Aus dem Institut für Humangenetik
der Universität zu Lübeck
Direktorin: Prof. Dr. med. Gabriele Gillessen-Kaesbach

Mutationssuche im *NPHP1-*, *CEP290-* und *TMEM67*-Gen bei Patienten mit Joubert-Syndrom

Inaugural–Dissertation
zur
Erlangung der Doktorwürde
der Universität zu Lübeck
– Aus der Sektion Medizin –

vorgelegt von

Sarah-Kathrine Frost

aus Hannover

Lübeck 2012

1. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Yorck Hellenbroich
2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Ansgar Thümen
Tag der mündlichen Prüfung: 13.12.2012
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den 13.12.2012
- Promotionskommission der Sektion Medizin -

Für Hilke Margrethe Nebendahl

Inhaltsverzeichnis

Abbildungsverzeichnis **IV**

Tabellenverzeichnis **V**

1. Einleitung **1**

1.1. Das *Molar Tooth Sign* 2
1.2. Ziliopathien 2
1.3. Genetische Ursachen 3
1.3.1. Joubert-Syndrom Typ 1 (JBTS1, *INNP5E*) 5
1.3.2. Joubert-Syndrom Typ 2 (JBTS2, *TMEM216*) 5
1.3.3. Joubert-Syndrom Typ 3 (JBTS3, *AHI1*) 5
1.3.4. Joubert-Syndrom Typ 4 (JBTS4, *NPHP1*) 6
1.3.5. Joubert-Syndrom Typ 5 (JBTS5, *CEP290*) 7
1.3.6. Joubert-Syndrom Typ 6 (JBTS6, *TMEM67*) 8
1.3.7. Joubert-Syndrom Typ 7 (JBTS7, *RPGRIP1L*) 9
1.3.8. Joubert-Syndrom Typ 8 (JBTS8, *ARL13B*) 9
1.3.9. Joubert-Syndrom Typ 9 (JBTS9, *CC2D2A*) 10
1.3.10. Joubert-Syndrom Typ 10 (JBTS10, *OFD1*) 10
1.3.11. Joubert-Syndrom Typ 11 (JBTS11, *TTC21B*) 11
1.3.12. Joubert-Syndrom Typ 12 (JBTS12, *KIF7*) 11
1.3.13. Joubert-Syndrom Typ 13 (JBTS13, *TCTN1*) 12
1.3.14. Joubert-Syndrom Typ 14 (JBTS14, *TMEM237*) 12
1.3.15. Joubert-Syndrom Typ 15 (JBTS15, *CEP41*) 13
1.3.16. Übersicht Joubert-Syndrom Typ 1-15 13
1.4. Zielsetzung der Arbeit 14

2. Material und Methoden **15**

2.1. Allgemeine Materialien 15
2.2. Geräte 16
2.3. Software 16
2.4. Chemikalien 17
2.5. Lösungen 18

2.6. Primer . . . 18
2.7. DNA-Proben . . . 18
2.8. Die Polymerase-Kettenreakion (PCR) . . . 19
2.8.1. Prinzip . . . 19
2.8.2. Durchführung . . . 19
2.9. Agarosegel-Elektrophorese . . . 22
2.9.1. Prinzip . . . 22
2.9.2. Durchführung . . . 22
2.10. DNA-Sequenzierung mittels Didesoxynukleotidverfahren . . . 23
2.10.1. Prinzip . . . 23
2.10.2. Durchführung . . . 24

3. Ergebnisse **26**
3.1. Auswertung der *NPHP1*-Analyse . . . 26
3.2. Auswertung der *CEP290*-Analyse . . . 27
3.2.1. Sequenzierung des *CEP290*-Gens . . . 27
3.2.2. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Mutationen . . . 31
3.2.3. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Polymorphismen . . . 31
3.2.4. Phänotyp der Patienten mit Mutationen im CEP290-Gen . . . 32
3.2.5. Tabellarische Übersicht der Phänotypen von Patienten mit Mutationen im *CEP290*-Gen . . . 34
3.3. Auswertung der *TMEM67*-Analyse . . . 35
3.3.1. Sequenzierung des *TMEM67*-Gens . . . 35
3.3.2. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Mutationen . . . 39