschließend autoklaviert oder ü. N. bei 180 °C hitzesterilisiert.

### 2.1.6 Molekulargewichtstandards

DNA-Längenstandard (1 µg/µl)	DNA 1 Kb-Leiter (0,12-12,2 Kb) DNA 100 Bp-Leiter (Invitrogen, Karlsruhe)
------------------------------	-----------------------------------------------------------------------------

### **2.1.7 Bakterienstämme**

Zur Vermehrung von Plasmiden wurden kompetente Zellen des *E. coli*-Stammes K12 DH5 $\alpha$  (Hanahan 1985) von der Firma Invitrogen (Karlsruhe) genutzt.

### **2.1.8 Vektoren**

Als Plasmid-Vektor diente der pGEM-T Easy Vector mit einer Länge von 3 Kb von Promega (Mannheim).

### **2.1.9 Antibiotika**

Es wurde eine Arbeitslösung mit einer Endkonzentration von 100  $\mu$ g/ml angesetzt, indem das Antibiotikum Ampicillin (50 mg/ml) in H<sub>2</sub>O gelöst wurde. Diese Lösung wurde steril filtriert und konnte bei -20 °C gelagert werden.

### **2.1.10 OYA-Platten/ Ampicillin-IPTG/ X-Gal-Platten**

Zunächst wurden 10 g Pepton mit 5 g Hefe und 10 g NaCl in 1 l Wasser zur Herstellung von LB-Medium in einer Glasflasche autoklaviert. Im Anschluss wurden zu 500 ml dieser Lösung 7,5 g Agar gegeben. Nach Absinken der Temperatur auf unter 40 °C wurden 1 ml X-Gal (2 %), 1 ml Ampicillin-Arbeitslösung und 500  $\mu$ l IPTG unter die Lösung gemischt. Am Ende wurden nun Petrischalen bis zur Hälfte mit dem Gemisch bedeckt und bei 4 °C bis zu ihrer Verwendung gelagert.

### **2.1.11 Mäusestämme**

In den institutseigenen Tierställen wurden die Mäuse des Stammes 129SV gezüchtet. Bei einer Raumtemperatur von 22 °C lebten sie in einem zwölfstündigen Hell-Dunkel-Rhythmus und wurden mit einer pelletierten Zuchtdiät (Herilan, Eggersmann, Rinteln) und Wasser ad libitum versorgt.

### **2.1.12 Organe und Gewebeproben**

Für Expressionsanalysen wurden zur Isolierung von RNA Organe des Mausestammes 129SV aus dem institutseigenen Tierstall präpariert. Die Proben der untersuchten Patienten stammen von der Universitätsklinik Göttingen, auswärtigen Kliniken und Fachärzten für Humangenetik.



### 2.1.13 Synthetische Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden bei der Firma QIAGEN GmbH (Hilden) oder Eurofins MWG Synthesis GmbH (Ebersberg) bestellt. Nach der Verdünnung der Stocks mit Ampuwa (Endkonzentration: 100 pmol/ $\mu$ l) wurden die Stocklösungen bei -20 °C aufbewahrt.

#### 2.1.13.1 Oligonukleotide für die Amplifikation und Sequenzierung des Kandidatengens *CHD8*

Bezeichnung	Sequenz 5'-3'
CHD8 2F	TATGTCCGTCCTCAGATTTCT
CHD8 2R	GGAGGGTACTTCTCCAAGGTCT
CHD8 3F	TTGCATCAAGACAGATAGGATGA
CHD8 3R	GGCAACAGCAATGGACTAAGTA
CHD8 4.1F	TGAGCTTGATTCTTGAGGGATT
CHD8 4.1R	TCTTTGGCTTCTCCTCTTTCAG
CHD8 4.2F	AAGAAACGCAGGAAGAAGAGTG
CHD8 4.2R	GCAAGGAGCACTCGAGCTTA
CHD8 5F	AAGGGTCAGTCAGTGGTTTACAA
CHD8 5R	TGGCTTGGTTAGCCATAATTA
CHD8 6F	ATTCTTGGCCTTTCATAAAGCA
CHD8 6R	ACAGATGATTGTGACCAGCAAG
CHD8 7F	ATGATTTAGAGGATTGCCTTG
CHD8 7R	TGACATCCAAAGGTGCTCATT
CHD8 8F	TGAAGTTCTGCAATGTGTGGTT
CHD8 8R	AGCAACCTGGGCTACAAGACTA
CHD8 9F	ACAGTAGCCTGCCACCTTCTT
CHD8 9R	CATGTGCATTGAGGAAATCAGT
CHD8 10F	ACACCCATCGGATAGCTTCTAA

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
CHD8 10R	AAACCCACCAGCAGAAATCTAA
CHD8 11F	GGAGCAGAGAACACAGAATCAG
CHD8 11R	GGCCTTTATACTTTAATGCAAATGT
CHD8 12F	ACCTTTTGATAATGTCTCCACTCC
CHD8 12R	GCTTACATCTTATGGCCCATTC
CHD8 13F	GAATGGGCCATAAGATGTAAGC
CHD8 13R	GTACCTTGGCCGACTTTCTCTA
CHD8 14F	GTGGTGCAGTTTGTATTGCCTA
CHD8 14R	CAGGTGTTTCTGCTCACAAGTC
CHD8 15F	GTCAGAGGGATTTCTTGAATGC
CHD8 15R	ATGACAACAGATGTCTGCCTTG
CHD8 16F	TTCGCCCTCATCTTATTGATT
CHD8 16R	CCCAAATTAGGTTGGTTGAGTC
CHD8 17F	TTGTGCTGAAATTCTGTGTGTG
CHD8 17R	GGTCAAAAACCCAAGTTGAGAG
CHD8 18F	CTCCACTTCTGCTTAGCCACTT
CHD8 18R	CTGCCACCCTTAACTAAGGAAA
CHD8 19F	TTTTGTATCCTTTCCCTTGCT
CHD8 19R	TGTTTCCCTCTATCACAATGATCT
CHD8 20F	GGCATGGTTAGATATTATTCTCTTGA
CHD8 20R	AGAGATTCCGGTCTCTGTGTTT
CHD8 21F	AGTCAGCTTTACCTCTGCATTTG
CHD8 21R	GACTCCCGAAAGTAGTGTGGTC
CHD8 22F	CATGAGCAAATCAGGAAGAGAA
CHD8 22R	AACAGAACAAACTCCCTCCAAG

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
CHD8 23F	CTTGGAGGGAGTTTGTCTGTTT
CHD8 23R	CAGGGATAGATAGACCTGGGAAA
CHD8 24/25F	GACTTGATTAGCCCAGCTGAAA
CHD8 24/25R	TAAGCAAACCAATCTTCCCTCA
CHD8 26F	CCTTTGCAAGGATTCTCACTTT
CHD8 26R	GCTAAATGTTCCATCCGTGAA
CHD8 27F	TCCAGCAGCATATAAAGTAAGCA
CHD8 27R	GCTAGAGTTATTTACGGCACA
CHD8 28F	CATGCTGGATATATGTGTGGCTA
CHD8 28R	CCCTACTGGCATTACAGTCCTT
CHD8 29/30F	GCCATAGAAGGACACACACAAG
CHD8 29/30R	ATGGCTTTCAGTATAGGGACCA
CHD8 31F	TGTTGCCCTACTTTTCCTTTTG
CHD8 31R	ATGGGCTCAATGAACAGGTTAG
CHD8 32.1F	TGGTAAGCAAGATTGCAGAGTG
CHD8 32.1R	GGGAAACCAGAGGGGTAGTATC
CHD8 32.2F	ACCAACCCCACAAGACTATGAG
CHD8 32.2R	TTGAATAAAGGCCCAAAGAATG
CHD8 33F	CATTCTTTGGGCCTTTATTCAA
CHD8 33R	GGA CTCTACATGTCCAGGGATG
CHD8 34F	CTGGTAGTGATGGCACTATTGAGT
CHd8 34R	AAATTAGTTACAGCAAGGATTCCAG
CHD8 35F	AGAGGATGACCTATAGCCCACA
CHD8 35R	TCCCACTGCCTTCATCAATTA
CHD8 36F	CCCAATAATTGATGAAGGCAGT

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
CHD8 36R	TTAAATCTTGCTGGATGGGACT
CHD8 37F	GCATGAGAAAGAGAAAGCATGA
CHD8 37R	GGAATAGAGTGGTAATGCTGCAA
CHD8 38.1F	AGCTAGGACTCTGTTGGCTTTG
CHD8 38.1R	AGTCACTGGTGAAGAGGGGTAG
CHD8 38.2F	ACCATCATCCCCTCATGTAGAC
CHD8 38.2R	CAAGGGCCAGAGTAAATGAAAA

**2.1.13.2 Oligonukleotide für die Amplifizierung und Sequenzierung des Kandidatengens *FAM124B***

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
FAM124B Ex 1.1F	GCCGGTCATTTCTGTACTAAG
FAM124B Ex 1.1R	CTGTCCAGGCTGTAGAACTCCT
FAM124B Ex.1.2F	CCTTCTACACACGCTGTCTTTG
FAM124B Ex.1.2R	ATCTTGTTGCCATCGTAGTCCT
FAM124B Ex 1.3F	TTTGTTTCTTCGTGCTCTATGC
FAM124B Ex 1.3R	GAAAGGAGGCCGATTCTTTAAT
FAM124B Ex.2.1F	CCTATTAAGAATCGGCCTCCT
FAM124B Ex.2.1R	CACGGCAGCTATCATGACTAAA
FAM124B Ex.2.2F	AGCCTTCCTTTGTAACCATCCT
FAM124B Ex.2.2R	TGCTGCACACACACATTACATT
FAM124B Ex 3.1F	GCAGAGGGTGAATAAGGCATAG
FAM124B Ex 3.1R	GCTGATTCTGGGTCAGTACTCC
FAM124B Ex 3.2F	GACCTTGGTACCAGGAAGACAA
FAM124B Ex 3.2R	CAAGGAGGGTATGTGAACAAGG

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
FAM124B Ex 3.3F	TGTGTTGAATCCAGCACCTATC
FAM124B Ex 3.3R	TCAGAGTGGTGAAACCATAAACAC
FAM124B Ex1.2neuR	CTTCAGGGAGAGCTGCAGAG
FAM124B Ex1.1R Neu	AAAGTAGGGACACAGCCTTCC
FAM124B Ex1.2Fneu2	TCCTGGACTCTCTCCAGCAT
FAM124B Ex1.2Rneu2	AAACTGCAGCACCGAAGACT
FAM124B Ex 1.1gR	CACTAACTGGCCGATCTCTTG

### 2.1.13.3 Oligonukleotide für die Haplotypanalyse im Gen *CHD7*

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
CHD7 Diag Ex2.1F	GGATTATAGGCTTTGAGGGCAAAC
CHD7 Diag Ex2.2R	TGGCAATAAAAGGATTTCCCTGAT
CHD7 Diag Ex2.3R	GGGGTATCTTGGTACGGACTGATT
CHD7 Diag Ex2.4R	GGACATGCCTATAAATGGACGAGA
CHD7 Diag Ex2.5F	GTTATCCAAATATGCCCCATCCTC
CHD7 Diag Ex2.5R	TTCGATCAGACAAGTTAGCCATGTT
CHD7 Diag Ex5F	TTAATTTCAAGGCCACTGTCTTGG
CHD7 Diag Ex5R	ATGCTTCCACTGCACTTCTCAGAT
CHD7 Diag Ex6R	GCCAACAATCCTGTAAGAGTCACA
CHD7 Diag Ex9F	AAGACCCAGTTAACGAAGTCTGAGAA
CHD7 Diag Ex9R	AAACATGTATGGGTTGCCTGAATC
CHD7 Diag Ex9 Int.F	TGGTGTAGATTGAGGATGAGCTT
CHD7 Diag Ex10R	CCCAAAGACCACACCACTATGC
CHD7 Diag Ex19F	AGCATTTGTTTAGTCTGCAAACCTCT

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
CHD7 Diag Ex19R	CCCAATGCATCTTGTAAGCACTTT
CHD7 Diag Ex23F	TTTGTGCTACAGGGTCACAAAGC
CHD7 Diag Ex23R	AAAGGGAATTAAGCTCTCCAGGTC
CHD7 Diag Ex26F	AACAAGGTCCACTTGGATTCAACA
CHD7 Diag Ex25F	GCTCAGATGTTTATCGTGGGAGAG
CHD7 Diag Ex26R	ACCCTGCCAATAGATGTGAAACTG
CHD7 Diag Ex27/28F	GGGCAGATTATTACTCTTTCCTACCC
CHD7 Diag Ex31.1F	CCCTTGAATTCTCCCCAAGTAAATA
CHD7 Diag Ex32F	CAGTTTCCCTGATACTGTGGTTGTG
CHD7 Diag Ex34.1F	CAGTACTGTTTTGGCTCACTGCAA
CHD7 Diag Ex34.1R	ACTAGGGAGCCATTAAGGAGATGC
CHD7 Diag Ex34.2F	GCTTCGAGAGTCTCAGGTGGTC
CHD7 Diag Ex34.2R	CTCAGCTGTCAACACGTGCAAT
SNP CHD7 In1.1F	GCTCTGTGTCAGTGCAGACTGG
SNP CHD7 E2-I2F	CGGTCAGATGGGTGTCTACC
SNP CHD7 E2-I2R	AGGGAGATTGATGCCTGAATAA
SNP CHD7 In2Anf.F	ATGGGAATCGGACAGAGGAATA
SNP CHD7 In2Anf.R	CCTTCTGGTCCAAACTGTCCTC
SNP CHD7 In2E3NeuF	GGAGGCTGTTGTATGCAGGAGT
SNP CHD7 In3NeuR	GATTCGGATTAACCAAGGCTGAC
SNP CHD7 In4F	TACTGGGATTGTGTTTCATCCTG
SNP CHD7 In4R	GTGTAGCGCTTTCTCTTCACCT
SNP CHD7 In4NeuF	TGTTCTGTTCCATTTGCTTCTC
SNP CHD7 In4NeuR	CAACTCTGACTCTTCCTCAGCA

---

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
SNP CHD7 In7NeuF	ATCCTGGAGGAACACAGTCTGG
SNP CHD7 IN8F	GCTGCTTACTAGGGTCTCTGGA
SNP CHD7 In8R	GCAGCCTAAGGAGAAACAAAGA
SNP CHD7 I9-I11F	TTTGGCTTTTCGAACATCACTTA
SNP CHD7 I9-I11R	CACACTGCTGTCATTTACAAA
SNP CHD7 Ex9F	CCCAGTTAACGAAGTCTGAGAAG
SNP CHD7 Ex9R	AGCTAGCAAATAGCAAAGCTGAA
SNP CHD7 I12F	GCCAAATTGAGAAATTTGCTTT
SNP CHD7 I12R	GCGTACCCATTCTAGTCACACA
SNP CHD7 In12.2R	TTCCTAACAGAGCACATGCATCAA
SNP CHD7 In12.3R	ACCACTAAGCGTACCCATTCTAGTCA
SNP CHD7 In14F	ATACCCTTTTCCTTGGACTTTCC
SNP CHD7 In14R	CAGTGCATGAAGGTTGCATAAT
SNP CHD7 Ex15F	TCATACTCTCACTGGGCTTTGA
SNP CHD7 Ex15R	GCGAATGCTCCCTTCTTATTTA
SNP CHD7 Ex17R	AACCTATCAGAATCAGGTTTGGAG
SNP CHD7 I16-E18F	TCATTCAAAGACGGTGAGGAC
SNP CHD7 I16-E18R	TAAATAAATGGTTTGGGCAAGG
SNP CHD7 In21F	CTGTGGGTAACTTTAGGAATGGA
SNP CHD7 In21R	CAATTCACACTGGGTGATAGGA
SNP CHD7 Ex 22F2	ACCCAGTGTGAATTGTTGCTAGT
SNP CHD7 Ex 22R2	AGGGAATTAAGCTCTCCAGGTC
SNP CHD7 E22-I23F	GTAGGTCTCCACCATGCTGTTT
SNP CHD7 E22-I23R	GAACCCCAAGCAATGAAATAAA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
SNP CHD7 I25-E26F	TCCCTCTTAATTGGAGTGTTCAA
SNP CHD7 I25-E26R	CATCTGCTAGCATGTCTGTTCC
SNP CHD7I25E26F_N	TTTGAATGTTTGTGAGCATTG
SNP CHD7I25E26R_N	ACTGAACCCTGCCAATAGATGT
SNP CHD7 E26-I28F	AACAAACTTGTGTTGTGGCAGT
SNP CHD7 E26-I28R	GCAAATGCTCTATGCTCTATTCC
SNP CHD7 I27-E28F	AACCAGAACACCGTTCAAAGAT
SNP CHD7 I27-E28R	TTCAAATGACAGTGTGGGAAAG
SNP CHD7 E28-I28F	CACAGGTAAGGTCCCAGAAAAG
SNP CHD7 E28-I28R	TTCAAATGACAGTGTGGGAAAG
SNP CHD7 E31-I31F	GTTGGATTTGTCCAGACTCCTC
SNP CHD7 E31-I31R	GTTCCAGCTACAGCACAGTACG
SNP CHD7 I31F	TCTTCTGTGAAGGGATAATTTCAA
SNP CHD7 I31R	TAGAGACAGCTCCTGCTGAGAA
SNP CHD7 Ex32R	CACTTCAAATTTTATTGAAGCGTGT
SNP CHD7 I32-I33F	AATGAGCTTCAGTCAGCCTACC
SNP CHD7 I32-I33R	TCCAACAGAACAGAGTTGCAGT
SNP CHD7 I34F	TGAACGAAGTGTAGCTTGAGGA
SNP CHD7 I34R	CCTGCCATCTTATTAAGCTTTCTC

#### 2.1.13.4 Oligonukleotide für die RT-PCR

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
CHD7 RT Ex22-24F	AGAAACCATCTGCAGAACCATC
CHD7 RT Ex22-24R	TCACTTGAGTCAGCACCCCTCTA



<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
Fam124BHu RT-F	CCTTCTACACACGCTGTCTTTG
Fam124BHu RT-R	GGGATGAGCTATGCAACCTAAG
Fam124BMausRT-F	GGTGGCCTTCATCATAATCTTC
Fam124BMausRT-R	CCAGTCACACTCTTGCTTCTGT
GAPDHHuRT-F	CTGCACCACCAACTGCTTAG
GAPDHHuRT-R	CAGTGAGCTTCCCGTTCAG
GAPDHMuRT-F	CACCACCAACTGCTTAGCC
GAPDHMuRT-R	CGGACACATTGGGGGTAGG

#### 2.1.13.5 Oligonukleotide für die Amplifizierung der DNA und die Yq11-PCR

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
D4 S126 F Fam	GGATCCTGTCACTGTACTCCAGGC
D4 S126 R	TGCTTAACCAGTTTGACCATGAGG
D11 S874 F Fam	CCTTCACAGGGTTCATTTTTCCAGGGG
D11 S874 R	CTGGGCTGCAGCGAAGATAGTCCCTG
D11 S1328 F Fam	AAAGGCAAAGAACAGCACTAATGAGG
D11 S1328 R	AATGCTGAGCCTGCTCTTGGAAC
D17 S1290 F Fam	GCAACAGAGCAAGACTGTCC
D17 S1290 R	GACCAGGTGTCTCATAAGGG
D19 S254 F Fam	TTCTGAGCACAACCAATCCTCCAAG
D19 S254 R	GAATTGCTTGAACCTGGGAGGTGGAG
D5S208 CA Fam	ACCTGAGTGTTTCATCAATAC
D5S418 F Fam	TAGCCTTCAAAACAGGAAATGTTAC
D5S418 R Fam	GGAAACAATGATGACATCTCCAA

<b>Bezeichnung</b>	<b>Sequenz 5'-3'</b>
IVS8CA F Fam	AAATCTATCTCATGTTAATGCTGAAGA
IVS8CA R Fam	ACTAAGATATTTGCCATTATCAAGTT
IVS17bCA F Fam	TGTCACCTCTTCATACTCATATTGG
IVS17bCA R Fam	AAACTTACCGACAAGAAGAACTCTG
D21S1411 F	GATGAATGCATAGATGGATGGGTGGATG
D21S1411 R	GTGTGTCCTTCCAGGCTTTCTGCC
<b>Multi A</b>	
SYR F	GAATATTCCCGCTCTCCGGA
SYR R	GCTGGTGCTCCATTCTTGAG
SY254F	GGGTGTTACCAGAAGGCAAA
SY254R	GAACCGTATCTACCAAAGCAG
SY143F	GCAGGATGAGAAGCAGGTAG
SY143R	CCGTGTGCTGGAGACTAATC
SY255F	GTTACAGGATTCGGCCTGAT
SY255R	CTCGTCATGTGCAGCCAC

#### 2.1.14 Datenbanken und Computeranalysen

<b>Programm</b>	<b>Internetadresse</b>
Primer3	<a href="http://bioinfo.ut.ee/primer3/">http://bioinfo.ut.ee/primer3/</a>
BDGP	<a href="http://www.fruitfly.org/">http://www.fruitfly.org/</a>
<i>Blatsearch</i>	<a href="http://www.genome.ucsc.edu/">http://www.genome.ucsc.edu/</a>
<i>Ensembl</i>	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
<i>NCBI</i>	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/</a>
<i>Repeat masking</i>	<a href="http://www.repeatmasker.org">http://www.repeatmasker.org</a>
HGVS	<a href="http://www.hgvs.org/varnomen">http://www.hgvs.org/varnomen</a>

Für die Erkennung von repetitiven Sequenzen in der zu untersuchenden DNA wurde das Programm *repeat masking* verwendet. Für den Entwurf von Oligonukleotidsequenzen wurde das Programm Primer3 angewandt. Um eine hohe Spezifität der Primer zu gewährleisten, wurde der *Genome Browser* von *Blatsearch* benutzt. Die Auswirkung einer *Splice-site*-Mutation wurde mithilfe des *Splice-site prediction*-Programmes von BDGP avisiert. Jegliche Referenzsequenzen von Genen wurden auf den Webseiten von *Ensembl* und *NCBI* abgerufen.

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Isolierung genomischer DNA aus peripherem Blut

Zunächst wurden zur Lyse der Erythrozyten ca. 5 ml EDTA-Blut mit 30 ml 4 °C kaltem Erythrozyten-Lysepuffer gemischt und für 30 min auf Eis gelegt. Daraufhin erfolgte eine Zentrifugation für 15 min bei 2.000 x g, der Überstand wurde abgegossen und das entstandene Pellet in 30 ml Lysepuffer resuspendiert. Dieser Vorgang von Zentrifugation und Resuspendierung wurde mehrmals wiederholt, bis das Leukozytenpellet keine rötliche Färbung mehr durch Hämoglobin aufwies.

Im Anschluss wurde das Pellet in 5 ml SE-Puffer resuspendiert, mit 250 µl Proteinase K (10 mg/dl) versetzt, 500 µl SDS hinzugegeben und bei 55 °C im Wasserbad ü. N. verdaut. Das SDS hat die Fähigkeit, die vorhandenen Zellmembranen aufzulösen, die Proteinase K baut die zellulären Proteine ab. Am nächsten Tag wurden 1,5 ml gesättigte NaCl-Lösung hinzugegeben, für 15 sec gevortext und 15 min bei RT bei 3.000 x g zentrifugiert. Im Anschluss wurde der Überstand mit 1,3 ml Glykogen in einem neuen *Tube* vermischt, und die DNA wurde mittels 2 Volumina 100 % EtOH innerhalb von 3 h bei -20 °C ausgefällt. Das sich absetzende DNA-Knäuel wurde mit 500 µl 70 % EtOH gewaschen und nachdem das EtOH verdampft war, in 500 µl 1 x TE-Puffer gegeben.

### 2.2.2 Konzentrationsbestimmung der Nukleinsäuren

Zur Bestimmung der Nukleinsäurekonzentrationen wurde eine photometrische Messung in einem Spektralphotometer durchgeführt. Dazu wurde 1 µl der RNA- oder DNA-Probe mit 300 µl H<sub>2</sub>O verdünnt. Nach Nulleichung des Gerätes wurde die Extinktion (E) der Proben bei 260 und 320 nm gemessen. Mithilfe der Formel  $C = (E_{260} - E_{320}) \times f \times \epsilon$  wurde die Konzentration errechnet.

C= Konzentration der Probe (µg/µl)

E260= Absorption bei 260 nm

E320= Absorption bei 320 nm

f= Verdünnungsfaktor

$\epsilon$ = Absorptionskoeffizient

### 2.2.3 Isolierung von Gesamt-RNA aus peripherem Blut (PEQLAB Total RNA Kit)

Für die Isolierung von RNA aus peripherem Blut wurden ca. 7,5 ml EDTA-Blut mit ca. 42 ml Erythrozyten-Lysepuffer versetzt und für 30 min auf Eis gestellt. Im Anschluss wurden 300  $\mu$ l Lysepuffer und 150  $\mu$ l Proteinase K (1mg/dl) hinzugegeben. Nach Vortexen für 30 sec wurde die Probe für 10 min bei 70 °C inkubiert. Im Folgenden wurde der Ansatz bei 10.000 x g 3 min zentrifugiert. Nun wurde die Probe nach Überführen in die *Shredder*-Säule 1 min lang bei 12.000 x g zentrifugiert. Der Durchfluss wurde in einem neuen Epi-Cup mit 225  $\mu$ l 100 % EtOH versetzt, darauffolgend in eine Blindsäule gegeben und für 1 min bei 10.000 x g zentrifugiert. Nach Zugabe von 500  $\mu$ l Waschpuffer I und Zentrifugation für 15 sec bei 10.000 x g erfolgte die 2. Waschung mit 600  $\mu$ l Waschpuffer II. Die 2. Waschung wurde wiederholt. Wichtig bei diesen Reinigungsschritten war die Verwerfung des Durchflusses. Abschließend wurde die Säule in ein neues 2-ml-Epi-Cup gegeben und trocken zentrifugiert. In einem neuen Epi-Cup wurde die Säule mit ca. 50-100  $\mu$ l H<sub>2</sub>O versetzt und 1 min bei 5.000 x g zentrifugiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen RNA-Isolation wurden ca. 3  $\mu$ l in ein 1 %iges Testgel aufgetragen. Die gewonnene RNA wurde bei -80 °C gelagert.

### 2.2.4 Isolierung von Gesamt-RNA aus Mausgeweben

Die gewünschten Organe wurden mithilfe eines sterilen Präparierbestecks den Mäusen entnommen und nach kurzer Spülung in 1 x PBS-Puffer in einem Falcon-Röhrchen sofort in Flüssigstickstoff schockgefroren. Anschließend wurde nach der Gewichtsbestimmung zu 100 mg Gewebe 1 ml RNA-Reagenz zugegeben, mit einem Dispergierwerkzeug (Ultraturrax T25, Schütt, Göttingen) homogenisiert und 5 min auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe und Mischung mit 200  $\mu$ l Chloroform erfolgte nach erneuter Inkubation von 5 min eine Zentrifugation von 15 min bei 19.000 x g und 4 °C. Dabei entstehen drei Phasen, die untere rot gefärbte Phase enthält Proteine und weitere Zellbestandteile und Phenol-Chloroform, die Interphase und die obere wässrige Phase enthalten die gewünschte RNA. Diese obere Phase wurde in ein neues Schraubfalcon überführt, mit 500  $\mu$ l Isopropanol gemixt und für 10 min auf Eis inkubiert. Nach Zentrifugation von 10 min bei 12.000 x g und 4 °C wurde das entstandene Pellet durch Zugabe von 1 ml 75 % EtOH gewaschen und erneut bei 13.000 x g für 5 min bei 4 °C abzentrifugiert. Der gebildete Überstand wurde verworfen, das Pellet bei

56 °C für 2 min getrocknet und abschließend in 50-200 ml DEPC-H<sub>2</sub>O gelöst. Die Konzentrationsbestimmung erfolgte über die Messung der optischen Dichte (s. 2.2.2). Die erfolgreiche Isolation wurde mithilfe einer RT-PCR mit GAPDH-Primern (GAPDHMuRT-F/R) (s. 2.1.13.4, 2.2.9) getestet. Die RNA konnte bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert werden.

### 2.2.5 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Mit dieser Methode nach Mullis und Faloona (1987) lassen sich genau definierte DNA-Fragmente *in vitro* amplifizieren. Dabei kommt es durch die Abfolge von Zyklen, bestehend aus Denaturierung, Anlagerung und Verlängerung, zu einer exponentiellen Vermehrung des zu vervielfältigenden DNA-Stückes. Dieser Zuwachs kann mit folgender Gleichung beschrieben werden:

$(2^n - 2n)x$       n: Anzahl der Zyklen  
2n: Produkte des ersten und zweiten Zyklus, deren Dauer nicht definiert sind.  
x: Anzahl der Kopien der ursprünglichen DNA-Matrize.

Zur Anlagerung von Oligonukleotidprimern, die die Spezifität der Vervielfältigung des entsprechenden DNA-Stückes sichern, wird der DNA-Doppelstrang zunächst hitzedenaturiert. Die hitzestabile DNA-Polymerase kann dadurch in einer spezifischen Kettenreaktion in 5'-3'-Richtung die Einzelstränge zu Doppelsträngen auffüllen. Für die weiteren Zyklen stehen sowohl die neu synthetisierten Stränge als auch die ursprünglich eingesetzte DNA als Matrizen für den nächsten Zyklus zur Verfügung. Allerdings muss bedacht werden, dass mit zunehmender Zykluszahl die Effizienz der DNA-Polymerase abnimmt, da einerseits die z. T. hohen Temperaturen, die notwendig für die Denaturierung der DNA sind, und andererseits das im Reaktionsverlauf zunehmende saure Milieu auf das Enzym schädigend wirken.

Für sämtliche PCR-Reaktionen standen die Thermocycler Primus 25 advanced® oder PTC-100™ Thermal Cycler zur Verfügung.

### 2.2.6 PCR an genomischer DNA zur Abklärung aussagekräftiger Polymorphismen

Zur Vervielfältigung spezifischer Sequenzen genomischer DNA wurde diese, wie oben beschrieben, aus Lymphozyten extrahiert (s. 2.2.1). Es wurde folgender Reaktionsansatz durchgeführt (25 µl):

Template-DNA (300-500 ng)	0,8 µl
<i>Taq</i> -Immolase	0,2 µl
Primer F (10 pmol/µl)	0,5 µl
Primer R (10 pmol/µl)	0,5 µl
Puffer	2,5 µl
MgCl <sub>2</sub>	0,75 µl
dNTP	0,5 µl

ad H<sub>2</sub>O bis 25 µl

Nach der Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragments und der spezifischen Anlagerungstemperatur der eingesetzten Primer wurden die Zyklustemperaturen und Zeitintervalle der *Touch down*-PCR verändert.

Programm:	95 °C	7 min	
	94 °C	30 sec	} 5 <i>Touch-Down</i> -Zyklen
	65 °C-60 °C	1 min	
	72 °C	1 min	
	94 °C	30 sec	
	60 °C	1 min	} 33 Zyklen
	72 °C	1 min	
	72 °C	5 min	

### 2.2.7 PCR an genomischer DNA nach Auffinden eines aussagekräftigen Polymorphismus

Für die Amplifizierung der spezifischen Sequenz wurden unterschiedliche Polymerasen getestet:

- *Pfu* DNA-Polymerase
- LongRange PCR Kit
- *Pwo* SuperYield DNA-Polymerase
- Expand Long Template PCR System

- HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase
- Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase
- peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase

Für die Haplotypbestimmung konnten im weiteren Verlauf jedoch nur die Phusion High-Fidelity-, HotStar HiFidelity- oder peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerasen genutzt werden. Diese besitzen eine sog. *Proofreading*-Aktivität, welche für die Haplotypanalyse von entscheidender Bedeutung ist.

### 2.2.7.1 Amplifizierung mit HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase

Die Amplifizierung der spezifischen Sequenzen erfolgte nach folgendem Reaktionsansatz (25  $\mu$ l):

DNA-Template	0,5 $\mu$ l
HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase	0,5 $\mu$ l
Primer F	2,5 $\mu$ l
Primer R	2,5 $\mu$ l
Puffer (enthält dNTPs)	5 $\mu$ l
RNAse freies Wasser	14 $\mu$ l

Programm:	95 °C	5 min	} 35 Zyklen
	94 °C	15 sec	
	59 °C	1 min	
	72 °C	2 min	
	72 °C	10 min	

### 2.2.7.2 Amplifizierung mit Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase:

Ansatz: 20  $\mu$ l

H <sub>2</sub> O	12,4 $\mu$ l
------------------	--------------

Puffer	4 $\mu$ l
Primer F	1 $\mu$ l
Primer R	1 $\mu$ l
dNTPs	0,4 $\mu$ l
Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase	0,2 $\mu$ l
DNA-Template	1 $\mu$ l

Programm:	95 °C	10 min	
	95 °C	1 min	} 5 <i>Touch-Down</i> -Zyklen
	63 °C-58 °C	1 min	
	72 °C	2 min	
	95 °C	1 min	} 30 Zyklen
	58 °C	1 min	
	72 °C	2 min	
	72 °C	10 min	

### 2.2.7.3 Amplifizierung mit peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase:

Ansatz: 50  $\mu$ l

#### Master Mix 1

dNTPs	4 $\mu$ l
Primer F	1,5 $\mu$ l
Primer R	1,5 $\mu$ l
DNA-Template	1 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	17 $\mu$ l



Master Mix 2

10 x Puffer	5 $\mu$ l
peqGOLD <i>Pwo</i> -DNA-Polymerase	3 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	17 $\mu$ l

Bei wenigen Primerpaaren musste die MgSO<sub>4</sub>-Konzentration im Puffer erhöht werden.

Programm:	94 °C	2 min	} 33 Zyklen
	94 °C	15 sec	
	58 °C	30 min	
	68 °C	1,5- 2 min	
	68 °C	7 min	

**2.2.8 A-Überhänge**

Für die Ligation in den Vektor pGEM-T Easy ist ein Desoxyadenosin-Überhang an dem entsprechenden Insert notwendig. Da die Phusion High-Fidelity DNA-Polymerase und die peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase keine Überhänge synthetisieren, war es notwendig, A-Überhänge an die PCR-Produkte in einem weiteren Schritt zu generieren. Das Anhängen des Desoxyadenosin-Überhanges erfolgte nach folgendem Reaktionsansatz (10  $\mu$ l):

- 7  $\mu$ l aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1  $\mu$ l Platinum® *Taq* DNA-Polymerase (5 U/ $\mu$ l)
- 1  $\mu$ l 10 x Puffer (15 mM MgCl<sub>2</sub>)
- 1  $\mu$ l dATP (2 mM)

Nach einer 30 min lang andauernden Inkubation bei 70 °C stand das jeweilige PCR-Produkt für die Ligation zur Verfügung.

### 2.2.9 PCR nach reverser Transkription (RT-PCR)

Für die cDNA-Synthese diente die aus humanem oder murinem Gewebe extrahierte mRNA als Matrize für die Reverse Transkriptase. Hierfür wurde die SuperScript™ II Reverse Transcriptase (Invitrogen, Karlsruhe) angewandt. Die RT-PCR ermöglicht eine Aussage über die Expression der RNA in dem untersuchten Gewebe, doch lassen sich keine Aussagen über die mögliche Transkriptgröße machen.

Für die Erststrangsynthese wurde ca. 1 ng-5 µg mRNA eingesetzt. 1 ml Oligo (dT)<sub>12-18</sub> Primer (500 mg/ml) und 1 µl dNTP-Mix (10 mmol/l) wurden zu der mRNA hinzugegeben. Für ein gewünschtes Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes von 13 µl wurde entsprechend destilliertes RNase-freies Wasser hinzugesetzt. Nach einer Hitzedenaturierung der RNA von 5 min bei 65 °C wurden 4 µl 5 x *First-Strand Buffer* und 2 µl 0,1 MDTT dem Reaktionsgemisch auf Eis zugegeben. Nach 2 min Inkubation bei 42 °C wurde die SuperScript™ II Reverse Transcriptase beigemischt und dieser Reaktionsansatz für 50 min bei 42 °C inkubiert. Abschließend erfolgte die Inaktivierung des Enzyms für 15 min bei 70 °C.

Die Intaktheit der cDNA wurde in einer nachfolgenden PCR mithilfe der Primer GAPDHHuRT-F und GAPDHHuRT-R (s. 2.1.13.4) für das Haushaltsgen Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase kontrolliert.

### 2.2.10 Restriktionsanalyse von DNA

Restriktionsendonukleasen besitzen die Fähigkeit, spezifisch an bestimmte Nukleotidsequenzen der DNA, in der Regel Palindrome, zu binden. Sie enthalten drei Untereinheiten: die S-Untereinheit für die Erkennung der DNA-Sequenz, die M-Untereinheit für die Methylierung und die R-Sequenz für das Schneiden der DNA.

Für optimale Reaktionsbedingungen ist die Zugabe eines auf das jeweilige Restriktionsenzym abgestimmten Puffers notwendig.

Folgender Reaktionsansatz wurde verwendet (10 µl):

8 µl PCR-Produkt (~ 0,2-1 µg)

1 µl 10x Reaktionspuffer (10 U/µl)

1 µl Restriktionsenzym

Der Ansatz wurde je nach Restriktionsenzym bei 37 °C in einem Thermocycler für 2-3 oder 4-6 h inkubiert. Im Anschluss wurde der Reaktionsansatz für die Analyse komplett auf ein

3%iges Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und das Gel wurde photographiert.

### **2.2.11 Auftrennung von DNA in Agarosegelen**

Agarose gehört zu den Polysacchariden aus D-Galaktose und 3,6-Anhydro-L-Galaktose, welche über Glycosidbindungen miteinander vernetzt sind. Die Agarosegel-Elektrophorese in einer Horizontalkammer wurde zur Auftrennung und Identifizierung von PCR-Produkten genutzt. Dabei wurden Gele mit 1%iger Agarose verwendet. Durch eine höhere Konzentration an Agarose ist die Herstellung eines Netzwerkes mit kleineren Poren im Vergleich zu einem Gel mit niedrigerer Konzentration an Agarose und entsprechend größeren Poren möglich. Die Auftrennung eines Gemisches von mehreren DNA-Fragmenten in einem elektrischen Feld basiert auf der negativen Nettoladung der DNA, welche unabhängig von ihrer Größe konstant ist. Über einen Vergleich mit Nukleinsäurefragmenten bekannter Größe kann die Größe der DNA-Fragmente erfasst werden.

Es wurde eine entsprechende Menge Agarose, abhängig sowohl von dem benötigten Volumen als auch der gewünschten Agarosekonzentration, in 0,5 % TBE-Puffer für 2-3 min in der Mikrowelle gelöst und emulgiert. Um die DNA-Banden im Agarosegel sichtbar zu machen, erfolgte nun die Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration 0,5 µg/ml). Anschließend wurde der Ansatz in einen Gelträger gegossen und ein Plastikkamm für die Geltaschen hineingesteckt. Sobald das Gel erhärtet war und eine milchig getrübbte Farbe aufwies, wurde es in eine Gelkammer mit TBE-Laufpuffer gegeben. Die Proben wurden nach dem Zusatz von einem Ladepuffer, der zur Erhöhung der Dichte der Proben führt, in die einzelnen Taschen pipettiert.

In eine Geltasche wurde ein Größenmarker gegeben, um die Bandengröße der jeweiligen DNA-Fragmente verifizieren zu können. Unter einer angelegten Spannung von 80-120 V erfolgte die Auftrennung der DNA. Ein Transilluminator diente zur photographischen Dokumentation der Auftrennung: Mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffes Ethidiumbromid, der in die DNA interkalierte, konnten die DNA-Fragmente nun mithilfe des Transilluminators unter UV-Licht bei 302 nm sichtbar gemacht werden.

### **2.2.12 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen**

Da die DNA sehr empfindlich auf UV-Licht reagiert, wurde die gewünschte DNA-Bande zügig unter UV-Licht aus dem Agarosegel herausgeschnitten und mithilfe des QIAquick Gel Extraction Kit aus dem Gel isoliert. Nach Protokoll des Herstellers wurde das entsprechende Gelstück eines 1%igen Agarosegels zunächst mit 3 Volumen QG-Puffer in einem 2-ml-

Röhrchen versetzt. Zur vollständigen Auflösung des Gelstückes wurde es für 10 min bei 50 °C geschüttelt. Im Anschluss erfolgte die Überführung in eine Säule, die eine Silica-Membran enthält. Nach zweimaliger Zentrifugation für jeweils 1 min bei 15.000 x g wurde das Pellet in 750 µl Waschpuffer (PE-Puffer) resuspendiert, bei RT 2-5 min inkubiert und erneut zweimal für jeweils 1 min bei 15.000 x g zentrifugiert. Die DNA wurde mit 30 µl dH<sub>2</sub>O eluiert und abschließend bei 15.000 x g für 1 min zentrifugiert. Zur Kontrolle der erfolgreichen Gelextraktion wurden 2 µl der gelösten DNA mit 2 µl Ladepuffer auf ein 1 %iges Agarosegel aufgetragen, elektrophoretisch aufgetrennt und photometrisch dokumentiert.

### **2.2.13 Aufreinigung von PCR-Produkten**

Zur Reinigung der entstandenen PCR-Produkte von überschüssigen Primern, Salzen und dNTPs wurden verschiedenen Aufreinigungsmethoden genutzt, abhängig von der Anzahl der Proben.

#### **2.2.13.1 Invisorb MSB®Spin PCRapace**

Hierfür wurde die Probe mit ca. 250 µl Bindungspuffer versetzt und anschließend in eine Säule überführt. Nach Zentrifugation von 3 min bei 13.400 x g wurde die Säule in ein neues 1,5-ml-Epi-Cup überführt. Darauf wurden, abhängig von der Produktstärke, 30-50 µl dH<sub>2</sub>O gegeben. Zur Lösung der PCR-Produkte aus der Membran wurde das Epi-Cup nach einer Inkubation von 1 min bei RT abschließend 1 min bei 9.300 x g zentrifugiert.

#### **2.2.13.2 NucleoFast®96PCR**

Die PCR-Produkte wurden mit 100 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und auf eine Nucleo-Fast-Platte pipettiert. Nach der Zugabe von weiteren 100 µl H<sub>2</sub>O erfolgte eine Zentrifugation von 15 min bei 1.000 x g. Der Durchlauf in der Auffangplatte wurde verworfen, und nach erneuter Zugabe von 100 µl H<sub>2</sub>O wurde die Platte 20 min bei 1.000 x g zentrifugiert. Abhängig von der Produktstärke im zuvor gelaufenen Agarosegel wurden zu den Proben jeweils 30-50 µl H<sub>2</sub>O zugegeben und in eine neue 96-Well PCR-Platte überführt. Mit einer Folie verschlossen wurden die Proben bei -20 °C gelagert.

#### 2.2.14 Klonierung aufgereinigter PCR-Produkte

Für die Ligation der PCR-Produkte wurde der Vektor pGEM-T Easy (Promega, Mannheim) genutzt. Dieser Vektor enthält an seinen Insertionsstellen ein 3' überhängendes Thymin. Für eine Thymin-Adenosin-Ligation ist es notwendig, dass das Insert an seinem 3'-Ende zusätzlich ein Desoxyadenosin während der Elongationszyklen der PCR bekommen hat. Falls die in der PCR genutzte Polymerase nicht diese Eigenschaft besitzt, musste nachfolgend ein A-Überhang erfolgen (s. 2.2.8).

Der folgende Ligationsansatz (10 µl) wurde nach Herstellerangaben verwendet:

3 µl Insert-DNA

5 µl 2 x Puffer

1 µl Vektor-DNA

1 µl T4-DNA-Ligase

Die Inkubation erfolgte ü. N. bei 4 °C. Das Enzym T4-DNA-Ligase katalysiert hierbei unter ATP-Verbrauch die Ausbildung von Phosphodiesterbindungen, sodass die DNA-Fragmente kovalent an den Vektor gebunden werden können.

#### 2.2.15 Transformation von Plasmiden in *E. coli*-DH5α-Zellen

Für die ausreichende Vermehrung wurden die DNA-Insert enthaltenden Vektoren in DH5α-Zellen transformiert. Dazu wurde der Ligationsansatz zu einem Aliquot kompetenter Zellen von 50 µl zugegeben und 30 min lang auf Eis inkubiert. Nach einer Hitzeschockerwärmung bei 37 °C für 35 sec wurde nach einer 5 min dauernden Inkubation auf Eis 200 µl S.O.C.-Medium hinzugegeben und bei 37 °C für mindestens eine Stunde geschüttelt. Danach erfolgte die Ausplattierung auf OYA-Selektions-Platten. Diese beimpften Platten wurden ü. N. bei 37 °C in einem Wärmeschrank inkubiert. Durch eine Blau-Weiß-Selektion konnten am nächsten Tag einzelne Bakterienkolonien gepickt werden. Jene gewünschte Selektion beruht darauf, dass das sog. *lacZ'*-Gen in der Klonierungsstelle des Vektors liegt und durch die Insertion des DNA-Fragments unterbrochen wird. Dieses *lacZ'*-Gen kodiert für das α-Fragment der β-Galactosidase, die nur ihre Galactosidaseaktivität ausüben kann, wenn das ω-Fragment durch den Bakterienstamm exprimiert wird. Folglich färben sich die Bakterienkolonien ohne Insertion des DNA-Fragments nach der Inkubation mit IPTG und X-Gal blau, während diejenigen, die das Insert eingebaut haben, weiß bleiben und gepickt

werden. Die Bakterienkolonien wurden entweder zum Animpfen von Minipräparationsansätzen genutzt oder direkt in einer PCR amplifiziert.

### **2.2.16 Isolierung von Plasmid-DNA mithilfe von Minipräparation**

Für die Präparation wurde das QIAGEN Plasmid Kit verwendet. Nach dem Protokoll des Herstellers wurden hierfür in einem 14-ml-Falcon-Röhrchen 5 ml LB-Medium zunächst mit einem Selektivantibiotikum, z. B. Ampicillin, versetzt und anschließend mit einer einzelnen Bakterienkolonie beimpft. Dieser Ansatz wurde ü. N. bei 37 °C in einem Rüttel-Inkubator angezüchtet. Am folgenden Tag wurden zu jeweils 800 µl der einzelnen Bakteriensuspensionen 500 µl 80 % Glycerin zur Herstellung von Glycerinkulturen hinzugegeben und bei -80 °C gelagert. Der verbliebene Rest der Kultur wurde für 10 min bei 4.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Nach dem Verwerfen des Überstandes wurde das entstandene Pellet in 200 µl Puffer P1 resuspendiert und in ein neues Epi-Cup überführt. Durch die Zugabe von 200 µl Puffer P2 wurde die Bakterienkultur bei RT 5 min lang alkalisch lysiert und abschließend durch Hinzugabe von 200 µl Puffer P3 neutralisiert. Nach Zentrifugation von 10 min bei 13.000 x g und RT war die Plasmid-DNA im Überstand gelöst. Das entstandene Pellet enthielt präzipitierte Zellproteine, Membranbestandteile und die genomische Bakterien-DNA.

Der Überstand wurde in ein neues Epi-Cup überführt und zur vollständigen Entfernung von Protein- und Zellresten nochmal bei 13.000 x g und RT für 10 min zentrifugiert. Die Plasmid-DNA wurde danach in einem neuen Epi-Cup durch die Zugabe von 100 µl 100 % EtOH und einer Inkubationszeit von 5-10 min und abschließender Zentrifugation von 30 min bei 13.000 x g und 4 °C ausgefällt. Das entstandene Pellet wurde nachfolgend zweimal mit 200 µl 70 % EtOH gewaschen und für 5 min bei 13.000 x g und 4 °C zentrifugiert. Im Anschluss wurde das Pellet bei RT getrocknet, in 30 µl dH<sub>2</sub>O gelöst und bei -20 °C gelagert.

### **2.2.17 Sequenzierung von PCR-Produkten**

Die DNA-Sequenzierung wurde nach dem Kettenabbruchverfahren nach Sanger et al. (1977) durchgeführt. Bei dieser Methode handelt es sich um die Analyse der primären, linearen Basenzusammensetzung der DNA.

In einer zyklischen Reaktion aus Denaturierung, Primer-Anlagerung und Elongation kann die DNA-Polymerase einen komplementären DNA-Strang bilden, beginnend am Ende eines eingesetzten Oligonukleotidprimers. Neben den vier dNTPs, der *Taq*-Polymerase und einem Reaktionspuffer sind in dem verwendeten DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit

auch mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierte ddNTPs enthalten, bei denen jedes ddNTP einen für die jeweilige Base spezifischen terminalen Fluoreszenzfarbstoff trägt. Sobald diese ddNTPs in den neu entstehenden DNA-Strang eingebaut werden, erfolgt ein Abbruch der Synthese und es entstehen unterschiedliche große DNA-Fragmente nach dem Zufallsprinzip.

Werden nun diese Fluoreszenzfarbstoffe angeregt (z. B. durch einen Argon-Laser), emittiert jedes der ddNTPs eine Fluoreszenz-charakteristische Wellenlänge, sodass eine Unterscheidung zwischen den vier Bausteinen (ddATP, ddCTP, ddGTP und ddTTP) möglich ist. Nach elektrophoretischer Auftrennung in einer hochauflösenden Matrix werden die unterschiedlich langen Sequenzierprodukte durch Fluorographie sichtbar gemacht und ein Rückschluss auf die Sequenz ist möglich.

Für die beschriebene Sequenzier-Reaktion wurden zu 5 µl des aufgereinigten PCR-Produktes 1 µl Primer (10 pmol/µl) und 4 µl DYEnamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Mix gegeben. In diesem Mix waren dNTPs, fluoreszenzmarkierte dNTPs, Ampli-*taq*-Polymerase und Reaktionspuffer enthalten.

Die Proben wurden entsprechend des nachfolgenden Programmes mit 25 Zyklen in Thermocyclern amplifiziert:

Vordenaturierung	2 min	94 °C	
Denaturierung	20 sec	94 °C	} 25 Zyklen
Annealing	20 sec	60 °C	
Elongation	2 min	60 °C	
Aufbewahrung		4 °C	

Nach Zugabe von 10 µl H<sub>2</sub>O erfolgte nach der Aufreinigung auf einer Sephadex-Säule die Sequenzanalyse im Sequenzierer MegaBace1000.

### 2.2.18 Aufreinigung von Sequenzierprodukten für den Megabace-Sequenzierer

Die Sequenzierprodukte unterlagen einer Aufreinigung, da die Salzkonzentration in den Proben minimiert werden musste. Die Salzionen würden sonst mit der DNA konkurrieren und aufgrund ihrer höheren Mobilität eher in die Kapillaren gelangen. Außerdem war mit der Aufreinigung auch sichergestellt, dass überschüssige dNTPs eliminiert wurden, welche die Emission der Fluoreszenzfarbstoffe verfälschen würden.

Hierfür wurden zunächst die DNA-Fragmente abzentrifugiert, sodass die Salze und kleineren Moleküle in der Sephadex-Säule verblieben. Zeitgleich wurden die Näpfe einer Millipore-MAHV-N45-Platte mit 4 g Sephadex-G-50-Pulver beschichtet. Nach Hinzugabe von 300 µl dH<sub>2</sub>O quillte das Sephadex-Pulver, eingepackt in eine luftdicht verschlossene Plastiktüte, wahlweise über 3 h bei RT oder ü. N. im Kühlschrank.

Anschließend wurden die Sequenzierprodukte nach erneuter Zugabe von 100 µl dH<sub>2</sub>O 5 min bei 910 x g abzentrifugiert. Nun konnten diese mit einer Mehrkanalpipette auf das Sephadex aufgetragen werden und bei einer Zentrifugation von 5 min bei 910 x g in eine 0,2 ml-96-Well PCR-Platte filtriert werden. Das Filtrat wurde entweder sofort in den Sequenzierer MegaBace1000 überführt oder bei -20 °C gelagert.

### 2.2.19 Mikrosatellitenanalyse zur Überprüfung der Familientriplets

Es wurde eine sog. Mikrosatellitenanalyse durchgeführt, um zu überprüfen, ob die jeweilige kindliche DNA-Probe zu den entsprechend elterlichen DNA-Proben gehört, d. h. es wurde eine Verwechslung der Proben vor Beginn der Untersuchungen überprüft. Die DNA der aussagekräftigen Familientriplets wurden hierfür nach folgendem Reaktionsansatz mit dem Hot Star *Taq* Master Mix vervielfältigt (25 µl):

Für Primer: D4S126 F Fam, D4S126 R, D11 S874 F Fam, D11 S874 R, D11 S1328 F Fam, D11 S1328 R, D17 S1290 F Fam, D17 S1290 R, D19 S254 F Fam, D19 S254 R (s. 2.1.13.5)

H <sub>2</sub> O	9,5 µl
Primer F (10 µM)	1 µl
Primer R (10µM)	1 µl
Polymerase	12,5 µl
Template	1 µl

PCR-Programm:	95 °C	15 min	
	95 °C	30 sec	} 30 Zyklen
	61 °C	30 sec	
	72 °C	30 sec	



72 °C                      5 min

Für Primer D5S208 CA Fam, D5S418 F Fam, D5S418 R Fam, IVS8CA F Fam, IVS8CA R Fam, IVS17bCA F Fam, IVS17bCA R Fam, D21S1411 F, D21S1411 R (s. 2.1.13.5).

PCR-Programm:	95 °C	15 min	
	95 °C	30 sec	} 5 <i>Touch-Down</i> -Zyklen
	63 °C-58 °C	1 min	
	72 °C	1 min	
	95 °C	30 sec	} 33 Zyklen
	58 °C	1 min	
	72 °C	1 min	
	72 °C	5 min	

Im Anschluss wurden je 5 µl der entstandenen PCR-Produkte mit 5 µl Ladepuffer zur Kontrolle in ein 1 %iges Agarosegel in 0,5 x TBE gegeben.

Anschließend wurde von den Proben je nach Stärke des PCR-Produktes auf dem Agarosegel eine Verdünnung hergestellt.

Daraufhin wurde für die Analyse der Fragmentlängen der PCR-Produkte mithilfe des ABI genetic Analyzer 3130 folgender Reaktionsansatz geschaffen (10,15 µl Ansatz):

1 µl Template

9 µl HiDi-Formamid (hochdeionisiertes Formamid)

0,15 µl Standard GeneScan-500 ROX

Zum Schluss wurden die Fragmentgrößen mithilfe der Software *Gene Mapper Version 4.0* (Applied Biosystems, Foster City, USA) mit dem Standard verglichen.

### 2.2.20 Yq11-PCR

Die DNA, die vom jeweiligen Vater des betroffenen Kindes stammen sollte, wurde mit einer Multiplex-PCR vervielfältigt. Hierbei wurden eine weibliche und eine sog. Null-Kontrolle mitgeführt. Dafür wurden Primer benutzt, die die Gene des Azoospermiebereichs b und c eingrenzen. Die Primer wurden dafür zum Multimix A mit 10 µl Stammlösung je Primer mit 500 µl H<sub>2</sub>O gemixt. Die Reaktion erfolgte nach diesem Ansatz (25 µl):

Multiplex PCR Kit 12,5 µl

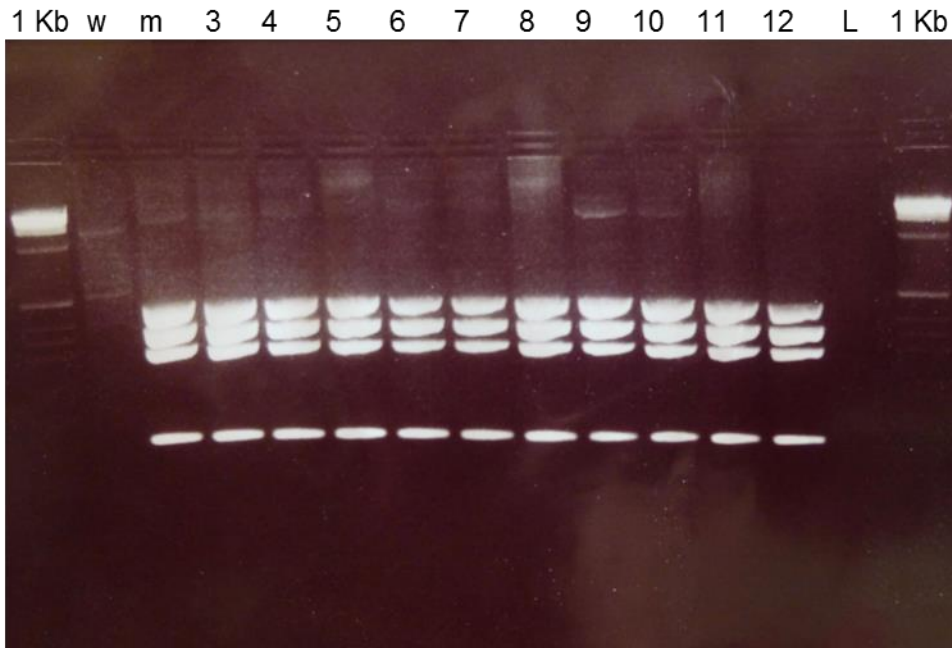
Multimix A 2,5 µl

Template 1,0 µl

H<sub>2</sub>O 9 µl

PCR-Programm:	95 °C	15 min	
	97 °C	30 sec	} 30 Zyklen
	60 °C	1 min	
	72 °C	1 min	
	72 °C	5 min	

Im Anschluss erfolgte die Auftrennung der PCR-Produkte auf einem 2%igen Agarosegel. Über die Fotodokumentation erfolgte die Auswertung, wie beispielhaft Abbildung 3.1 zeigt. Die weibliche Kontrolle zeigt keine Bande, weil der sog. Azoospermiefaktor auf dem y-Chromosom lokalisiert ist. Die männliche Nullkontrolle zeigt das Vorhandensein der PCR-Produkte des Azoospermiebereichs b und c an. Die nachfolgend aufgetragenen PCR-Produkte [3-12] zeigen auch das Vorhandensein des Azoospermiebereichs b und c, sodass bewiesen wurde, dass die jeweilige Probe vom männlichen Elternteil des betroffenen Kindes stammt.



**Abb. 3.1:** Auszug der Yq11-PCR-Produkte: [w] weibliche Kontrolle, [m] männliche Nullkontrolle, [L] Negativkontrolle, [3-12] PCR-Produkte des jeweiligen Vaters des betroffenen Kindes. Die männliche Nullkontrolle [m] zeigt das Vorhandensein der PCR-Produkte des Azoospermiebereichs b und c an. Die PCR-Produkte [3-12] zeigen, dass die jeweilige Probe männlichen Ursprungs ist. Die weibliche Kontrolle [w] zeigt keine Bande, da der sog. Azoospermiefaktor auf dem y-Chromosom lokalisiert ist.

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Patientenkollektive

Die Proben der untersuchten Patienten stammen von der Universitätsklinik Göttingen, auswärtigen Kliniken und Praxen sowie Fachärzten für Humangenetik. Sowohl für das Kandidatenscreening als auch für die Haplotypanalyse liegen genehmigte Ethikanträge vor (Antrags-Nr.: 22/02/09 und 15/04/09).

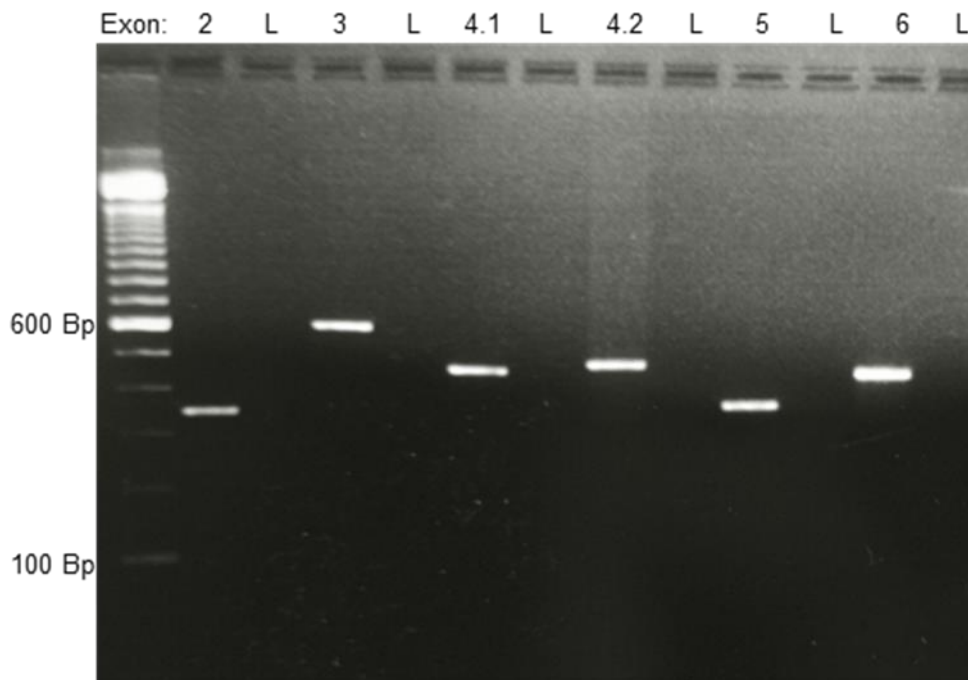
Für die Beschreibung der Mutationen und der Polymorphismen wurde die Schreibweise nach Den Dunnen und Antonarakis (2000) verwendet und die aktuellen Leitlinien der HGVS (s. 2.1.14) berücksichtigt.

#### 3.2 Patientenkollektive für Kandidatengenscreening

Im Rahmen dieser Arbeit wurden 25 Patienten mit der klinischen Verdachtsdiagnose eines CHARGE-Syndroms molekulargenetisch untersucht. Im Vorfeld wurde bei diesen Patienten molekulargenetisch durch Sequenzierung und Deletionsanalyse mittels MLPA eine Mutation im *CHD7*-Gen ausgeschlossen.

##### 3.2.1 Kandidatengen *CHD8*

Es konnte von unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass *CHD8* ein Interaktionspartner von *CHD7* ist. Da Interaktionspartner des *CHD7*-Proteins im mutierten Zustand möglicherweise an der Pathogenese des CHARGE-Syndroms beteiligt sind, wurden 25 *CHD7*-negative CHARGE-Patienten auf Mutationen im *CHD8*-Gen untersucht. Für die Etablierung der *CHD8*-Diagnostik wurden für den kodierenden Bereich des *CHD8*-Gens 38 Primerpaare erstellt (s. 2.1.13.1). Für größere Exons wie Exon 4, 32 und 38 mussten dabei 2 Primerpaare hergestellt werden. Eng zusammenliegende Exons wie z. B. Exon 24 und 25 oder 29 und 30 konnten in einem Produkt zusammengefasst werden. Die aus Lymphozyten gewonnene DNA wurde mit *Immolase* in einem Touchdown-60 °C-Programm amplifiziert (s. 2.2.6). Nach der Aufreinigung auf Nucleo-Fast-Platten (s. 2.2.13.2) erfolgte die Sequenz-PCR und danach die Sequenzierung der PCR-Produkte (s. 2.2.17, 2.2.18). Die Abbildung 3.2 zeigt exemplarisch PCR-Produkte des *CHD8*-Screenings auf einem 1 %igem Agarosegel.

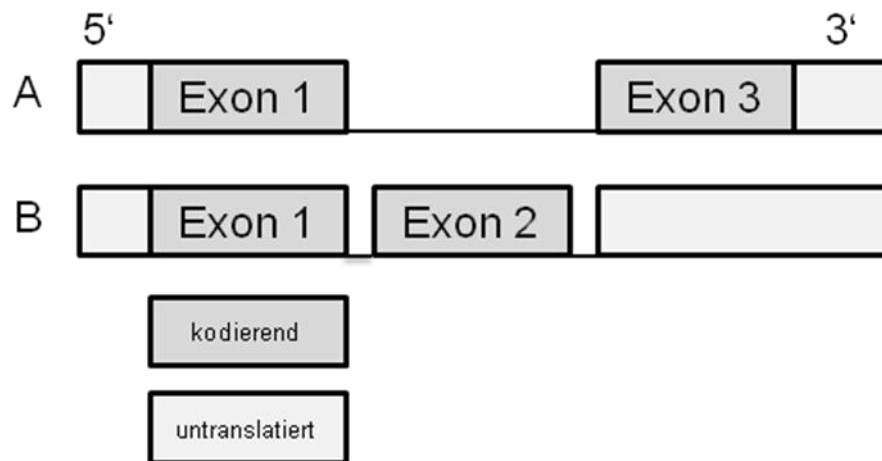


**Abb. 3.2:** *CHD8*-Screening-Auszug eines 1 %igen Agarosegels: Es wurde neben dem jeweiligen PCR-Produkt eine Negativkontrolle (L) aufgetragen. Exemplarisch sind hier die PCR-Produkte von Exon 2 bis Exon 6 aufgetragen.

In keiner der 25 untersuchten Familien konnte eine pathogene Mutation durch Sequenzanalyse im kodierenden Bereich oder angrenzenden Intronbereich im *CHD8*-Gen entdeckt und verifiziert werden.

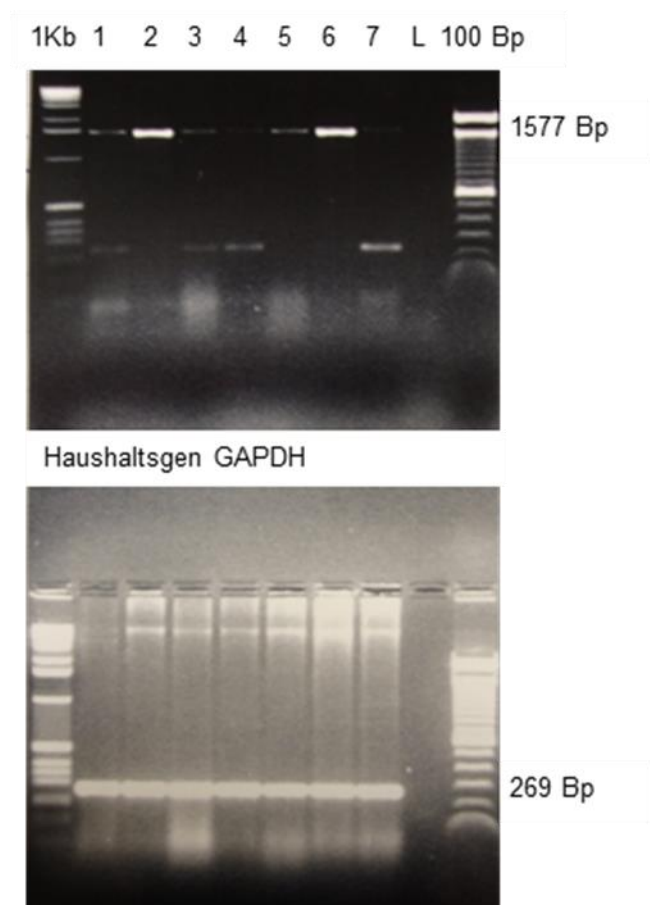
### 3.2.2 Kandidatengen *FAM124B*

Als zweiter Interaktionspartner des CHD7-Proteins wurde in unserer Arbeitsgruppe *FAM124B* identifiziert. Zunächst wurde für *FAM124B* eine genaue Transkriptuntersuchung durchgeführt, da zwischen der Datenbank ENSEMBL und NCBI Diskrepanzen bezüglich der Anzahl der Isoformen beim Menschen vorliegen. Dafür wurde zunächst cDNA aus RNA, die aus menschlichem Blut unter Verwendung des PEQLAB Total RNA Kit gewonnen wurde, hergestellt (s. 2.2.3, 2.2.9). Für die Amplifizierung des 1806 Bp langen Produktes wurde das Primerpaar *Fam124B*Hu RT-F/R (s. 2.1.13.4) verwendet. Nachdem sich eine nur schwache Expression im humanen Blut zeigte, wurde die Analyse an kommerziell erhältlicher cDNA aus menschlichem Gehirn durchgeführt. Es konnte gezeigt werden, dass dort zwei Isoformen exprimiert werden (vgl. Abbildung 3.3). Der kodierende Bereich der Isoform A ist 1368 Bp, derjenige der Isoform B 819 Bp groß. Die *Splice-sites* des Exons 2 folgen nicht der AG-GT-Regel, sondern der seltener vorkommenden AG-GC-Regel.



**Abb. 3.3:** *FAM124B* Isoformen beim Menschen

Ferner wurde die Expression von *Fam124B* in murinem Gewebe untersucht. Bei der Maus wird in den Datenbanken nur ein Transkript, bestehend aus zwei Exons, beschrieben. Aus verschiedenen Organen wurde RNA isoliert (s. 2.2.4). Mittels RT-PCR (s. 2.2.9) konnte die Expression in Gehirn, Herz, Niere, Lunge, Milz und Hoden nachgewiesen werden (s. Abbildung 3.4). Das murine Transkript entspricht weitgehend der Isoform A beim Menschen.

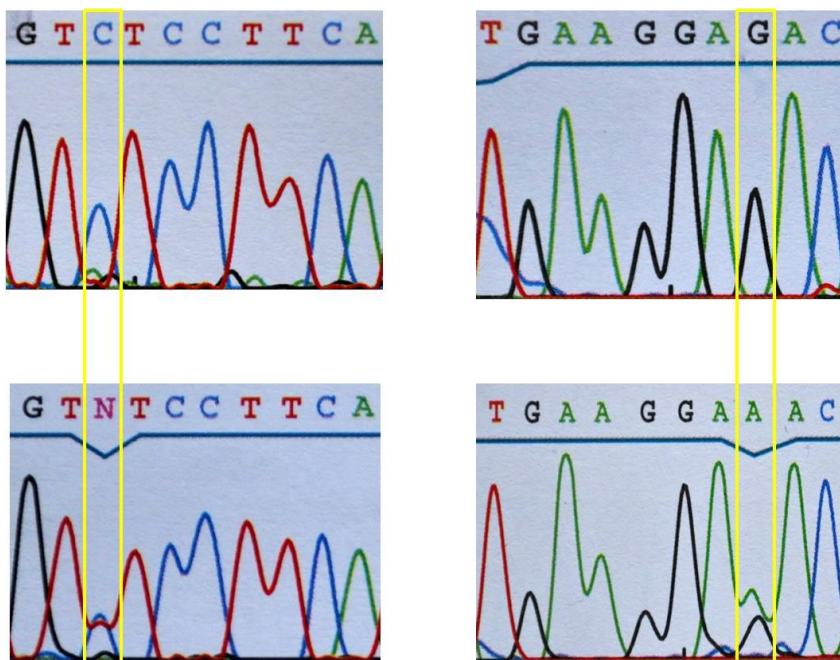


**Abb. 3.4:** RT-PCR-Produkte von Fam124B bei der Maus: [1] Gehirn, [2] Herz, [3] Niere, [4] Leber, [5] Lunge, [6] Milz, [7] Hoden, [L] Negativkontrolle: Die sichtbare Bande bei 1577 Bp zeigt an, dass Fam124B jeweils im murinen Gewebe exprimiert wird. Das Haushaltsgen GAPDH ist ein nicht reguliertes Gen, welches ein Enzym der Glykolyse kodiert. Es ist unabhängig von Zelltyp und Zellstadium und diente als Nachweis für das erfolgreiche Umschreiben der RNA in cDNA.

Für das Kandidatenscreening wurden zunächst 8 Primerpaare (s. 2.1.13.2) erstellt, um den kodierenden Bereich des Gens abzudecken. Die PCR-Produkte waren zwischen 585-849 Bp lang. Nach der Etablierung am Wildtyp wurden insgesamt Proben von 26 CHARGE-Patienten, bei denen keine Mutation im *CHD7*-Gen detektiert werden konnte, auf Mutationen im *FAM124B*-Gen untersucht. Dafür wurden die DNA-Proben mit Immolase im Touchdown-60 °C-Programm amplifiziert und nach Aufreinigung mit Nucleo-Fast-Platten sequenziert (s. 2.2.6, 2.2.13.2, 2.2.17, 2.2.18).

Ergänzend wurden auch zwei Patienten mit Verdacht auf ein Goldenhar-Syndrom, ein angeborenes Fehlbildungssyndrom, das u. a. durch Missbildungen im Gesichtsbereich wie Hypoplasie der Mandibula oder Maxilla, Mikrotie mit präaurikulären Anhängseln, Anophthalmie, aber auch Fehlbildungen an Nieren oder am Herzen gekennzeichnet sein kann, untersucht. Mit zusätzlichen PCR-Produkten mithilfe weiterer Primer wie FAM124B

Ex1.1gR zusammen mit FAM124B Ex1.2F (s. 2.1.13.2) konnten auffällige Stellen abgeklärt werden. Bei keinem Patienten konnte eine pathogene Mutation in den kodierenden Bereichen und in angrenzenden Intronbereichen gefunden werden. Ein CHARGE-Patient und die zwei Goldenhar-Patienten zeigten einen Basenaustausch im Exon 3 an der Position c.612 von Cytosin nach Thymin (c.612C>T) (vgl. Abbildung 3.5). Diese Veränderung führt zu einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Phenylalanin (p.L204F). Das entsprechende PCR-Produkt mit einer Länge von 799 Bp war mit den Primern FAM124B Ex 3.1F/R amplifiziert worden.

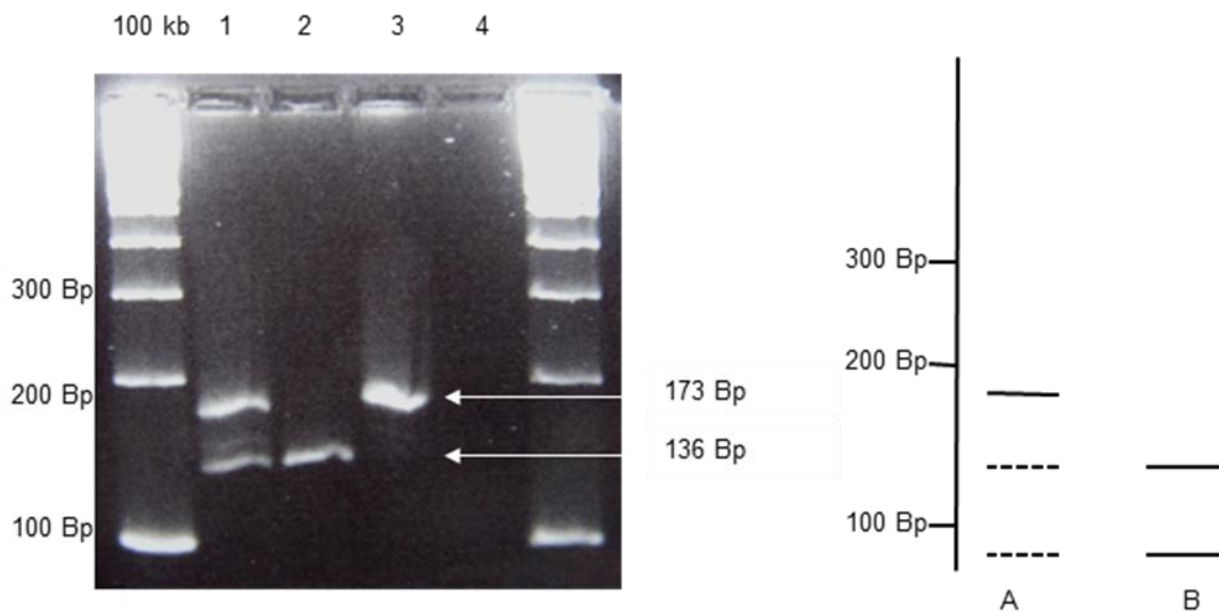


**Abb. 3.5:** Sequenzdarstellung des Produktes FAM124B Ex.3.1: links: DNA-Sequenz mit Primer FAM124B Ex.3.1F sequenziert, oben: Wildtyp, unten: SNP c.612C>T, rechts: DNA-Sequenz mit Primer FAM124B Ex 3.1R sequenziert, oben: Wildtyp, unten SNP c.612C>T, gelb markiert ist die Stelle c.612C>T.

Zum Ausschluss eines Amplifikationsfehlers der Polymerase während der PCR wurde mit demselben Primerpaar erneut das entsprechende PCR-Produkt hergestellt und sequenziert. Zusätzlich wurde für einen Restriktionsverdau (s. 2.2.10) ein kürzeres PCR-Produkt mit einer Länge von 173 Bp mithilfe der Primer FAM124B Ex3.2F und Ex3.1R mit Immolase hergestellt. Das verwendete Restriktionsenzym BsmA1 schneidet die Wildtyp-Sequenz in ein 136 Bp und 37 Bp großes Fragment. Im Falle der o. g. Mutation wird das Produkt nicht geschnitten. Das PCR-Produkt eines Patienten sowie das gleiche Produkt einer Wildtyp-Kontrolle wurden mit dem Restriktionsenzym über 6 h bei 37 °C inkubiert und danach auf ein



3% LMP (*low melting point*)-Agarosegel aufgetragen. Es war sowohl die Bande des ungeschnittenen Produktes (173 Bp) als auch eine Bande mit einer Länge von 136 Bp sichtbar. Die 3. Bande mit einer Länge von 36 Bp konnte aufgrund der geringen Größe im Gel nicht nachgewiesen werden. Da bei den Patienten in der Sequenzierung der Basenaustausch im heterozygoten Zustand detektiert wurde, ist davon auszugehen, dass die Veränderung nur eines der beiden Allele betrifft. Die ungeschnittene Bande (173 Bp) weist auf das mutierte Allel hin, während die 136 Bp große Bande ein Schnittprodukt des Wildtyp-Allels ist (s. Abbildung 3.6).



**Abb. 3.6:** Restriktionsverdau mit BsmA1: links: Agarosegel 2%: Restriktionsverdau mit BsmA1: [1] Verdau PCR-Produkt Patienten-DNA geschnitten, [2] Verdau PCR-Wildtyp-Produkt, [3] PCR-Wildtyp-Produkt ungeschnitten, [4] Negativkontrolle; rechts: Schema des Restriktionsverdau mit BsmA1: [A] Verdau bei Vorliegen einer heterozygoten Mutation, [B] Verdau bei Vorliegen von Wildtyp-Sequenz.

Da die DNA der Eltern in allen 3 Fällen nicht zur Verfügung stand, wurde zur weiteren Abklärung o. g. Auffälligkeit die DNA von 50 Wildtyp-Kontrollen untersucht, von denen 5 an der auffälligen Stelle auch heterozygot CT waren. Da folglich auch gesunde Personen die Veränderung aufweisen, kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Veränderung um einen Polymorphismus handelt. Da Polymorphismen zwar keine direkte Krankheitsursache darstellen, aber als „Verstärker“ einer bestehenden krankheitsverursachenden Mutation wirken können, wurden 21 CHARGE-Patienten mit Nachweis einer Mutation im *CHD7*-Gen auf das Vorliegen des Polymorphismus c.612C>T untersucht. 3 Patienten waren heterozygot für den Polymorphismus, während die restlichen Patienten homozygot das C-Allel aufwiesen. Diese Patienten mit der Heterozygotie in der

genannten Position weisen Symptome wie Hörstörungen, Herzfehler, Kolobome, psychomotorische Entwicklungsretardierung und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten auf. Unter den untersuchten Patienten mit *CHD7*-Mutation befand sich ein Geschwisterpaar, welches dieselbe Mutation c.7302dupA in Exon 34 aufweist, jedoch klinisch einen unterschiedlichen Phänotyp aufzeigt. Der Junge gehört zu den 3 Patienten, die heterozygot für den Polymorphismus sind, das Mädchen ist allerdings homozygot C (Wildtyp-Allel). Auch wenn sie unterschiedliche Symptome aufweisen, so sind klinisch beide schwer betroffen und es ist deshalb davon auszugehen, dass dieser neu entdeckte Polymorphismus keine Verstärkerfunktion einer krankheitsverursachenden Mutation beim CHARGE-Syndrom hat.

Weiterhin wurde durch die Sequenzanalyse der 21 CHARGE-Patienten, die eine Mutation im *CHD7*-Gen aufweisen, die Häufigkeit eines bereits bekannten Polymorphismus im *FAM124B*-Gen erfasst. In dem SNP rs 3738954 in Exon 3 sind 5 Patienten heterozygot TC. An dieser Stelle sind von den untersuchten Patienten ohne Mutation im *CHD7*-Gen 7 von 26 heterozygot TC; 17 der 50 Wildtyp-Kontrollen zeigen auch eine Heterozygotie. Es kann davon ausgegangen werden, dass der SNP keinen Einfluss auf den *CHD7*-Phänotyp hat, da klinisch kein Unterschied zwischen den heterozygoten Trägern des T-Allels als auch Nicht-Trägern zu bemerken ist.

### 3.3 Patientenkollektiv für Haplotypanalyse

Es wurden 30 Patienten mit der Diagnose CHARGE-Syndrom untersucht. Im Vorfeld war jeweils bei diesen Patienten in der molekulargenetischen Diagnostik eine Mutation im *CHD7*-Gen mittels Sequenzanalyse gefunden worden. Alle Mutationen liegen heterozygot vor, d. h. dass die jeweilige Veränderung nur ein Allel betrifft. Im Folgenden wurde die genomische Sequenz des *CHD7*-Gens ca. 2000 Bp vor der bekannten Mutation als auch ca. 2000 Bp hinter der bekannten Mutation auf aussagekräftige Polymorphismen (SNP) untersucht. Ein aussagekräftiger SNP liegt z. B. bei folgender Konstellation vor: Die Mutter des betroffenen Kindes und das Kind selbst sind heterozygot CT in diesem SNP, der Vater hingegen TT. Somit kann angenommen werden, dass das Kind das C-Allel von der Mutter und das T-Allel vom Vater geerbt haben muss.

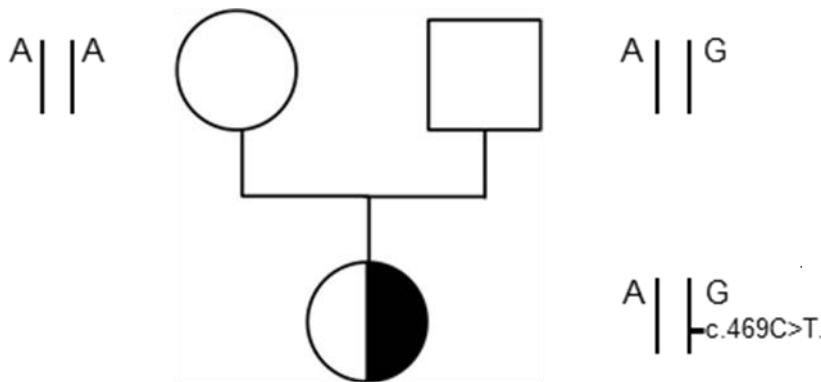
Bei Vorliegen eines aussagekräftigen SNP wurde die Vaterschaft anhand von Mikrosatelliten bestätigt (s. 2.2.19). Mittels Yq11-PCR (s. 2.2.20) wurde jeweils gezeigt, dass die väterliche Probe männlich ist. In der Regel wird diese Methode in der molekulargenetischen Diagnostik genutzt, um bei Männern Mikrodeletionen im Azoospermiebereich, welcher auf dem Y-Chromosom liegt, nachzuweisen.

Die notwendigen PCR-Produkte wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der Immolase DNA-Polymerase amplifiziert (s. 2.2.6). Bei Vorliegen eines aussagekräftigen SNP wurde ein PCR-Produkt hergestellt, welches sowohl die Mutation als auch den informativen SNP enthielt. Dieses diente gleichzeitig zur Bestätigung des SNP. Um festzustellen, welches Allel die Mutation betrifft, wurde einzelsträngige DNA benötigt. Dafür wurde das jeweilige PCR-Produkt kloniert und in DH5 $\alpha$ -Zellen transformiert (s. 2.2.14, 2.2.15). Einige der gewachsenen Kolonien, im Mittel zwischen 10-15, wurden, wenn nicht anders angegeben, mit der Polymerase Immolase amplifiziert und anschließend sequenziert. Anhand der einzelsträngigen DNA konnte nun ermittelt werden, welches Allel von der Mutation betroffen ist.

Im Folgenden werden nun die Ergebnisse der Familien vorgestellt:

3.3.1 Familien mit informativen Polymorphismen

Familie 1: Patientin 25648



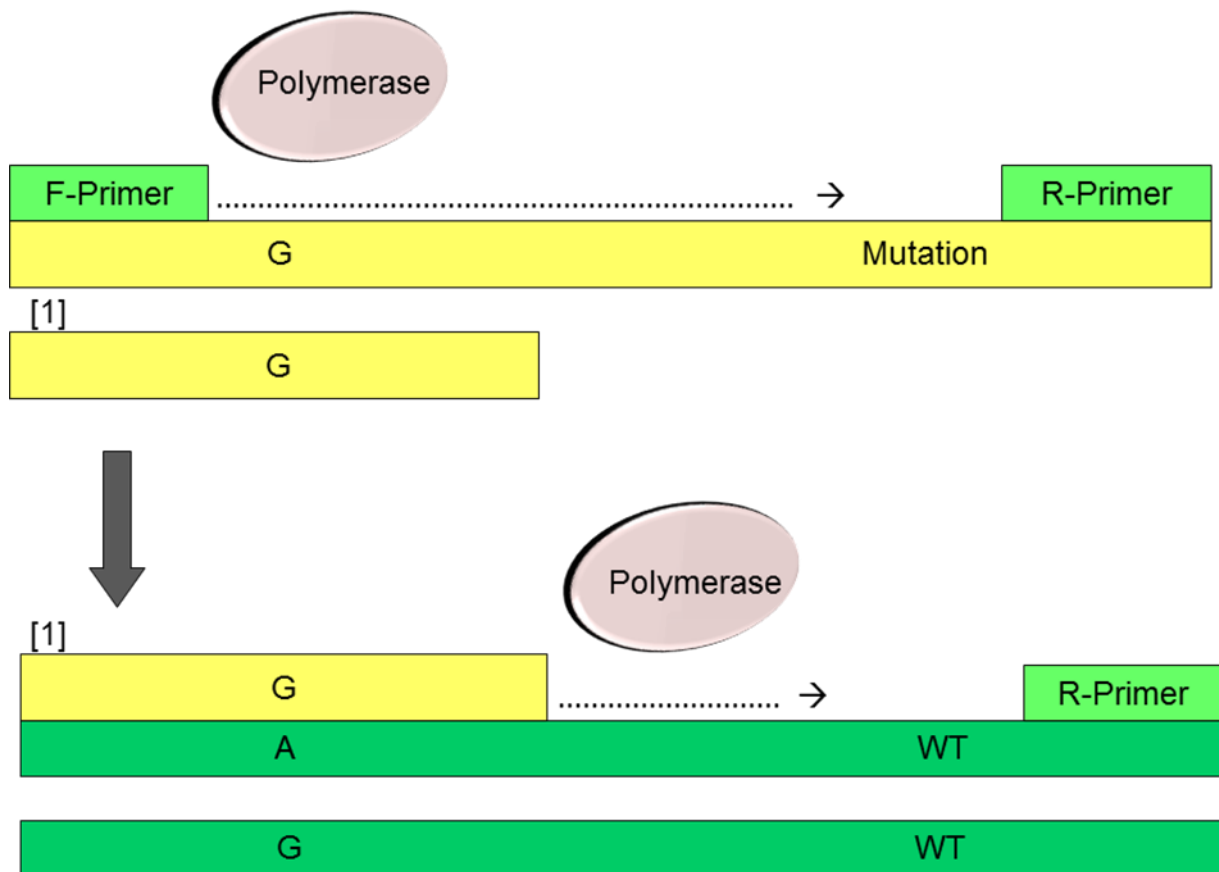
**Abb. 3.7:** Stammbaum Familie 1: Der Vater und das betroffene Kind sind heterozygot AG im SNP rs 7836586, die Mutter homozygot AA. Die kindliche Mutation im Exon 2, c.469C>T liegt auf dem G-Allel.

Beim betroffenen Kind ist die Mutation c.469C>T (p.R157X) in Exon 2 aus der vorausgegangenen molekulargenetischen Diagnostik bekannt. Der Austausch der Base Cytosin durch Thymin führt zum Aminosäureaustausch von Arginin zu einem vorzeitigen Stopcodon an der Position 157. U. a. wurde mittels des Primerpaares CHD7 Diag Ex 2.5F/R nach informativen Polymorphismen gesucht. In den Sequenzen wurde ein aussagekräftiger SNP rs 7836586 gefunden. Der Vater und das Kind sind heterozygot AG, die Mutter hingegen homozygot AA. Daraus folgt, dass das G-Allel des Kindes vom Vater stammt. Daraufhin wurde ein neues PCR-Produkt (1475 Bp) mit dem Primerpaar SNP CHD7 E2-I2F/R und mit dem Expand Long Template PCR System (Roche Diagnostics, Mannheim) hergestellt, welches die Mutation sowie den entsprechenden Polymorphismus enthielt. Nach Ligation des PCR-Produktes in den pGEM-T easy Vector (Promega, Mannheim) und Klonierung in *E.coli* (s. 2.2.14, 2.2.15) wurde eine Colony-PCR mit dem Primerpaar SNP CHD7 E2-I2F/R durchgeführt. Das Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte zeigt Tabelle 3.1.

7 Klone Mutation	G im SNP
10 Klone Wildtyp	A im SNP
1 Klon Wildtyp	G im SNP
2 Mischklone	

**Tab. 3.1:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte der Patientin der Familie 1.

Anhand dieses Ergebnisses konnte keine eindeutige Zuordnung zum paternalen oder maternalen Allel gemacht werden, obgleich aufgrund der Ergebnisse die Vermutung nahe liegt, dass die Mutation das G-Allel betrifft. Für die verschiedenen Kombinationen von Mutation und Wildtyp mit jeweils einem Allel des SNP wird das sog. *Mega-Priming* verantwortlich gemacht. In der Polymerase-Kettenreaktion wird der Komplementärstrang zu dem jeweiligen Strang gebildet. Es geschieht aber, dass die Polymerase aus verschiedenen Gründen die Amplifizierung abbricht, bevor der neue Strang komplett vorliegt. Das bis dahin vervielfältigte Stück wird in dem Reaktionsansatz nicht abgebaut. Es kann an den anderen Strang der DNA binden und dient dort der Polymerase als sog. *Mega-Primer*. Nun vollendet die Polymerase den begonnenen Strang, jedoch komplementär zum anderen Strang (s. Abbildung 3.8).



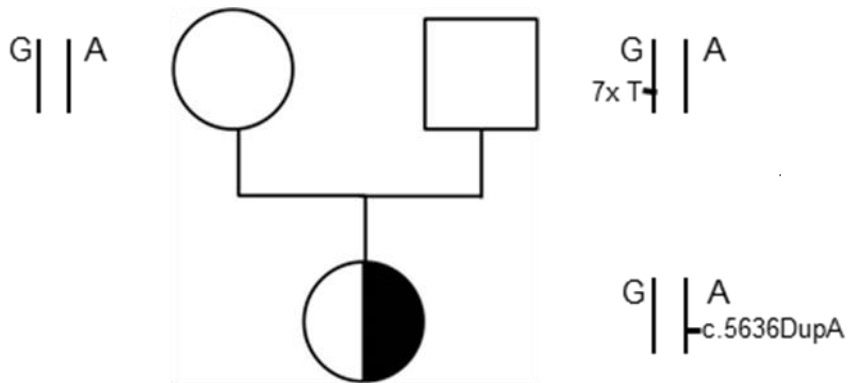
**Abb. 3.8:** Schema des *Mega-Priming*: Die Mutation liegt auf dem G-Allel. Die Polymerase beginnt mit der Amplifikation dieses Einzelstranges. Dabei bricht die Amplifikation nach einer gewissen Zeit unter Umständen ab; der bis dahin entstandene Strang kann im Anschluss als sog. *Mega-Primer* [1] dienen. Dieser *Mega-Primer* lagert an den anderen Strang an, d. h. an jenen mit dem A-Allel und der Wildtyp-Sequenz (WT). Die Polymerase setzt die Amplifikation fort, jedoch wird nun in den entstehenden Strang das Wildtyp-Allel anstatt des mutierten eingebaut.

So geschieht es, dass die Mutation sowohl auf dem einen als auch auf dem anderen Allel liegen kann und eine Zuordnung zum paternalen oder maternalen Allel nicht mehr möglich ist. Daraufhin wurde nach 5'-3'-DNA-Polymerasen gesucht, die eine sog. *Proofreading*-Aktivität besitzen, d. h. dass sie eine 3'-5'-Exonuklease-Aktivität haben und die Bruchstücke, die als *Mega-Primer* fungieren können, abbauen. In der Familie 1 wurden verschiedene Polymerasen getestet: Mit der *Pfu* (Promega, Mannheim) und dem LongRange PCR Kit (QIAGEN GmbH, Hilden) war es nicht möglich, das entsprechende PCR-Produkt herzustellen. Auch verschiedene Ansätze mit der *Pwo* SuperYield DNA-Polymerase (Roche Diagnostics, Mannheim) ließen keine adäquate PCR-Produktherstellung zu. Mit den *Proofreading*-Polymerasen Phusion (Finnzymes, Espoo, Finnland) und HotStar HiFidelity (QIAGEN GmbH, Hilden) konnte das entsprechende PCR-Produkt amplifiziert werden (s. 2.2.7.1, 2.2.7.2). Die Ergebnisse der Klonierung des PCR-Produktes mit der HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase zeigt die Tabelle 3.2. Diese bestätigen die Vermutung, dass die Mutation bei dieser Patientin das paternale Allel betrifft.

6 Klone Mutation	G im SNP
2 Klone Wildtyp	A im SNP

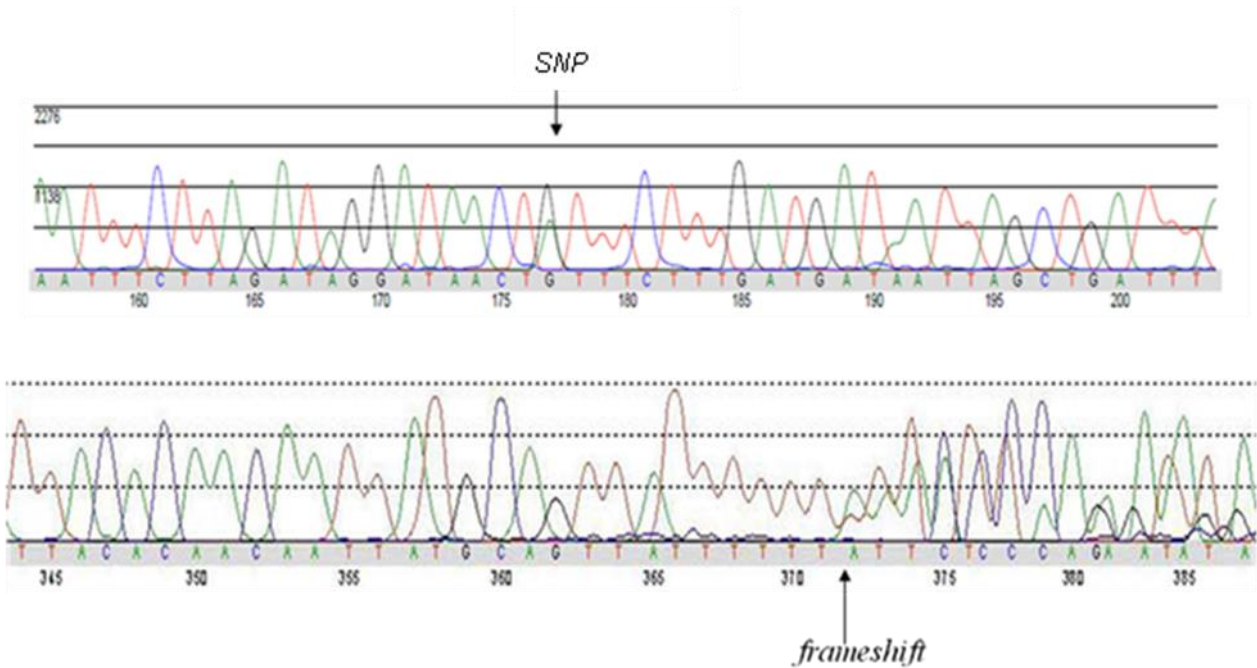
**Tab. 3.2:** Ergebnisse der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte der Patientin 1.

**Familie 2: Patientin 27436**



**Abb. 3.9:** Stammbaum Familie 2: Die Eltern und das Kind sind heterozygot GA im SNP rs 4342642. Der Vater weist eine Heterozygotie (6x T/ 7x T) in einer T-Box auf, in welcher die Mutter und das Kind homozygot für 6x T sind. Somit konnte der SNP für die Haplotypanalyse genutzt werden. Die kindliche Mutation c.5636dupA liegt auf dem A-Allel.

Die bei dieser Patientin bekannte Mutation im Exon 28, c.5636dupA konnte durch eine Amplifikation und Sequenzierung mit den Primern SNP CHD7 E28I28F/R (Produktgröße 617 Bp) bestätigt werden. In der Familie 2 konnten für die Haplotypanalyse ein zunächst nicht informativer SNP rs 4342642 und zusätzlich eine Veränderung in der Anzahl von Thymin-Basen in der nahe gelegenen T-Box beim Vater verwendet werden. An der Position des SNPs rs 4342642 sind beide Elternteile als auch das betroffene Kind heterozygot GA. 188 Basen downstream des SNPs befindet sich eine T-Box, in der beim Vater eine unterschiedliche Anzahl an Thymin-Basen vorliegt. Die Heterozygotie in der T-Box zeigte sich beim Vater in Form einer Verschiebung des Leserahmens (*Frameshift*) (s. Abbildung 3.10).



**Abb. 3.10:** Sequenzauszug mit dem Primer SNP CHD7 E28I28F der väterlichen DNA: In der Sequenz ist der verwendete SNP rs 4342642 und die Heterozygotie in der T-Box und folglich die entstehende Leserasterverschiebung zu erkennen.



**Abb. 3.11:** Grafische Darstellung der Allelzuordnung in Familie 2.

So wurde zunächst ein PCR-Produkt der väterlichen DNA hergestellt, welches den nicht-informativen SNP rs 4342642 und die T-Box enthielt. Dieses PCR-Produkt wurde kloniert und sequenziert. Es zeigte sich, dass 7 Klone 7x T und G im SNP rs 4342642 und dass 12 Klone 6x T und A im SNP rs 4342642 aufweisen. Daher konnte davon ausgegangen werden, dass beim Vater das A-Allel in der T-Box 6 Thymine aufweist und das G-Allel 7. Da das Kind

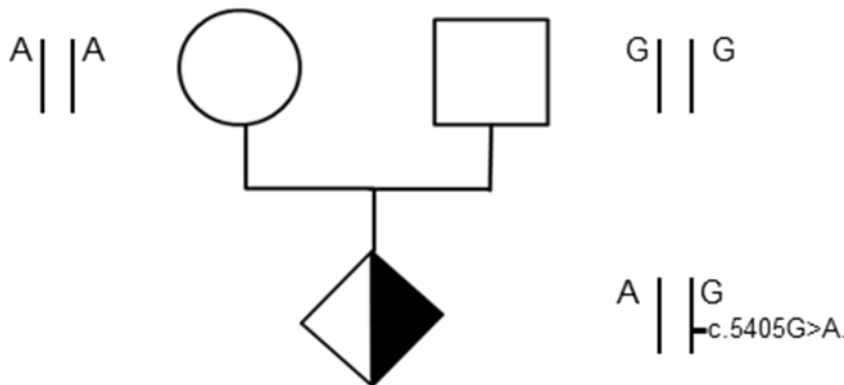


in der T-Box aber homozygot für 6x T ist, konnte man sicher annehmen, dass das Kind das A-Allel vom Vater und das G-Allel von der Mutter geerbt haben muss. Die Sequenzen der Colony-PCR der kindlichen DNA ergaben eine Zuordnung zum väterlichen Allel (s. Tabelle 3.3).

10 Klone Mutation	A im SNP
7 Klone Wildtyp	G im SNP
3 Mischklone	

**Tab. 3.3:** Auswertung der Sequenzen der Colony-PCR-Produkte der Patientin 2.

**Familie 3: Patient 2129-1**



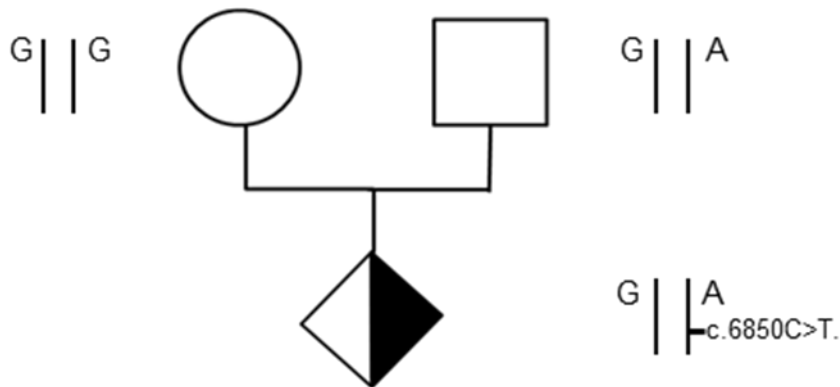
**Abb. 3.12:** Stammbaum Familie 3: Der SNP rs 4342642 ist informativ: Die Mutter ist homozygot AA, der Vater homozygot GG, das Kind heterozygot AG. Die Mutation beim Kind in Exon 26, c.5405G>A (p.G1802D) liegt auf dem G-Allel.

Bei diesem Patienten liegt in Exon 26 die Mutation c.5405G>A (p.G1802D) vor. Der Basenaustausch von Guanin durch Adenin führt zu einem Aminosäureaustausch von Glycin zu Asparaginsäure an der Position 1802. Mit der HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase wurde sowohl ein PCR-Produkt mit dem Primerpaar SNP CHD7 I25-26F/R mit einer Größe von 1486 Bp als auch ein Produkt mit dem Primerpaar SNP CHD7 I27-28F/R mit einer Produktlänge von 858 Bp hergestellt. Der SNP rs 4342642 war aussagekräftig und konnte für die Zuordnung zum väterlichen oder mütterlichen Allel genutzt werden. Für die Klonierung wurde ein PCR-Produkt mit einer Länge von 1221 Bp mit dem Primerpaar SNP CHD7 E26I28F/R hergestellt und kloniert. In Tabelle 3.4 ist das Ergebnis der Sequenzierung von 12 Klonen angegeben. Die Mutation c.5405G>A betrifft das paternale Allel.

4 Klone Mutation	G im SNP
7 Klone Wildtyp	A im SNP
1 Mischklon	

**Tab. 3.4:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 3.

**Familie 4: Patient 1209-1**



**Abb. 3.13:** Stammbaum Familie 4: Der Vater und das Kind sind heterozygot GA im SNP rs 61733338, die Mutter homozygot GG. Die Mutation im Exon 32, c.6850C>T liegt auf dem A-Allel.

Die zuvor detektierte Mutation c.6850C>T in Exon 32 beim betroffenen Kind konnte mittels erneuter PCR bestätigt werden. Von der elterlichen und kindlichen DNA wurde mit der DNA-Polymerase HotStar HiFidelity neben einem PCR-Produkt mit den Primerpaar SNP CHD7 I31F/R auch ein Produkt mit dem Primer CHD7 Diag Ex32F zusammen mit SNP CHD7 Ex32R-Primer erzeugt. Der SNP rs 61733338 war aussagekräftig, weil der Vater und das Kind heterozygot AG, die Mutter hingegen homozygot GG ist. Das Ergebnis der Sequenzierung der Klone zeigt Tabelle 3.5.

2 Klone Mutation	G im SNP
1 Klon Wildtyp	G im SNP
5 Mischklone	

**Tab. 3.5:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 4.

Es wurde ein neues PCR-Produkt mit der HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase erzeugt, mit dem Ergebnis, welches in Tabelle 3.6 dargestellt ist.

3 Klone Mutation	A im SNP
3 Klone Mutation	G im SNP
6 Klone Wildtyp	G im SNP
2 Klone Wildtyp	A im SNP

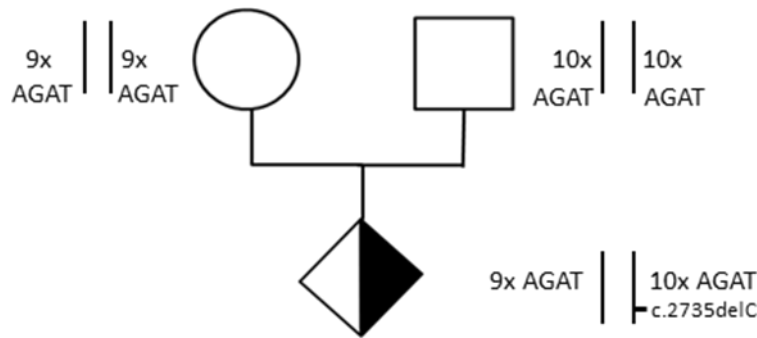
**Tab. 3.6:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 4. Das Ausgangsprodukt wurde mit der HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase hergestellt.

Trotz der Verwendung der *Proofreading*-Polymerase tauchten in den Sequenzen der Colony-PCR erneut verschiedene Kombinationen von Mutation, Wildtyp und G- oder A-Allel auf. Nach Information des Herstellers QIAGEN GmbH ist der HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase zur besseren Amplifikation ein sehr geringer Anteil an einer *Taq*-Polymerase zugesetzt, sodass das sog. *Mega-Priming* nicht vollständig durch die *Proofreading*-Polymerase unterbunden werden kann. So wurde eine andere *Proofreading*-Polymerase, die peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase, für die Herstellung eines neuen PCR-Produktes gewählt. Die Ergebnisse der Klonierung dieses Produktes ergaben, dass die Mutation auf dem väterlichen Allel liegt (s. Tabelle 3.7).

8 Klone Mutation	A im SNP
7 Klone Wildtyp	G im SNP
5 Mischklone	

**Tab. 3.7:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 4. Das Ausgangs-PCR-Produkt wurde mit der peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase erzeugt.

**Familie 5: Patient 1065-1**



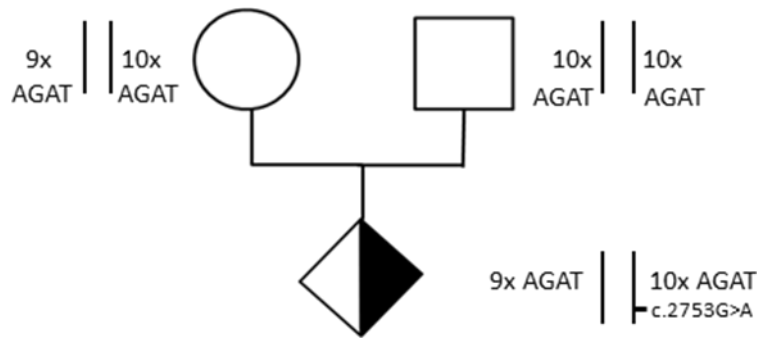
**Abb. 3.14:** Stammbaum Familie 5: Im SNP rs 59147613 ist der Vater homozygot für 10x AGAT und die Mutter homozygot für 9x AGAT, das Kind ist heterozygot 9x AGAT/ 10x AGAT. Die Mutation c.2735delC im Exon 10 liegt auf dem Allel mit 10x AGAT-Wiederholungen. [9x bzw.10x AGAT]: 9 x bzw. 10x AGAT-Wiederholungen.

Der Patient weist im Exon 10 heterozygot eine Deletion der Base Cytosin an der Position c.2735 (c.2735delC) auf. Mithilfe der Primer SNP CHD7 I9-I11F/R und SNP CHD7 I12F/R wurden Bereiche von Intron 9 bis Intron 12 auf aussagekräftige SNPs untersucht. Der SNP rs 59147613 konnte für die Haplotypanalyse angewandt werden. Der Vater ist homozygot für 10x AGAT, die Mutter für 9x AGAT, das Kind ist heterozygot. Mit den Primern CHD7 Diag 10F und SNP CHD7 In 12.3R wurde ein neues PCR-Produkt mit einer Größe von 1853 Bp mit der *peqGOLD Pwo*-DNA-Polymerase hergestellt, welches die kindliche Mutation und den aussagekräftigen SNP umspannt. Die Sequenzierung der Colony-PCR zeigte die in Tabelle 3.8 beschriebene Verteilung, welche eine Zuordnung der Mutation zum paternalen Allel zulässt.

4 Klone Mutation	10x AGAT-Wiederholungen
6 Klone Wildtyp	9x AGAT-Wiederholungen

**Tab. 3.8:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 5.

**Familie 6: Patient 2291-1**



**Abb. 3.15:** Stammbaum Familie 6: Die Mutter und das betroffene Kind sind in dem SNP rs 59147613 heterozygot 9x AGAT/ 10x AGAT, der Vater ist homozygot für 10x AGAT. Die Mutation im Exon 10, c.2753G>A liegt auf dem Allel mit den 10x AGAT-Wiederholungen. [9x bzw.10x AGAT]: 9 x bzw. 10x AGAT-Wiederholungen.

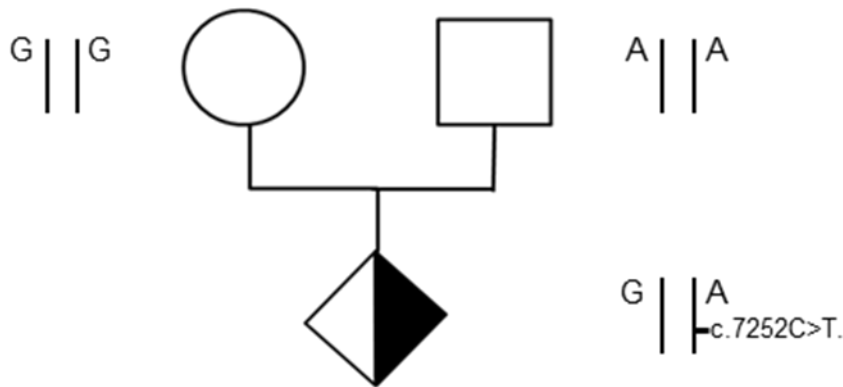
Dieser Patient weist in Exon 10 an der Stelle c.2753 einen Basenaustausch von Guanin nach Adenin auf (c.2753G>A, p.W918X). In der Familie 6 erwies sich derselbe SNP wie bei Familie 5 als aussagekräftig, und es wurde nach derselben Methode vorgegangen. Das Ergebnis der Sequenzierung von 12 Colony-PCR-Produkten zeigt Tabelle 3.9.

4 Klone Mutation	10x AGAT-Wiederholungen
6 Klone Wildtyp	9x AGAT-Wiederholungen
2 Mischklone	

**Tab. 3.9:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 6.

Somit ist in dieser Familie das paternale Allel von der Mutation betroffen.

**Familie 7: Patient 3351-1**



**Abb. 3.16:** Stammbaum Familie 7: Im aussagekräftigen SNP rs 13253647 ist die Mutter homozygot GG, der Vater AA, das Kind heterozygot GA. Die kindliche Mutation in Exon 34, c.7252C>T liegt auf dem A-Allel.

Der Patient hat einen heterozygoten Basenaustausch im Exon 34 an der Stelle c.7252 von Cytosin zu Thymin (c.7252C>T, p.R2418X). Dies führt zu einem vorzeitigen Stopcodon. Mit den Primern SNP CHD7 I34F/R und SNP CHD7 I32-I33F/R wurden mithilfe der Immobilase verschiedene PCR-Produkte (779 Bp und 1287 Bp lang) des Kindes und der Eltern hergestellt und sequenziert. Im SNP rs 13253647 ist das Kind heterozygot AG, die Mutter GG und der Vater AA. Mit der HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase und mit dem Primerpaar SNP CHD7 I32-I33F und CHD7 Diag 34.1R wurde ein PCR-Produkt mit einer Produktlänge von 1643 Bp hergestellt. Nach der Gelextraktion der gewünschten Bande (s. 2.2.12) und anschließender Klonierung, Colony-PCR und Sequenzierung zeigte sich das in Tabelle 3.10 dargelegte Ergebnis.

2 Klone Mutation	A im SNP
5 Klone Wildtyp	G im SNP
1 Klon Mutation	G im SNP

**Tab. 3.10:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 7.

An dieser Stelle ließ sich nur die Vermutung aufstellen, dass das paternale Allel betroffen ist. So wurde nach diesem Ergebnis das Experiment mit einer anderen *Proofreading*-Polymerase wiederholt. Nach der Etablierung der peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase (s. 2.2.7.3) ergab sich das in Tabelle 3.11 dargestellte Ergebnis.

---

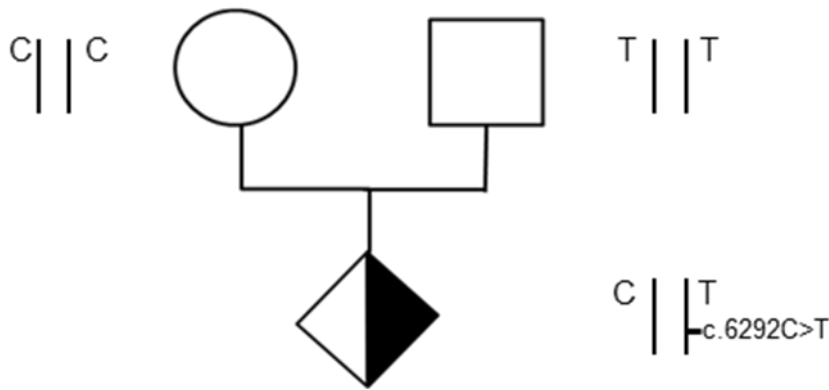
5 Klone Mutation	A im SNP
7 Klone Wildtyp	G im SNP
5 Mischklone	

**Tab. 3.11:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 7. Das Ausgangs-PCR-Produkt wurde mit der peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase erzeugt.

So konnte hier festgestellt werden, dass die Mutation auf dem väterlichen Allel liegt.



**Familie 8: Patient 3260-1**



**Abb. 3.17:** Stammbaum Familie 8: Die Mutter ist im informativen SNP rs 3829054 homozygot CC, der Vater homozygot TT, das betroffene Kind heterozygot CT. Die Mutation in Exon 31, c.6292C>T liegt auf dem T-Allel.

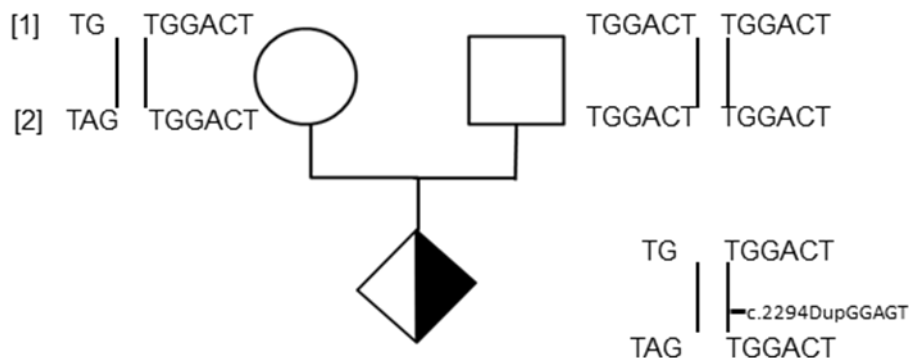
Bei diesem Patienten liegt heterozygot eine Mutation in Exon 31 an der Position c.6292 von Cytosin nach Thymin (c.6292C>T, p.R2098X) vor, welche zu einem vorzeitigen Stopcodon führt. Es wurde von den elterlichen und der kindlichen DNA ein 1594 Bp langes PCR-Produkt mit der HotStar HiFidelity-Polymerase unter Verwendung der Primer CHD7 Diag 31.1F und SNP CHD7 I31R erzeugt und sequenziert. Als weiterer Sequenzprimer diente der Primer SNP CHD7 E31I31R. Die SNPs rs 3829054 und rs 3814483 zeigten sich als informativ. Für die Haplotypbestimmung wurde der Erstgenannte verwendet. Aufgrund der zunächst nicht eindeutigen Zuordnungsmöglichkeiten zum paternalen oder maternalen Allel in anderen Familientriplets wurde bei diesem Patienten zunächst eine andere Methode versucht. Es wurden von den Kolonien Plasmide hergestellt und diese sequenziert (s. 2.2.16). Dabei zeigte aber nur 1 Plasmid die Mutation und ein T im SNP, weitere 9 Plasmide zeigten Sequenzen für Fremdproteine. Deshalb wurde ein neues PCR-Produkt mit der DNA-Polymerase HotStar HiFidelity und auch mit der Phusion High-Fidelity hergestellt, aber vor der weiteren Benutzung aus dem Gel extrahiert (s. 2.2.12). Die Tabelle 3.12 zeigt das Ergebnis der Sequenzen der Colony-PCR.

10 Klone Mutation	T im SNP
1 Klon Wildtyp	G im SNP
1 Mischklon	

**Tab. 3.12:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 8.

In dieser Familie liegt die Mutation folglich auf dem paternalen Allel.

**Familie 9: Patient 2249-1**



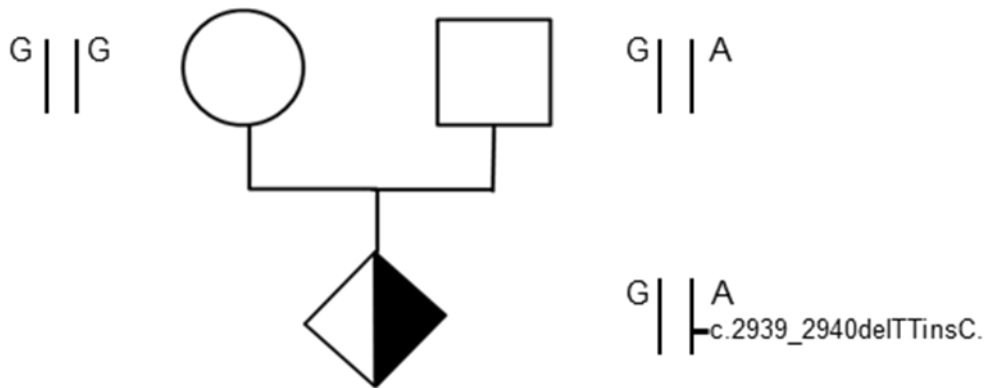
**Abb. 3.18:** Stammbaum Familie 9: In den aussagekräftigen SNPs rs 35504039 [1] und rs 5891777 [2] sind die Mutter und das Kind jeweils heterozygot TG/TGGACT und TAG/TGGACT, der Vater in beiden homozygot TGGACT. Die Mutation in Exon 5, c.2294dupGGAGT, liegt auf dem TGGACT-Allel.

Der Patient weist eine Mutation c.2294dupGGAGT in Exon 5 auf. Für die Haplotypanalyse wurde zunächst ein PCR-Produkt (1306 Bp) mit den Primern CHD7 Diag5F und Diag6R hergestellt. Erst mit einem weiteren Primerpaar SNP CHD7 In4NeuF/R konnten zwei aufeinanderfolgende aussagekräftige SNPs detektiert werden, rs 35504039 und rs 5891777. Das Kind ist heterozygot TG/TGGACT im ersten und TAG/TGGACT im zweiten SNP, der Vater homozygot TGGACT an den genannten Stellen. Da die maternale Sequenz schlecht lesbar war, wurde sowohl die mütterliche DNA als auch die kindliche DNA mithilfe der *peqGOLD Pwo*-DNA-Polymerase und mit den Primern CHD7 Diag5F und SNP CHD7 In4NeuR (Produktlänge 446 Bp) amplifiziert und kloniert. Die Sequenzen der Klone der mütterlichen DNA zeigten folgende Verteilung: 9 Klone wiesen in ihrer Sequenz 2x TGGACT auf, 5 Klone 1x TG und 1x TAG und einen Mischklon. Somit ist die Mutter in beiden SNPs wie das Kind heterozygot. Das Kind muss das TG bzw. TAG-Allel von der Mutter geerbt haben und das TGGACT-Allel vom Vater. In Tabelle 3.13 ist die Verteilung der Klone der kindlichen DNA dargestellt. Sie zeigt eine Zuordnung der Mutation zu dem paternalen Allel.

5 Klon Mutation	2x TGGACT
5 Klone Wildtyp	1x TG + 1x TAG
2 Mischklon	

**Tab. 3.13:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 9.

**Familie 10: Patient 3696-1**



**Abb. 3.19:** Stammbaum Familie 10: Im informativen SNP rs 4509369 sind der Vater und das Kind heterozygot GA, die Mutter homozygot GG. Die Mutation c.2939\_2940delTTinsC in Exon 11 liegt auf dem A-Allel.

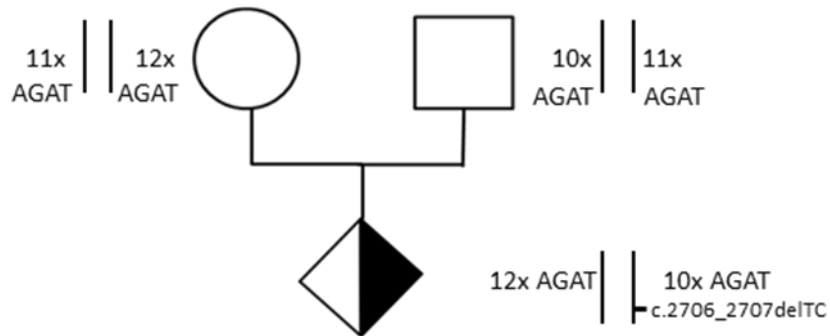
Die Mutation im Exon 11, c.2939\_2940delTTinsC, ist aus der molekulargenetischen Untersuchung bekannt. Diese Deletion von TT und die Insertion von C führen zu einer Verschiebung des Leserahmens (*Frameshift*). Es wurde ein PCR-Produkt mit der *peqGOLD Pwo*-DNA-Polymerase mit den Primern CHD7 Diag 10F und SNP CHD7 12.3R sowie ein 2. mit dem Primerpaar SNP CHD7 I9-11F/R hergestellt. Es wurde ein aussagekräftiger SNP rs 4509369 in den Sequenzen detektiert: Der Vater und das Kind sind heterozygot GA, die Mutter homozygot GG. D. h. dass das A-Allel vom Vater und das G-Allel von der Mutter stammen muss. Das PCR-Produkt mit dem Primerpaar SNP CHD7 I9-11F/R konnte nach einem A-tailing (s. 2.2.8) für die Klonierung genutzt werden. Die Sequenzen der Klonierungs-PCR zeigten eine Zuordnung der Mutation zum paternalen Allel, wie der Tabelle 3.14 zu entnehmen ist.

7 Klone Wildtyp	G im SNP
4 Klone Mutation	A im SNP

**Tab. 3.14:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 10.

3.3.1.1 Familien mit nicht eindeutiger Zuordnung

Familie 11: Patient 1466-1



**Abb. 3.20:** Stammbaum Familie 11: Im informativen SNP rs 59147613 ist die Mutter heterozygot 11x AGAT/ 12x AGAT, der Vater 10x AGAT/ 11x AGAT und das Kind 10x AGAT/ 12x AGAT. In dieser Familie konnte keine eindeutige Zuordnung zum paternalen oder maternalen Allel gemacht werden. Lediglich aufgrund der höheren Anzahl an Klonen mit der Mutation auf dem Allel mit den 10x ATAG-Wiederholungen kann eine paternale Zuordnung angenommen werden. [10x, 11x bzw. 12x AGAT]: 10 x, 11x bzw. 12x AGAT-Wiederholungen.

Die Deletion TC an Position c.2706-2707 in Exon 10 führt zu einer Verschiebung des Leserahmens (*Frameshift*). Wie bei den Patienten 5 und 6 wurden PCR-Produkte mit den Primern SNP CHD7 I9-I11F/R und SNP CHD7 I12F/R hergestellt und sequenziert. Von den in der Literatur bekannten Polymorphismen konnte der SNP rs 59147613 als aussagekräftig verifiziert werden. Die Mutter ist heterozygot 11x AGAT/ 12x AGAT, der Vater 10x AGAT/ 11x AGAT und das Kind 10x AGAT/ 12x AGAT. Mit der *peqGOLD Pwo*-DNA-Polymerase wurde mithilfe der Primer CHD7 Diag 10F und SNP CHD7 I12.3R ein Produkt von 1853 Bp hergestellt und kloniert, amplifiziert und sequenziert. Anhand des Ergebnisses konnte jedoch keine eindeutige Zuordnung zu einem Allel gemacht werden. So wurde abermals ein neues PCR-Produkt hergestellt und zum Ausschluss einer möglich aufgetretenen Rekombination während der Amplifizierung sequenziert. Die Tabelle 3.15 zeigt die Verteilung im 1. Durchlauf.

5 Klone Wildtyp	12x AGAT-Wiederholungen
1 Klon Wildtyp	10x AGAT-Wiederholungen
6 Klone Mutation	10x AGAT-Wiederholungen
2 Klone Mutation	12x AGAT-Wiederholungen
1 Mischklon	

**Tab. 3.15:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 11.

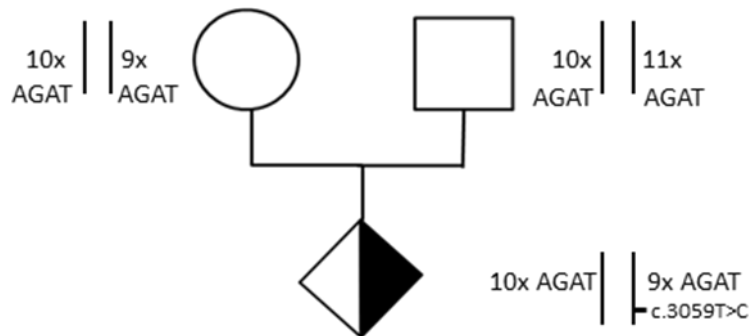
Die Kolonien des neuen PCR-Produktes wiesen die in Tabelle 3.16 dargelegte Verteilung auf.

3 Klone Wildtyp	12x AGAT-Wiederholungen
1 Klone Wildtyp	9x AGAT-Wiederholungen
1 Klon Wildtyp	10x AGAT-Wiederholungen
1 Klon Wildtyp	11x AGAT-Wiederholungen
2 Klone Mutation	10x AGAT-Wiederholungen
2 Klone Mutation	9x AGAT-Wiederholungen

**Tab. 3.16:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des neuen PCR-Produktes des Patienten 11.

Es zeigte sich, dass letztendlich keine eindeutige Zuordnung möglich ist, da auch die Ergebnisse des 2. Durchlaufs keine einheitliche Kombination aufweisen. Außerdem gab es in diesem 2. Durchlauf auch Kolonien, die in ihrer Sequenz nur 9x AGAT aufwiesen. Wahrscheinlich liegt hier ein Amplifikationsfehler der Polymerase vor. Lediglich aufgrund der höheren Anzahl an Kolonien, in denen die Mutation in dem 10x AGAT-Allel liegt, kann vermutet werden, dass auch in dieser Familie das paternale Allel von der Mutation betroffen ist.

**Familie 12: Patient 1870**



**Abb. 3.21:** Stammbaum Familie 12: Der SNP rs 59147613 ist aussagekräftig: Die Mutter und das Kind sind heterozygot 9x AGAT/ 10x AGAT, der Vater 10x AGAT/ 11x AGAT. Die Mutation c.3059T>C in Exon 12 liegt wahrscheinlich auf dem maternalen Allel.

Bei diesem Patienten ist in Exon 12 die Mutation c.3059T>C aus der vorangegangenen Diagnostik bekannt. Sie führt zu einem Aminosäureaustausch von Leucin zu Serin (p.L1020S). Für diese Familie wurden die gleichen Primer zur PCR-Produktherstellung verwendet wie in Familie 5, 6 und 11. Auch hier konnte der SNP rs 59147613 für aussagekräftig bewertet werden. Die Mutter und das Kind sind heterozygot 9x AGAT/ 10x AGAT und der Vater 10x AGAT/ 11x AGAT. So muss das Kind das 9x AGAT-Allel von der Mutter und das 10x AGAT-Allel vom Vater geerbt haben. Das PCR-Produkt (1853 Bp), das die Mutation und den SNP enthält, wurde mit der peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase hergestellt. Die Ergebnisse der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte mit der Immolase-Polymerase zeigt die Tabelle 3.17.

3 Klone Wildtyp	10x AGAT-Wiederholungen
2 Klone Mutation	10x AGAT-Wiederholungen
5 Klone Mutation	9x AGAT-Wiederholungen

**Tab. 3.17:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des Patienten 12.

Im Anschluss wurden weitere Colony-PCR-Produkte mit der peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase hergestellt, um die Ergebnisse zu verifizieren. Das Ergebnis zeigt die Tabelle 3.18.

---

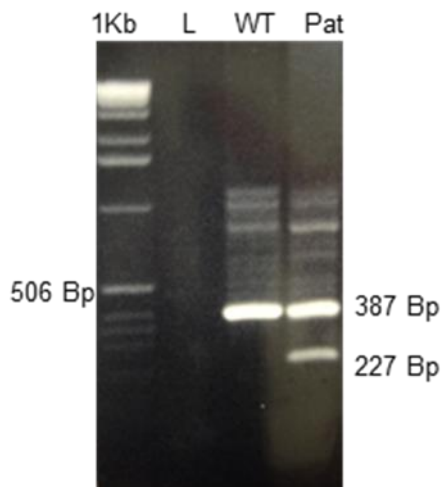
6 Klone Wildtyp	10x AGAT-Wiederholungen
2 Klone Wildtyp	9x AGAT-Wiederholungen
4 Klone Mutation	9x AGAT-Wiederholungen

**Tab. 3.18:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte mit der peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase des Patienten 12.

In dieser Familie war keine eindeutige Zuordnung zu einem Allel möglich. Vermutlich betrifft aufgrund der höheren Anzahl an Kolonien, in denen die Mutation auf dem 9x AGAT-Allel liegt, die Mutation in dieser Familie das maternale Allel.

**Familie 13: Patient 27470**

Bei diesem Patienten wurde eine *Splice-site*-Mutation im Intron 23 an der Position c.5210+3A>G im Rahmen der Diagnostik entdeckt. Da es sich bei dieser Mutation um eine noch nicht in der Literatur beschriebene handelt, wurde die Mutation weiter abgeklärt. Dafür wurde RNA aus kindlichem EDTA-Blut isoliert und cDNA hergestellt (s. 2.2.3, 2.2.9). Anschließend wurde eine PCR mit den Primerpaaren CHD7 RT Ex22-24F/R an der Patienten- cDNA und einer Kontroll-cDNA mithilfe der Immolase-Polymerase durchgeführt (s. 2.2.6).

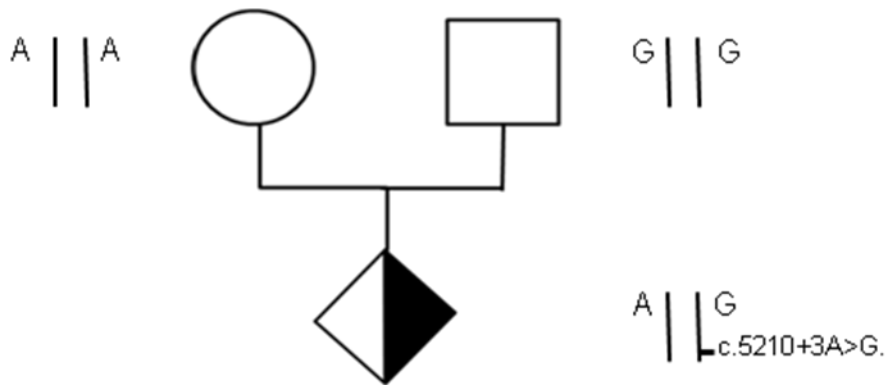


**Abb. 3.22:** PCR-Produkte einer RT-PCR auf einem Agarosegel 1%: [L] Negativkontrolle, [WT] Wildtyp, [Pat] Patient: Neben der Wildtyp-Bande mit einer Länge von 387 Bp zeigte sich ein 2. kürzeres PCR-Produkt (227 Bp).

Bei dem Patienten zeigten sich zwei Banden (387 Bp und 227 Bp), während die Wildtyp-Kontrolle lediglich eine Bande in der erwarteten Größe von 387 Bp aufweist (s. Abbildung 3.22). Die zwei Banden des PCR-Produktes der Patienten-cDNA wurden extrahiert und sequenziert (s. 2.2.12, 2.2.17, 2.2.18). Das kürzere PCR-Produkt musste zunächst hochamplifiziert werden.

Die Sequenzanalyse des kürzeren Produktes zeigt Teilbereiche des Exons 22, an die sich direkt die Sequenz von Exon 24 anschließt. Dieses Ergebnis bestätigt die Vermutung, dass es sich bei der Mutation c.5210+3A>G um eine *Splice-site*-Mutation handelt. Durch den Wegfall dieser *Splice-site* kommt es zu einem Verlust von Exon 23 des Transkriptes.





**Abb. 3.23:** Stammbaum Familie 13: Im aussagekräftigen SNP rs 4526395 ist die Mutter homozygot AA, der Vater GG und das Kind AG. Die Mutation liegt wahrscheinlich auf dem G-Allel.

Nach der Mutationsanalyse wurde mithilfe der Primer SNP CHD7 In21F/R der Intronbereich 21 auf informative SNP untersucht (Produktgröße 1381 Bp). Dabei wurde der SNP rs 4526395 als aussagekräftig gefunden. Für die Klonierung wurde mithilfe der HotStar HiFidelity-DNA-Polymerase ein 2074 Bp großes PCR-Produkt, eingegrenzt von den Primern SNP CHD7 In21F und CHD7 Diag23R, hergestellt. Die Bande im Agarosegel wurde extrahiert und anschließend kloniert. Die Tabelle 3.19 zeigt die Verteilung der Klone.

4 Klone Mutation	A im SNP
14 Klone Wildtyp	A im SNP

**Tab. 3.19:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR des Patienten 13.

Daraufhin erfolgte eine erneute PCR-Produktherstellung, dieses Mal jedoch mit der peqGOLD *Pwo*-DNA-Polymerase. Nach Gelextraktion, Klonierung und Colony-PCR ergab sich das in Tabelle 3.20 genannte Ergebnis.

12 Klone Mutation	G im SNP
2 Klone Mutation	A im SNP
9 Klone Wildtyp	A im SNP
1 Mischklon	

**Tab. 3.20:** Ergebnis der Sequenzierung der Colony-PCR-Produkte des 2.PCR-Produktes des Patienten 13.

Trotz der nicht eindeutigen Ergebnisse lässt sich die Vermutung aufstellen, dass die Mutation auf dem paternalen Allel liegt: Von insgesamt 42 Klonen zeigen 12, dass das väterliche Allel betroffen ist im Verhältnis zu 6 Klonen, die die Möglichkeit darstellen, dass die Mutation auf dem mütterlichen Allel liegt.

### 3.3.2 Familien mit nicht aussagekräftigem Polymorphismus

Bei 17 weiteren Familien konnte kein informativer SNP gefunden werden, der für die Haplotypbestimmung genutzt werden konnte. Die jeweils bei den Familien untersuchten Polymorphismen sind der Tabelle 3.21 zu entnehmen.

Familie	Mutation	verwendete Primer	Produktgröße (Bp)	Bekannte SNP Nicht informativ
14	Ex31 c.6271T>C W2091R	-SNP CHD7 E31- I31F/R	842	rs41265252, rs3763592, rs41312170, rs6999971, rs2068096, rs41312172, rs61753399, rs34527521, rs61729627, rs3814483, rs3829054
15	Ex.11 c.2830C>T p.R947X	-SNP CHD7 Ex9F/R -SNP CHD7 I9-11F/R -SNP CHD7 I12F/R -CHD7 Diag Ex9IntF	1487 1154 741 Seq Seq	rs11782077, rs6471902, rs10098584, rs13271006, rs6997401, rs4509369, rs6986860, rs28539174, rs35924045, rs71559309, rs34157849, rs72348418, rs72029230, rs34150494, rs71750503, rs5891779, rs59147613
16	Ex.22 c.4858C>G p.R1620G	-SNP CHD7 E22- I23F/R -SNP CHD7 Ex22F2/R2	1319 708	rs41265248, rs71640288, rs10957162, rs73254563, rs61737194
17	Ex.9 c.2643T>A p.Y881x	-SNP CHD7 Ex9F/R -SNP CHD7 I12F/R -CHD7 Diag Ex9F/R -CHD7 Diag Ex9 IntF	1487 741 Seq Seq	rs11782077, rs6471902, rs10098584, rs13271006, rs6997401, rs35924045, rs71559309, rs34157849, rs72348418, rs72029230, rs34150494, rs71750503, rs5891779, rs59147613
18	Ex.10 c.2755delG p.Glu919fs	-SNP CHD7 Ex9F/R -SNP CHD7 I9-11F/R -SNP CHD7 I12F/R -CHD7 Diag Ex10R	1487 1154 741 Seq	rs11782077, rs6471902, rs10098584, rs13271006, rs6997401, rs4509369, rs6986860, rs28539174, rs35924045, rs71559309, rs34157849, rs72348418, rs72029230, rs34150494,

Familie	Mutation	verwendete Primer	Produktgröße (Bp)	Bekannte SNP Nicht informativ
				rs71750503, rs5891779, rs59147613
19	Ex.32 c.6936+1G>T	-SNP CHD7 I31F/R -CHD7 Diag Ex32F -SNP CHD7 Ex32R	765 1118	rs59181511, rs3814483, rs3829054, rs10090769, rs61743849, rs61733338, rs7839701, rs13253647
20	Ex33 c.6983dupT	-SNP CHD7 I34F/R -CHD7 Diag Ex34.1F/R	779 395	rs3793443, rs3793444, rs17826359, rs61742801, rs61746518, rs61742801, rs2272727, rs41315633, rs36091844
21	Ex.32 c.6850C>T	-SNP CHD7 I31F/R -CHD7 Diag Ex32F -SNP CHD7 Ex32R	765 1118	rs61743849, rs61733338, rs7839701, rs13253647, rs59181511, rs3814483, rs3829054, rs10090769
22	Ex.2 c.601C>T	CHD7 Diag 2.1F SNP CHD7E2-I2R SNP CHD7 In1.1F CHD7 Diag 2.2R	1926 1649 Seq	rs61742851, rs61995713, rs13248404, rs13284829, rs41305525, rs71640285, rs71640286, rs45536935, rs7836586, rs16926450, rs17825594, rs16926453, rs41272435, rs61742851
23	Ex18 c.4282delG	SNP CHD7 I16-18F SNP CHD7 Ex17R CHD7 Diag Ex18F/R	636 379	rs7005873, rs34488222, rs41304212, rs41265244, rs41265246, rs7844902
24	Ex15 c.3375_3376 delAA	SNP CHD7 In 14F/R SNP CHD7 EX15F/R	1224 1058	rs6996597, rs6996775, rs62526526, rs7016832, rs28667506, rs6997208, rs6997222, rs41272442, rs41306148, rs4507803
25	Ex2 c.1840C>T	SNP CHD7 E2-I2F/R CHD7 Diag Ex2.2R CHD7 Diag Ex2.3R CHD7 Diag Ex2.4R CHD7 Diag Ex2.5F/R SNP CHD7 In2Anf.F/R	1475 Seq Seq Seq Seq 1629	rs61742851, rs61995713, rs13248404, rs13284829, rs41305525, rs71640285, rs71640286, rs45536935, rs7836586, rs41304214, rs7011801, rs12542177
26	Ex2 c.1565G>T,	SNP CHD7 E2-I2F/R CHD7 Diag Ex2.5F/R	1475 Seq	rs61742851, rs61995713, rs13248404, rs13284829,

Familie	Mutation	verwendete Primer	Produktgröße (Bp)	Bekannte SNP Nicht informativ
	p.G522V	SNP CHD7 In2Anf.F/R	1629	rs41305525, rs71640285, rs71640286, rs45536935, rs7836586, rs41304214, rs7011801, rs12542177
27	Ex3 c.1735C>T, p.Q579X	SNP CHD7 IN2E3NeuF CHD7 Diag Ex3.1R CHD7 Diag 3.2F SNP CHD7 In3NeuR	1160   1066	rs7009754, rs6471900, rs6471901, rs11277828, rs45505899, rs62526494, rs34979623
28	Ex2 c.934C>T, p.R312X	SNP CHD7 In1.1F CHD7 Diag 2.2R CHD7 Diag2.3R SNP CHD7E2-I2F/R	1649   1475	rs16926450, rs17825594, rs16926453, rs41272435, rs61742851, rs61995713, rs13248404, rs13284829, rs41305525, rs71640285, rs71640286, rs45536935, rs7836586
29	Ex8 c.2504_2508 delATCTT, p.Y835SfsX14	SNP CHD7 In8F/R	1114	rs35632150, rs7813054, rs13438807
30	Ex21/Int21 c.4844T>C, 4846_4850 +3delTATGGG TA	SNP CHD7 19-21F/R SNP CHD7 20-21F/R	1829 1853	rs62526528, rs11989183, rs13488512, rs71640287, rs4449834, rs4307377, rs4526395

**Tab. 3.21:** Auflistung der untersuchten Polymorphismen in den übrigen 17 Familien. [Seq] Sequenzierprimer, [Ex] Exon

## 4 DISKUSSION

### 4.1 CHD-Familie

Die CHD-Gene kodieren im Allgemeinen für Proteine, die durch ATP-Hydrolyse den Histon-DNA-Kontakt in Nukleosomen, einer Einheit aus ~1,7 DNA-Umwindungen und acht Histonproteinen, verändern und dadurch eine Konformationsänderung des Chromatins bewirken können (Becker und Hörz 2002). Über eine Konformationsänderung des Chromatins hat die Zelle die Möglichkeit, u. a. die Expression einzelner Gene zu kontrollieren (Hall und Georgel 2007). In stark kondensiertem Chromatin (Heterochromatin) ist eine Genexpression nicht möglich, während in gering kondensiertem Chromatin (Euchromatin) eine Transkription des entsprechenden Gens stattfinden kann. Aufgrund ihrer Funktion bilden die CHD-Proteine eine Gruppe von Chromatinremodellern.

Chromatinremodeller oder Chromatin-remodelling-Komplexe können je nach Art Histonoktamere verschieben oder entfernen oder auch einzelne Histone austauschen, um den für die Transkription wichtigen Komponenten – wie der RNA-Polymerase oder bestimmten Transkriptionsfaktoren – den Kontakt zu der DNA zu ermöglichen. Den CHD-Proteinen ist das Vorhandensein von zwei N-terminalen **C**hromodomänen, einer SWI2/ SNF2 ähnlichen ATPase/**H**elicase und einer **D**NA-bindenden Domäne gemeinsam. Die CHD-Genfamilie kann in drei Untergruppen unterteilt werden, da sich einige der CHD-Gene in ihrer Sequenz und dem Vorkommen weiterer Domänen ähneln. Beim Menschen findet man 9 verschiedene CHD-Familienmitglieder, wobei CHD1 und 2 die Subgruppe I, CHD3 und 4 die Subgruppe II und CHD5-9 die Subgruppe III bilden (Hall und Georgel 2007, Marfella und Imbalzano 2007). Mitglieder der Subgruppe III besitzen drei konservierte Regionen CR1-3, eine SANT-Domäne und zwei BRK-Domänen (Flaus et al. 2006) (vgl. Abbildung 1.1). Von anderen Chromatinremodellern ist bekannt, dass diese in großen Chromatin-remodelling-Komplexen ihre Funktionen ausführen (Saha et al. 2006). So ist CHD1 in *Saccharomyces cerevisiae* Bestandteil des SAGA-(**S**pt-**A**da-**G**cn5-**A**cetyltransferase)-und SLIK-(**S**AGA **l**ike)-Komplexes (Pray-Grant et al. 2005), der einen Coaktivator für verschiedene Gene darstellt (Wu et al. 2004). Durch die Ergebnisse von Untersuchungen an Hefen wird angenommen, dass CHD1 die Transkription durch Bindung an Promotorregionen und die Konformationsänderung des Chromatins fördert. In Mäusestammzellen konnte gezeigt werden, dass CHD1 notwendig ist, damit die DNA als Euchromatin vorliegt, in der die DNA transkribiert werden kann (Koh et al. 2010). CHD3 und CHD4 bilden eine Kernkomponente des NuRD-(**N**ucleosome-**r**emodelling-**h**istone-**D**eacetylase)-Komplexes (Hall und Georgel 2007). Der NuRD-Komplex besitzt sowohl eine ATP-abhängige Chromatin-remodelling-Aktivität als auch eine Histon-Deacetylase-Aktivität. Der Komplex ist daran beteiligt, dass

eine Zelle bei schwerwiegenden DNA-Schäden über einen Konzentrationsanstieg an den Proteinen p53 und p21 in die Apoptose geführt wird (Smeenk et al. 2010).

Im Rahmen des CHARGE-Syndroms ist besonders die Betrachtung des *CHD7*-Gens erforderlich.

#### 4.1.1 CHD7

Erstmals im Jahr 2004 wurden im *CHD7*-Gen Mutationen beschrieben, die für die Ausbildung des CHARGE-Syndroms verantwortlich gemacht werden (Vissers et al. 2004). Für CHD7 konnte gezeigt werden, dass es *in vitro* sowohl an mono- als auch dimethylierte Formen des vierten Lysins im Histon 3 (H3K4) bindet als auch damit interagiert (Schnetz et al. 2009). Die Bindungsstellen für CHD7 zeigen zahlreiche Eigenschaften von Enhancer-Elementen, sodass es sich bei CHD7 vermutlich um ein an Enhancerbereiche bindendes Protein handelt (Schnetz et al. 2009). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet, dass CHD7 eine wichtige Rolle bei der Transkriptionsregulation hat. Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass durch CHD7 bzw. CHD7-enthaltende Komplexe der Enhancerbereich in die räumliche Nähe des Promotorbereiches eines Zielgens gebracht wird und dadurch eine Feinmodulierung der Genexpression möglich wird (Schnetz et al. 2009).

Für CHD7 konnte eine Beteiligung in verschiedenen Komplexen nachgewiesen werden: Aufgrund von Studien an embryonalen Mäusestammzellen wird postuliert, dass CHD7 zusammen mit P300, OCT4, SOX2 und Nanog für die Modulation der Genexpression in embryonalen Stammzellen verantwortlich ist (Schnetz et al. 2010). Es ist bekannt, dass CHD7 in humanen multipotenten Zellen der Neuralleiste an Proteine des BAF/PBAF- (Brahma assoziierter Faktor/ Polybromo und BRG1 assoziierter Faktor)-Komplexes bindet (Bajpai et al. 2010). Die Neuralleiste stellt eine embryonale Struktur dar, aus der u. a. sowohl Teile des peripheren Nervensystems als auch knöcherne und muskuläre Strukturen des Schädels entstehen. Die BAF- und PBAF-Komplexe zeigen gewebsspezifische Unterschiede in ihrer Zusammensetzung und üben verschiedene Funktionen während der Embryogenese aus (Trotter und Archer 2008, Ho und Crabtree 2010). Sie gehören zur SWI/ SNF-Familie der ATP-abhängigen Chromatin-remodelling-Komplexe.

Als Bestandteil eines weiteren Komplexes reguliert CHD7 die Osteoblastendifferenzierung über die Beeinflussung von Runx2 (*runt related transcription factor 2*) (Takada et al. 2007, Martin 2010). In diesem Komplex scheint CHD7 eine Ankerfunktion zwischen dem Komplex und der DNA auszuüben. Vermutlich beeinflusst hierbei der Komplex über das Protein HKMT die Transkription durch Methylierung des neunten Lysins am N-terminalen Ende des Histons 3 (Marfella und Imbalzano 2007).

Bisher hat sich gezeigt, dass CHD7 zellspezifisch eine Komponente in verschiedenen Komplexen ist. In der Vergangenheit wurde das CHARGE-Syndrom wie auch z. B. das DiGeorge-Syndrom zu den Neurocrestopathien gezählt, weil bereits 1985 erkannt wurde, dass bei der Erkrankung Strukturen betroffen sind, die sich aus der Neuralleiste entwickeln (Siebert et al. 1985). Zu den Neurocrestopathien zählen verschiedene Krankheitsbilder, die auf Störungen der Migration und Interaktion von Zellpopulationen der Neuralleiste zurückzuführen sind. Aus der Neuralleiste entwickeln sich u. a. die Ganglienzellen verschiedener Hirnnerven (N. oculomotorius, N. trigeminus, N. facialis, N. vestibulocochlearis, N. glossopharyngeus, N. vagus) (Sadler 2003). Schäden in der Ausbildung dieser Ganglienzellen können zu den beim CHARGE-Syndrom auftretenden Symptomen wie z. B. Fazialisparese, Innenohrschwerhörigkeit oder Störungen im Schluckakt führen. Andere Zellen der Neuralleiste sind an der Ausbildung der embryonalen Aortenbögen, des membranösen Teils des Herzseptums, der Semilunarklappen und der regelhaften Anknüpfung der großen Herzgefäße an das Herz beteiligt (Kirby und Waldo 1990, Creazzo et al. 1998). Fehlentwicklungen dieser Strukturen während der Embryogenese können zu komplexen Herzfehlern führen, die beim CHARGE-Syndrom gehäuft auftreten können.

Zum weiteren Verständnis der Pathogenese des CHARGE-Syndroms sollte es Ziel zukünftiger Forschungsprojekte sein, die CHD7-enthaltenden Komplexe weiter zu differenzieren. Außerdem ergibt sich die Fragestellung, welche Gene durch CHD7 selbst oder einen CHD7-enthaltenden Komplex beeinflusst werden und welche Funktion diesen Genen zugeschrieben wird. Sind diese Gene sog. Schlüsselgene für einen in der Embryogenese spezifischen Signalweg?

In unserer Arbeitsgruppe wurde als möglicher Interaktionspartner von CHD7 ein weiteres Mitglied der Subgruppe III gefunden.

#### **4.1.2 CHD 8**

*CHD8* gehört zur Subgruppe III der CHD-Gen-Familie und liegt auf dem Chromosom 14q11.2. Es enthält 38 Exons und kodiert für ein 2302 Aminosäuren umfassendes Protein. In unserer Arbeitsgruppe wurde in einem *yeast two hybrid library screen* CHD8 als putativer Interaktionspartner von CHD 7 detektiert. Die Interaktion zwischen CHD7 und CHD8 konnte durch verschiedene Methoden wie direktem *yeast two hybrid*, Co-Immunpräzipitation und bimolekulare Fluoreszenzkomplementation bestätigt werden. Die Ergebnisse lassen die Annahme zu, dass die beiden Proteine sowohl direkt als auch indirekt über Brückenproteine interagieren (Batsukh et al. 2010).



Bei der Fruchtfliege *Drosophila melanogaster* gibt es nur ein Gen der CHD-Subgruppe III: *kismet*. Es ähnelt dem menschlichen *CHD7*-Gen oder anderen Mitgliedern der Subgruppe III und kodiert bei der Fruchtfliege für zwei Isoformen. *Kismet* wird auch eine Funktion in der Regulation der Transkription zugeschrieben (Srinivasan et al. 2008, Rodríguez-Paredes et al. 2009). Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Funktion von *kismet* beim Menschen auf die CHD-Gene der Subgruppe III (CHD Gene 5-9) aufgeteilt ist (Rodríguez-Paredes et al. 2009).

In der Literatur wird beschrieben, dass CHD8 an den Zink-Finger-Transkriptionsfaktor ZNF143 binden kann (Yuan et al. 2007) und so die Expression von U6-Genen beeinflusst. U6-Gene kodieren für ribosomale RNA, die u. a. als Teil des Spleißosoms für die Entfernung der Introns aus der prä-mRNA und für die anschließende Verknüpfung der Exons verantwortlich ist (Wahl et al. 2009). Dieser Vorgang wird als Spleißen bezeichnet. Weiterhin wirkt CHD8 auf die Expression von beta-Catenin-Zielgenen (Thompson et al. 2008). *In vitro* bindet CHD8 an dimethylierte Formen des vierten Lysins im Histon 3 (H3K4), und außerdem kontrolliert es die Expression von Cyclin E2 und der Thymidylat-Synthetase (Rodríguez-Paredes et al. 2009). Für murines CHD8 konnte gezeigt werden, dass es an CTCF bindet. CTCF fungiert als Transkriptionsfaktor und kann an Insulatoren binden, die z. B. Enhancer blockieren können (Ishihara et al. 2006).

Außerdem interagiert CHD8 mit dem MLL1 (*mixed lineage leukemia*)/-WDR5-Komplex. Dieser Komplex ist an der Regulierung von *HoxA2* beteiligt. *HoxA2* selbst kodiert für einen Transkriptionsfaktor, der besonders wichtig für die Regulation der Zelldifferenzierung und Entwicklung ist. Bei Anwesenheit von CHD8 kommt es zu einer Down-Regulation der *HoxA2*-Transkription (Yates et al. 2010).

MLL2 kann wie MLL1 auch an den WAR-Komplex binden (Thompson et al. 2008, Dou et al. 2005). Heterozygote Mutationen im *MLL2*-Gen führen zum Kabuki-Syndrom (Ng et al. 2010, Hannibal et al. 2011). Charakteristisch für dieses Dysmorphiesyndrom sind auffällig lange Lidspalten, ein medialer Epikanthus, hohe bogige Augenbrauen mit spärlicher Behaarung im lateralen Drittel, eine breite eingesunkene Nasenspitze, häufig dysplastisch große, abstehende Ohren und eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte. U. a. sind Kinder mit Kabuki-Syndrom häufig kleinwüchsig, sind mental retardiert und weisen vielfältige Fehlbildungen im Urogenitaltrakt, am Herzen, am Skelett oder an den Augen auf (Niikawa et al. 1981 und 1988, Hannibal et al. 2011). Das heißt, bei dieser Erkrankung zeigen Organsysteme Fehlbildungen, die auch beim CHARGE-Syndrom betroffen sind (Schulz et al. 2014). Es ergibt sich aufgrund der ähnlichen Symptomatik der beiden Syndrome die Frage, ob CHD8 und MLL2 durch die jeweilige Komplexbildung mit dem WAR-Komplex die gleichen Zielgene beeinflussen.

Über andere Erkrankungen ist bekannt, dass Interaktionspartner eines krankheitsverursachenden Proteins ebenfalls zum selben Phänotyp führen können, wenn ein Defekt im Interaktionspartner vorliegt. Es werden z. B. beim Cornelia-de-Lange-Syndrom hauptsächlich Mutationen in den Cohesin-Regulatoren NIPBL und ESCO2 für die Erkrankung verantwortlich gemacht; aber auch Mutationen in weiteren Komponenten des Cohesin-Komplexes (SMC1A und SMC3) führen zu einem milde ausgeprägten Phänotyp (Deardorff et al. 2007).

So wurde *CHD8* als Kandidatengen für die Entstehung des CHARGE-Syndroms postuliert. Die Untersuchung von 25 *CHD7*-negativen CHARGE-Patienten erbrachte keinen Nachweis von Mutationen im *CHD8*-Gen (s. 3.2.1). Neale et al. (2012) sowie O'Roak et al. (2012) beschrieben *de novo*- *missense*- sowie *loss of function*-Mutationen im *CHD8*-Gen bei an Autismus erkrankten Patienten. Betroffene CHARGE-Patienten zeigen in über 2/3 der Fälle auch autistische Verhaltensweisen (Betancur 2011). Somit wird die Hypothese unterstützt, dass ein *CHD7*- und *CHD8*-enthaltender Proteinkomplex bestimmte zellspezifische Zielgene reguliert. Im Rahmen der Forschungsarbeit wurde ein weiteres Gen entdeckt, welches einen Interaktionspartner von *CHD7* in diesem Proteinkomplex darstellen könnte.

## 4.2 FAM124B

In der Arbeitsgruppe wurde mithilfe von SILAC (*stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) das Protein Fam124B entdeckt, welches in einem *CHD7*- und *CHD8*-enthaltenden Komplex zu finden ist (Batsukh et al. 2012). Über die möglichen Funktionen von FAM124B im Organismus liegen keine Publikationen vor.

Fam124B gibt es z. B. bei Schimpanse, Hund, Kuh, Maus, Ratte, Huhn, Zebrafisch und weiteren Spezies. Das humane *FAM124B* liegt auf dem Chromosom 9 (9q33.3).

Bei der Maus konnte die Expression von *Fam124B* in verschiedenen Geweben wie Gehirn, Herz, Niere, Lunge und Hoden nachgewiesen werden, also in Organen, die auch beim CHARGE-Syndrom betroffen sein können (Batsukh et al. 2012). Die Expressionsanalyse für *FAM124B* in verschiedenen menschlichen Organen ist deshalb sinnvoll.

Beim Menschen sind zwei Isoformen bekannt: Isoform a, aus Exon 1 und 3 bestehend, und Isoform b mit Exon 1 und 2. Die Isoform a entspricht weitgehend dem murinen Transkript. *FAM124B* wurde im Rahmen eines Kandidatengenscreenings getestet.

Es konnten zwar keine pathogenen Mutationen bei der Sequenzanalyse von *FAM124B* (s. 3.2.2) nachgewiesen werden, doch ist die Testung von weiteren *CHD7*-negativen CHARGE-

Patienten angezeigt, da möglicherweise nur bei einem kleinen Prozentsatz der CHARGE-Patienten eine *FAM124B*-Mutation ursächlich für die Symptomatik ist. Weiterhin sind Funktionsstudien zum *Fam124B* notwendig, um eine mögliche Rolle in der Pathogenese des CHARGE-Syndroms zu erfassen.

#### 4.3 **FAM124B-Polymorphismus im Exon 3, c.612C>T**

In der Genetik wird von einem Polymorphismus gesprochen, wenn innerhalb einer Population ein oder mehrere Allele der gleichen Gensequenz vorliegen. Dabei muss die Allelfrequenz in dieser Population grösser als 1 % sein. Ansonsten spricht der Genetiker von dem Vorliegen einer Mutation.

Im vorliegenden Fall waren ein CHARGE-Patient und 2 Goldenhar-Patienten heterozygot CT im Exon 3 an der Stelle c.612. Die Untersuchung der Wildtyp-Kontrollen zeigte, dass dieser Nukleotidaustausch auch in der gesunden Population mit einer Wahrscheinlichkeit von 10 % heterozygot vorliegt. Es ergibt sich die Frage, wieso in den Wildtyp-Kontrollen keine Homozygotie TT vorkommt. Einerseits kann die Anzahl der Kontrollen zu gering sein, andererseits ist es denkbar, dass solche Menschen Symptome aufweisen und daher nicht in einem Kollektiv gesunder Personen zu finden sind.

#### 4.4 **Ursachen für die Entstehung von Neumutationen**

Neumutationen sind Mutationen, die in den Keimzellen der Eltern oder in den Körperzellen spontan entstehen. Beim CHARGE-Syndrom liegen in der Mehrzahl der Fälle solche *de novo*-Mutationen vor. Nur wenige familiäre Fälle sind in der Literatur beschrieben, bei denen ein Elternteil entweder ebenfalls ein CHARGE-Syndrom in milder Ausprägung, ein somatisches Mosaik oder ein Gonadenmosaik aufweist (Lalani et al. 2006, Jongmans et al. 2006 und 2008, Delahaye et al. 2007, Wincent et al. 2008, Pauli et al. 2009). Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Ergebnisse zeigen, dass in 12 von 13 sporadischen Fällen (92,3 %) eine Mutation im *CHD7*-Gen das paternale Allel betrifft (s. 3.3.1). Bei dem Patienten mit der Indexnummer 12 betrifft die Mutation c.3059T>C hingegen das maternale Allel. Ob es sich bei diesem Fall möglicherweise nicht um eine *de novo*-Mutation handelt, sondern die Mutter ein Gonadenmosaik aufweist, kann nicht ausgeschlossen werden. Insgesamt zeigte sich jedoch, dass es sich beim CHARGE-Syndrom um eine Erkrankung handelt, bei der die Mutationen überwiegend in der männlichen Keimbahn entstehen (Pauli et al. 2012).

Bei zahlreichen weiteren autosomal dominant vererbten Erkrankungen konnte ebenfalls eine Zuordnung der jeweiligen Mutation zum väterlichen Allel gemacht werden (s. Tabelle 4.1). So wurde z. B. für Neumutationen im *FGFR2*-Gen, welche für das Apert-, Crouzon- oder Pfeiffer-Syndrom verantwortlich gemacht werden, ausschließlich die paternale Herkunft nachgewiesen (Moloney et al. 1996, Glaser et al. 2000). Auch Mutationen im *FGFR3*-Gen, welche zur klinischen Ausprägung der Achondroplasie führen, liegen nur im paternalen Allel (Wilkin et al. 1998). Ebenso konnte beim Noonan-Syndrom die rein paternale Herkunft von *de novo*- Mutationen im *PTPN11*-Gen belegt werden (Tartaglia et al. 2004).

Vererbte Krankheiten	paternal	maternal	Alterseffekt
Apert-Syndrom	X		X
Achondroplasie	X		X
Crouzon-Syndrom	X		X
Pfeiffer-Syndrom	X		X
Multiple endokrine Neoplasie 2A	X		X
Noonan-Syndrom	X		X
Tuberöse Sklerose	X	X	X
Neurofibromatose 2	X	X	
Keratitis-Ichthyosis-Taubheitssyndrom	X	X	
Campomelie-Dysplasie	X	X	
Timothy-Syndrom	X	X	
Townes-Brocks-Syndrom	X	X	
Hippel-Lindau-Syndrom	X	X	
RETT-Syndrom (XR)	X	X	

**Tab 4.1:** Auswahl von autosomal dominant und X-chromosomal vererbten Krankheitsbildern: Nachweis von Mutationen im paternalen oder maternalen Allel [XR]: x-chromosomal rezessiv. Die anderen genannten Erkrankungen werden autosomal dominant vererbt (Mulligan et al. 1994, Richards et al. 1995, Cameron et al. 1996, Moloney et al. 1996, Wohlík et al. 1996, Schuffenecker et al. 1997, Wilkin et al. 1998, Glaser et al. 2000, Trappe et al. 2001, Tiemann-Boege et al. 2002, Splendore et al. 2003, Engel et al. 2004, Splawski et al. 2004, Tartaglia et al. 2004, Böhm et al. 2006, Mazereeuw-Hautier et al. 2007).

Auch für die Multiple Endokrine Neoplasie 2A (MEN 2A) konnte in insgesamt 10 untersuchten Familien die paternale Herkunft von Neumutationen im *RET*-Protoonkogen gezeigt werden (Mulligan et al. 1994, Wohllk et al. 1996, Schuffenecker et al. 1997). Für andere autosomal dominant vererbte Krankheiten wie das Townes-Brocks-Syndrom konnte nachgewiesen werden, dass die *de novo*-Mutationen vorwiegend im paternalen Allel liegen (Böhm et al. 2006).

Bisher sind keine Erkrankungen bekannt, bei denen *de novo*-Mutationen ausschließlich das maternale Allel betreffen.

Daher wurde nach verschiedenen Erklärungen für das bevorzugte Auftreten von *de novo*-Mutationen im paternalen Allel gesucht. Beim Mann hat sich eine Spermatogonie bis zur Pubertät 30-mal geteilt und danach 23-mal pro Jahr. Bis zur endgültigen Entstehung eines Spermiums erfolgen weitere Teilungen. Je älter ein Mann ist, desto mehr Zellteilungen sind in den Spermatogonien bereits erfolgt. So gehen z. B. die Spermien eines 20-jährigen Mannes aus 150 Zellteilungen und DNA-Replikationen hervor, bei einem 40-jährigen aus 610 Zellteilungen (Engel et al. 2004). Da es in der Spermatogenese viel mehr Zellteilungen im Vergleich zur Oogenese gibt, bei der die Eizellen von Geburt an in ihrer gesamten Zahl angelegt sind, vermutete Penrose bereits 1955, dass Neumutationen gehäuft in männlichen Keimzellen vorkommen, da während der Replikation Kopierfehler auftreten können (Penrose 1955). In der Regel werden solche Kopierfehler durch verschiedene Reparaturmechanismen erfolgreich behoben oder die betroffene Zelle wird in die Apoptose, den programmierten Zelltod, geführt (Engel et al. 2004). Aufgrund abnehmender Reparaturkapazitäten des alternden Mannes würden die Mutationen in den Spermien im Verlauf des Lebens akkumulieren und so zu einem linearen Anstieg und einem paternalen Alterseffekt führen. Zum einen zeigte sich jedoch, dass der Alterseffekt nicht linear, sondern exponentiell ansteigt, zum anderen gibt es Erkrankungen, bei denen zwar die Mutationen das paternale Allel betreffen, aber ein Alterseffekt nicht zu beobachten ist (Arnheim und Calabrese 2009). Daraus ergibt sich, dass es weitere Faktoren geben muss, die einen Einfluss auf die Entstehung von Neumutationen in der männlichen Keimbahn haben.

Es ist bekannt, dass die Spermien-DNA einen höheren Methylierungsgrad aufweist als die DNA der Eizellen (Driscoll und Migeon 1990). Sog. CpG-Inseln (Cytosin-phosphatidyl-Guanin), die u. a. Teil der epigenetischen Genregulation darstellen, sind sehr empfindlich gegenüber spontaner Deamination zu Thyminen (Duncan und Miller 1980). Solche Fehler werden häufig toleriert und eine Mutation ist entstanden. Die Mutationen in den Familien mit der Indexnummer 1, 4, 7 und 8 zeigen jeweils einen Austausch von Cytosin zu Thymin und liegen jeweils auf dem paternalen Allel; hiermit unterstützen sie diese Hypothese (Pauli et al. 2012).

Auch der verstärkte Methylierungsgrad im paternalen X-Chromosom im Vergleich zum X-Chromosom in der Oozyte wird bei X-chromosomal dominant vererbten Erkrankungen, wie z. B. für das Rett-Syndrom, als mögliche Ursache für eine erhöhte Rate an Neumutationen in den männlichen Keimzellen gesehen (Goto und Monk 1998). In 26 von 27 Fällen konnten Trappe et al. einen paternalen Ursprung von Neumutationen im *MECP2*-Gen nachweisen (Trappe et al. 2001).

Als weitere Ursache für die Lokalisation der Mutation im väterlichen Allel wird ein Selektionsvorteil der mutierten Spermien gegenüber den gesunden Spermien postuliert. Dies wurde in der Vergangenheit vor allem bei *Gain-of-function*-Mutationen beobachtet. So führen z. B. beim Noonan-Syndrom Mutationen im *PTPN11*-Gen, die ca. 50% der für diese Erkrankung verantwortlichen Mutationen ausmachen (Tartaglia et al. 2001), zu einer erhöhten Signaltransduktion über den Ras-MAP-Kinase-Weg (Tartaglia et al. 2004). Die MAP-Kinasen stellen eine Familie von Kinasen dar, die zu einer Aktivierung von bestimmten Genen führen, welche die Proliferation und Differenzierung von Zellen oder die Apoptose beeinflussen (Robinson und Cobb 1997). Auch den in der Literatur beschriebenen Mutationen im *FGFR2*- und *FGFR3*-Gen, die zur Ausprägung des Apert-, Crouzon-, Pfeiffer-Syndrom und der Achondroplasie führen, wird ein Selektionsvorteil gegenüber gesunden Spermien zugeschrieben (Glaser et al. 2003, Goriely et al. 2003). Es wird vermutet, dass die mutierten Spermien besonders in ihrer Motilität und der Kapazitation den nicht mutierten Spermien überlegen sind (Glaser und Jabs 2004).

Ob Mutationen im *CHD7*-Gen für die betroffenen Spermien ebenfalls einen Selektionsvorteil bewirken, ist bisher unklar.

## 4.5 Alterseffekte

Es ist allgemein bekannt, dass insbesondere in den Industriestaaten das Alter der Eltern bei Zeugung eines Kindes in den letzten Jahrzehnten durch den Fortschritt der Medizin angestiegen ist. Diese Entwicklung birgt aber gewisse Gefahren in sich, da mit Zunahme des Alters der Frau das Risiko für die Geburt eines Kindes mit einer Chromosomenanomalie steigt, während beim Mann mit zunehmenden Alter das Risiko für das Auftreten von Neumutationen in der Keimbahn steigt.

### 4.5.1 Paternales Alter

In der Literatur konnte für verschiedene Erkrankungen eine Abhängigkeit vom paternalen Alter nachgewiesen werden. Dieses sind zum großen Teil Daten, die sich auf autosomal dominante oder X-chromosomal rezessive Neumutationen beziehen (s. Tabelle 4.1). So

konnte z. B. für die Achondroplasie, das Apert-, das Crouzon- oder auch das Pfeiffer-Syndrom, MEN2A und 2B ein paternaler Alterseffekt belegt werden (Carlson et al. 1994, Schuffenecker et al. 1997, Wilkin et al. 1998, Glaser et al. 2000 und 2003, Tiemann-Boege et al. 2002).

Daher sollte im Rahmen der Doktorarbeit geprüft werden, ob es beim CHARGE-Syndrom ebenfalls einen paternalen Alterseffekt gibt. In der Untersuchung der 30 CHARGE-Patienten konnte kein erhöhtes väterliches Zeugungsalter nachgewiesen werden. Im Mittel waren die Väter bei Zeugung  $32.92 \pm 5.14$  Jahre alt. Verglichen mit Daten des Statistischen Bundesamtes Deutschland waren die Männer 33.89 Jahre im Jahr 2003 (Statistisches Bundesamt 2010). Es zeigt sich also kein signifikanter Unterschied zwischen dem väterlichen Alter unserer Kohorte und der allgemeinen männlichen deutschen Population.

In der Literatur wurde zuvor ein erhöhtes väterliches Zeugungsalter beim CHARGE-Syndrom durch Tellier et al. (1996) beschrieben. Die Auswahl der Patienten mit CHARGE-Syndrom erfolgte ausschließlich nach klinischen Kriterien. Mutationsanalysen waren damals nicht möglich. Es ist daher zu vermuten, dass in das Kollektiv von Tellier et al. (1996) auch Patienten mit anderen Erkrankungen eingeflossen sind und der festgestellte Alterseffekt zufällig ist.

#### **4.5.2 Maternales Alter**

Für das Auftreten von numerischen Chromosomenaberrationen wie z. B. bei der Trisomie 21 ist bereits seit 1933 bekannt, dass das Risiko mit zunehmendem Alter der Mutter bei Zeugung ansteigt (Penrose 1933 und 1934). Während bei einer Frau im Alter von 20 Jahren das Risiko  $1/1500$  beträgt, steigt es bis zum 45. Lebensjahr auf  $1/30$ . Zur Erklärung dieser Tatsache wurden bisher verschiedene Hypothesen aufgestellt: Während die Oozyten bis zur Befruchtung in einer langen Ruhephase verweilen, können sich Chiasmata vorzeitig lösen. Die homologen Chromosomen können als solche nicht mehr erkannt werden, und es kann eine Fehlverteilung der Chromosomen folgen. Am häufigsten werden hierbei die homologen Chromosomen nicht geteilt (Buselmaier und Tariverdian 2006).

Als mögliche Auslöser für meiotisches *Non-disjunction* werden Faktoren wie die Akkumulation von toxischen Effekten bei der alternden Frau oder die erhöhte Wahrscheinlichkeit für mitochondriale Mutationen verantwortlich gemacht (Jansen und De Boer 1998, Van Blerkom et al. 1998, Schon et al. 2000).

Wie auch für andere autosomal dominante Erkrankungen konnte ein maternaler Alterseffekt ebenso in unserer Kohorte für das CHARGE-Syndrom nicht gezeigt werden. Das mütterliche Alter unserer Kohorte war  $29 \pm 4.26$  Jahre. Verglichen mit Werten des Statistischen

---

Bundesamtes aus dem Jahr 2003 waren Frauen zum Zeitpunkt der Geburt eines Kindes 29.86 Jahre alt (Statistisches Bundesamt 2010).

Zusammenfassend konnte im Rahmen dieser Arbeit gezeigt werden, dass die zum CHARGE-Syndrom führenden *CHD7*-Mutationen bevorzugt in der männlichen Keimbahn entstehen. Es konnte weder ein maternaler noch ein paternaler Alterseffekt beobachtet werden. Zudem wurde vermutet, dass mehrere Mechanismen zur Mutationsentstehung in der männlichen Keimbahn beitragen. Für einen Teil der Patienten ist die Hypermutableität der methylierten CpG-Inseln der Spermien-DNA ein möglicher Grund. Weitere Studien sind nötig, um die einzelnen Mechanismen genau zu charakterisieren. Insbesondere die Frage nach einem Selektionsvorteil für Spermatozoen mit einer *CHD7*-Mutation bleibt zu klären.



## 5 Literaturverzeichnis

**Arnheim N, Calabrese P (2009):** Understanding what determines the frequency and pattern of human germline mutations. *Nat Rev Genet* 10(7), 478-488.

**Bajpai R, Chen DA, Rada-Iglesias A, Zhang J, Xiong Y, Helms J, Chang CP, Zhao Y, Swigut T, Wysocka J (2010):** CHD 7 cooperates with PBAF to control multipotent neural crest formation. *Nature* 463, 958-962.

**Bartels CF, Scacheri C, White L, Scacheri PC, Bale S (2010):** Mutations in the CHD7 Gene: The Experience of a Commercial Laboratory. *Genet Test Mol Biomarkers* 14(6), 881–891.

**Batsukh T, Pieper L, Koszucka AM, von Velsen N, Hoyer-Fender S, Elbracht M, Bergman JE, Hoefsloot LH, Pauli S (2010):** CHD8 interacts with CHD7, a protein which is mutated in CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet* 19(14), 2858-2866.

**Batsukh T, Schulz Y, Wolf S, Rabe TI, Oellerich T, Urlaub H, Schaefer IM, Pauli S (2012):** Identification and characterization of FAM124B as a novel component of a CHD7 and CHD8 containing complex. *PLoS One* 7(12), e52640.

**Becker PB, Hörz W (2002):** ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem* 71, 247-273.

**Bergman JE, Janssen N, Hoefsloot LH, Jongmans MC, Hofstra RM, van Ravenswaaij-Arts CM (2011):** CHD7 mutations and CHARGE syndrome: the clinical implications of an expanding phenotype, *J Med Genet* 48(5), 334-342.

**Betancur C (2011):** Etiological heterogeneity in autism spectrum disorders: more than 100 genetic and genomic disorders and still counting. *Brain Res* 1380, 42-77.

**Blake KD, Davenport SL, Hall BD, Hefner MA, Pagon RA, Williams MS, Lin AE, Graham JM Jr. (1998):** CHARGE association: an update and review for the primary pediatrician. *Clin Pediatr* 37, 159-173.

**Böhm J, Munk-Schulenburg S, Felscher S, Kohlhase J (2006):** SALL1 mutations in sporadic Townes-Brocks syndrome are of predominantly paternal origin without obvious paternal age effect. *Am J Med Genet A* 140(18), 1904-1908.

**Bosman EA, Penn AC, Amborse JC, Kettleborough R, Stemple DL, Steel KP (2005):** Multiple mutations in mouse Chd7 provide models for CHARGE syndrome. *Hum Mol Genet* 14, 3463-3476.

**Buselmaier W, Tariverdian G:** Humangenetik für Biologen. Springer Verlag, Heidelberg 2006, S. 110f.

**Cameron FJ, Hageman RM, Cooke-Yarborough C, Kwok C, Goodwin LL, Sillence DO, Sinclair AH (1996):** A novel germ line mutation in SOX9 causes familial campomelic dysplasia and sex reversal. *Hum Mol Genet* 5(10), 1625-1630.

**Carlson KM, Bracamontes J, Jackson CE, Clark R, Lacroix A, Wells SA Jr, Goodfellow PJ (1994):** Parent-of-origin effects in multiple endocrine neoplasia type 2B. *Am J Hum Genet* 55(6), 1076-1082.

**Creazzo TL, Godt RE, Leatherbury L, Conway SJ, Kirby ML (1998):** Role of cardiac neural crest cells in cardiovascular development. *Annu Rev Physiol* 60, 267-286.

**Deardorff MA, Kaur M, Yaeger D, Rampuria A, Korolev S, Pie J, Gil-Rodríguez C, Arnedo M, Loeyls B, Kline AD (2007):** Mutations in Cohesin Complex Members SMC3 and SMC1A Cause a Mild Variant of Cornelia de Lange Syndrome with Predominant Mental Retardation. *Am J Hum Genet* 80(3), 485-494.

**Delahaye A, Sznajder Y, Lyonnet S, Elmaleh-Bergès M, Delpierre I, Audollent S, Wiener-Vacher S, Mansbach AL, Amiel J, Baumann C (2007):** Familial CHARGE syndrome because of CHD7 mutation: clinical intra- and interfamilial variability. *Clin Genet* 72(2), 112-121.

**Den Dunnen JT, Antonarakis SE (2000):** Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion. *Hum Mutat* 15(1), 7-12.

**Dou Y, Milne TA, Tackett AJ, Smith ER, Fukuda A, Wysocka J, Allis CD, Chait BT, Hess JL, Roeder RG (2005):** Physical association and coordinate function of the H3 K4 methyltransferase MLL1 and H4 K16 acetyltransferase MOF. *Cell* 121(6), 873-885.

**Driscoll DJ, Migeon BR (1990):** Sex difference in methylation of single-copy genes in human meiotic germ cells: implications for X chromosome inactivation, parental imprinting, and origin of CpG mutations. *Somat Cell Mol Genet* 16(3), 267-282.

**Duncan BK, Miller JH (1980):** Mutagenic deamination of cytosine residues in DNA. *Nature* 287(5782), 560-561.

**Engel W, Sancken U, Laccone F (2004):** Das väterliche Alter aus humangenetischer Sicht. *J Reproduktionsmed Endokrinol* 1(4), 263-267.

**Flaus A, Martin DM, Barton GJ, Owen-Hughes T (2006):** Identification of multiple distinct Snf2 subfamilies with conserved structural motifs. *Nucleic Acids Res* 31, 2887-2905.

**Glaser RL, Jabs EW (2004):** Dear old dad. *Sci Aging Knowledge Environ* (3), re1.

**Glaser RL, Jiang W, Boyadjiev SA, Tran AK, Zachary AA, Van Maldergem L, Johnson D, Walsh S, Oldridge M, Wall SA (2000):** Paternal origin of FGFR2 mutations in sporadic cases of Crouzon syndrome and Pfeiffer syndrome. *Am J Hum Genet* 66(3), 768-777.

**Glaser RL, Broman KW, Schulman RL, Eskenazi B, Wyrobek AJ, Jabs EW (2003):** The paternal-age effect in Apert syndrome is due, in part, to the increased frequency of mutations in sperm. *Am J Hum Genet* 73(4), 939-947.

**Goriely A, Mc Vean GA, Røjmyr M, Ingemarsson B, Wilkie AO (2003):** Evidence for selective advantage of pathogenic FGFR2 mutations in the male germ line. *Science* 301(5633), 643-646.

**Goto T, Monk M (1998):** Regulation of X-chromosome inactivation in development in mice and humans. *Microbiol Mol Biol Rev* 62, 362-378.

**Hall BD (1979):** Choanal atresia and associated multiple anomalies. *J Pediatr* 95, 395-398.

**Hall JA, Georgel PT (2007):** CHD proteins: a diverse family with strong ties. *Biochem Cell Biol* 85(4), 463-476.

**Hanahan D:** Techniques for transformation of *E. coli*. In: Glover DM (ed.): *DNA cloning: a practical approach*. Vol. 1 Mc Lean, IRL Press, Oxford 1985, 109-135.

**Hannibal MC, Buckingham KJ, Ng SB, Ming JE, Beck AE, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Bigham AW, Tabor HK, Mefford HC (2011):** Spectrum of MLL2 (ALR) mutations in 110 cases of Kabuki syndrome. *Am J Med Genet A* 155A(7), 1511-1516.

**Hittner HM, Hirsch NJ, Kreh GM, Rudolph AJ (1979):** Colobomatous microphthalmia, heart disease, hearing loss, and mental retardation – a syndrome. *J. Pediatr Ophthalmol Strabismus* 16(2), 122-128.

**Ho L, Crabtree GR (2010):** Chromatin remodelling during development. *Nature* 463(7280), 474-484.

**Ishihara K, Oshimura M, Nakao M (2006):** CTCF-dependent chromatin insulator is linked to epigenetic remodeling. *Mol Cell* 23(5), 733-742.

**Issekutz KA, Grahman JM Jr, Prasad C, Smith IM, Blake KD (2005):** An epidemiological analysis of CHARGE Syndrome: preliminary results from a Canadian study. *Am J Med Genet A* 133A(3), 309-317.

**Jansen RP, De Boer K (1998):** The bottleneck: mitochondrial imperatives in oogenesis and ovarian follicular fate. *Mol Cell Endocrinol* 145, 81-88.

**Janssen N, Bergman JE, Swertz MA, Tranebjaerg L, Lodahl M, Schoots J, Hofstra RM, van Ravenswaaij-Arts CM, Hoefsloot LH (2012):** Mutation update on the CHD7 gene involved in CHARGE syndrome. *Hum Mutat* 8, 1149-1160.

**Jongmans MC, Admiraal RJ, van der Donk KP, Vissers LE, Baas AF, Kapusta L, van Hagen JM, Donnai D, de Ravel TJ, Veltman JA (2006):** CHARGE syndrome: the phenotypic spectrum of mutations in the CHD7 gene. *J Med Genet* 43, 306-314.

**Jongmans MC, Hoefsloot LH, van der Donk KP, Admiraal RJ, Magee A, van de Laar I, Hendriks Y, Verheij JB, Walpole I, Brunner HG (2008):** Familial CHARGE-Syndrome and the CHD7 gene: a recurrent missense mutation, intrafamilial recurrence and variability. *Am J Med Genet A* 146A, 43-50.

**Kirby ML, Waldo K (1990):** Role of neural crest in congenital heart disease. *Circulation* 82(2), 332-340.

**Koh FM, Sachs M, Guzman-Ayala M, Ramalho-Santos M (2010):** Parallel gateways to pluripotency: open chromatin in stem cells and development. *Curr Opin Genet Dev* 20(5), 492-499.

**Lalani SR, Safiullah AM, Fernbach SD, Harutyunyan KG, Thaller C, Peterson LE, McPherson JD, Gibbs RA, White LD, Hefner M (2006):** Spectrum of CHD7 mutations in 110 individuals with CHARGE syndrome and genotype-phenotype correlation. *Am J Hum Genet* 78(2), 303-314.

**Marfella CG, Imbalzano AN (2007):** The Chd family of chromatin remodelers. *Mutat Res* 618, 30-40.

**Martin DM (2010):** Chromatin remodeling in development and disease: focus on CHD7. *PLoS Genet* 6(7), e1001010.

**Mazereeuw-Hautier J, Bitoun E, Chevrant-Breton J, Man SY, Bodemer C, Prins C, Antille C, Saurat JH, Atherton D, Harper JI (2007):** Keratitis-ichthyosis-deafness syndrome: disease expression and spectrum of connexin 26 (GJB2) mutations in 14 patients. *Br J Dermatol* 156(5), 1015-1019.

**Moloney DM, Slaney SF, Oldridge M, Wall SA, Sahlin P, Stenman G, Wilkie AO (1996):** Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome. *Nat Genet* 13 (1), 48-53.

**Mulligan LM, Eng C, Healey CS, Clayton D, Kwok JB, Gardner E, Ponder MA, Frilling A, Jackson CE, Lehnert H (1994):** Specific mutations of the RET proto-oncogene are related to disease phenotype in MEN 2A and FMTC. *Nat Genet* 6(1), 70-74.

**Mullis KB, Faloona F (1987):** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155, 335-350.

**Neale BM, Kou Y, Liu L, Ma'ayan A, Samocha KE, Sabo A, Lin CF, Stevens C, Wang LS, Makarov V (2012):** Patterns and rates of exonic de novo mutations in autism spectrum disorders. *Nature* 485(7397), 242-245.

**Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI, Beck AE, Tabor HK, Cooper GM, Mefford HC (2010):** Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet* 42(9), 790-793.

**Niikawa N, Matsuura N, Fukushima Y, Ohsawa T, Kajii T (1981):** Kabuki make-up syndrome: a syndrome of mental retardation, unusual facies, large and protruding ears, and postnatal growth deficiency. *J Pediatr* 99(4), 565-569.

**Niikawa N, Kuroki Y, Kajii T, Matsuura N, Ishikiryama S, Tonoki H, Ishikawa N, Yamada Y, Fujita M, Umemoto H (1988):** Kabuki make-up (Niikawa-Kuroki) syndrome: a study of 62 patients. *Am J Med Genet* 31(3), 565-589.

**O'Roak BJ, Vives L, Girirajan S, Karakoc E, Krumm N, Coe BP, Levy R, Ko A, Lee C, Smith JD (2012):** Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature* 485(7397), 246-250.

**Pagon RA, Graham JM Jr, Zonana J, Yong SL (1981):** Coloboma, congenital heart disease, and choanal atresia with multiple anomalies: CHARGE association. *J Pediatr* 99(2), 223-227.

**Pauli S, Pieper L, Häberle J, Grzmil P, Burfeind P, Steckel M, Lenz U, Michelmann HW (2009):** Proven germline mosaicism in a father of two children with CHARGE syndrome. *Clin Genet* 75, 473-479.

**Pauli S:** Die funktionelle Rolle des CHD7-Proteins – Einblicke in aktuelle Forschungsarbeiten. In: Das CHARGE-Syndrom. Ein Fachbuch für Mediziner, Pädagogen, Therapeuten, Eltern und Betroffene. 2. Auflage; Median Verlag, Heidelberg 2010, 21-29.

**Pauli S, von Velsen N, Burfeind P, Steckel M, Mänz J, Buchholz A, Borozdin W, Kohlhase J (2012):** CHD7 mutations causing CHARGE syndrome are predominantly of paternal origin. *Clin Genet* 81(3), 234-239.

**Penrose LS (1933):** The relative effect of paternal and maternal age in mongolism. *J Genet* 27, 219-224.

**Penrose LS (1934):** The relative aetiological importance of birth order and maternal age in mongolism. *Proceedings of the Royal Society (Biology)* 115, 431-450.

**Penrose L (1955):** Parental age and mutation. *Lancet* 269(6885), 312-313.

**Pray-Grant MG, Daniel JA, Schieltz D, Yates JR 3<sup>rd</sup>, Grant PA (2005):** Chd 1 chromodomain links histone H3 methylation with SAGA-and SLIK-dependent acetylation. *Nature* 27, 434-438.

**Richards FM, Payne SJ, Zbar B, Affara NA, Ferguson-Smith MA, Maher ER (1995):** Molecular analysis of de novo germline mutations in the von Hippel-Lindau disease gene. *Hum Mol Genet* 3(11), 2139-2143.

**Robinson MJ, Cobb MH (1997):** Mitogen-activated protein kinase pathways. *Curr Opin Cell Biol* 9(2), 180-186.

**Rodríguez-Paredes M, Ceballos-Chávez M, Esteller M, García-Domínguez M, Reyes JC (2009):** The chromatin remodeling factor CHD8 interacts with the elongating RNA polymerase II and controls expression of the cyclin E2 gene. *Nucleic Acids Res* 37, 2449-2460.

**Sadler, TW:** Medizinische Embryologie, 10.Auflage; Thieme, Stuttgart 2003, S. 420-422.

**Saha A, Wittmeyer J, Cairns BR (2006):** Chromatin remodelling: the industrial revolution of DNA around histones. *Nat Rev Mol Cell Biol* 7, 437-447.

**Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:** Molecular cloning: a laboratory manual. 2nd edn; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York 1989.

**Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA* 74(12), 5463-5467.

**Sanlaville D, Etchevers HC, Gonzales M, Martinovic J, Clément-Ziza M, Delezoide AL, Aubry MC, Pelet A, Chemouny S, Cruaud C (2006):** Phenotypic spectrum of CHARGE syndrome in fetuses with CHD7 truncating mutations correlates with expression during human development. *J Med Genet* 43(3), 211-217.

**Schnetz MP, Bartels CF, Shastri K, Balasubramanian D, Zentner GE, Balaji R, Zhang X, Song L, Wang Z, LaFramboise T (2009):** Genomic distribution of CHD7 on Chromatin tracks H3K4 Methylation patterns. *Genom Res* 19, 590-601.

**Schnetz MP, Handoko L, Akhtar-Zaidi B, Bartels CF, Pereira CF, Fisher AG, Adams DJ, Flicek P, Crawford GE, Laframboise T (2010):** CHD7 targets active gene enhancer elements to modulate ES cell-specific gene expression. *PLoS Genet* 6(7), e1001023.

**Schon EA, Kim SH, Ferreira JC, Magalhães P, Grace M, Warburton D, Gross SJ (2000):** Chromosomal non-disjunction in human oocytes: is there a mitochondrial connection? *Hum Reprod* 15 Suppl 2, 160-172.

**Schuffenecker I, Ginet N, Goldgar D, Eng C, Chambe B, Boneu A, Houdent C, Pallo D, Schlumberger M, Thivolet C (1997):** Prevalence and parental origin of de novo RET mutations in multiple endocrine neoplasia type 2A and familial medullary thyroid carcinoma. *Am J Hum Genet* 60(1), 233-237.



**Schulz Y, Freese L, Mänz J, Zoll B, Völter C, Brockmann K, Bögershausen N, Becker J, Wollnik B, Pauli S (2014):** CHARGE and Kabuki syndromes: a phenotypic and molecular link. *Hum Mol Genet* 23(16), 4396-4405.

**Siebert JR, Graham JM Jr, MacDonald C (1985):** Pathologic features of the CHARGE association: support for involvement of the neural crest. *Teratology* 31(3), 331-336.

**Smeenk G, Wiegant WW, Vrolijk H, Solari AP, Pastink A, van Attikum H (2010):** The NuRD chromatin-remodeling complex regulates signaling and repair of DNA damage. *J Cell Biol* 190(5), 741-749.

**Splawski I, Timothy KW, Sharpe LM, Decher N, Kumar P, Bloise R, Napolitano C, Schwartz PJ, Joseph RM, Condouris K (2004):** Ca(V)1.2 calcium channel dysfunction causes a multisystem disorder including arrhythmia and autism. *Cell* 119(1), 19-31.

**Splendore A, Jabs EW, Félix TM, Passos-Bueno MR (2003):** Parental origin of mutations in sporadic cases of Treacher Collins syndrome. *Eur J Hum Genet* 11(9), 718-722.

**Srinivasan S, Dorigi KM, Tamkun JW (2008):** Drosophila Kismet regulates histone H3 lysine 27 methylation and early elongation by RNA polymerase II. *PLoS Genet* 4(10), e1000217.

**Statistisches Bundesamt (2010):** Durchschnittliches Alter der Eltern bei der Geburt ihrer lebendgeborenen Kinder nach der Legitimität 1991-2009. Wiesbaden. Auf Anfrage am 18.01.2011 per email erhalten.

**Takada I, Mihara M, Suzawa M, Ohtake F, Kobayashi S, Igarashi M, Youn MY, Takeyama K, Nakamura T, Mezaki Y (2007):** A histone lysine methyltransferase activated by non-canonical Wnt signalling suppresses PPAR-gamma transactivation. *Nat Cell Biol* 9(11), 1273-1285.

**Tartaglia M, Mehler EL, Goldberg R, Zampino G, Brunner HG, Kremer H, van der Burgt I, Crosby AH, Ion A, Jeffery S (2001):** Mutations in PTPN11, encoding the protein tyrosine phosphatase SHP-2, cause Noonan syndrome. *Nat Genet* 29(4), 465-468.

**Tartaglia M, Cordeddu V, Chang H, Shaw A, Kalidas K, Crosby A, Patton MA, Sorcini M, van der Burgt I, Jeffery S, Gelb BD (2004):** Paternal germline origin and sex-ratio distortion in transmission of PTPN11 mutations in Noonan syndrome. *Am J Hum Genet* 75(3), 492-497.

**Tellier AL, Lyonnet S, Cormier-Daire V, de Lonlay P, Abadie V, Baumann C, Bonneau D, Labrune P, Lacombe D, Le Merrer M (1996):** Increased paternal age in CHARGE association. *Clin Genet* 50(6), 548-550.

**Thompson BA, Tremblay V, Lin G, Bochar DA (2008):** CHD8 is an ATP-dependent chromatin remodeling factor that regulates beta-catenin target genes. *Mol Cell Biol* 28, 3894-3904.

**Tiemann-Boege I, Navidi W, Grewal R, Cohn D, Eskenazi B, Wyrobek AJ, Arnheim N (2002):** The observed human sperm mutation frequency cannot explain the achondroplasia paternal age effect. *Proc Natl Acad Sci USA* 99(23), 14952-14957.

**Trappe R, Laccone F, Cobilanschi J, Meins M, Huppke P, Hanefeld F, Engel W (2001):** MECP2 mutations in sporadic cases of Rett syndrome are almost exclusively of paternal origin. *Am J Hum Genet* 68(5), 1093-1101.

**Trotter KW, Archer TK (2008):** The BRG1 transcriptional coregulator. *Nucl Recept Signal* 6, e004.

**Van Blerkom J, Sinclair J, Davis P (1998):** Mitochondrial transfer between oocytes: potential applications of mitochondrial donation and the issue of heteroplasmy. *Hum Reprod* 13, 2857-2868.

**Verloes A (2005):** Updated diagnostic criteria for diagnosis of CHARGE syndrome: a proposal. *Am J Med Genet* 133, 306-308.

**Vissers LE, van Ravenswaaij CM, Admiraal R, Hurst JA, de Vries BB, Janssen IM, van der Vliet WA, Huys EH, de Jong PJ, Hamel BC (2004):** Mutations in a new member of the chromodomain gene family cause CHARGE syndrome. *Nat Genet* 36(9), 955-957.

**Wahl MC, Will CL, Lührmann R (2009):** Review: The Spliceosome: Design Principles of a Dynamic RNP Machine. *Cell* 136(4), 701-718.

**Wilkin DJ, Szabo JK, Cameron R, Henderson S, Bellus GA, Mack ML, Kaitila I, Loughlin J, Munnich A, Sykes B (1998):** Mutations in fibroblast growth-factor receptor 3 in sporadic cases of achondroplasia occur exclusively on the paternally derived chromosome. *Am J Hum Genet* 63(3), 711-716.

**Wincent J, Holmberg E, Strömland K, Soller M, Mirzaei L, Djureinovic T, Robinson K, Anderlid B, Schoumans J (2008):** CHD 7 mutation spectrum in 28 swedish patients diagnosed with CAHRGE syndrome. *Clin Genet* 74(1), 31-38.

**Wohlk N, Cote GJ, Bugalho MM, Ordonez N, Evans DB, Goepfert H, Khorana S, Schultz P, Richards CS, Gagel RF (1996):** Relevance of RET proto-oncogene mutations in sporadic medullary thyroid carcinoma. *J Clin Endocrinol Metab* 81(10), 3740-3745.

**Wu PY, Ruhlmann C, Winston F, Schultz P (2004):** Molecular architecture of the *S. cerevisiae* SAGA complex. *Mol Cell* 15(2), 199-208.

**Yates JA, Menon T, Thompson BA, Bochar DA (2010):** Regulation of HOXA2 gene expression by the ATP-dependent chromatin remodeling enzyme CHD8. *FEBS Letters* 584(4), 689-693.

**Yuan CC, Zhao X, Florens L, Swanson SK, Washburn MP, Hernandez N (2007):** CHD8 associates with human Staf and contributes to efficient U6 RNA polymerase III transcription. *Mol Cell Biol* 27(24), 8729-8738.

**Zentner GE, Layman WS, Martin DM, Scacheri PC (2010):** Molecular and Phenotypic aspects of CHD7Mutation in CHARGE Syndrome. *Am J Med Genet* 152A, 674-686.

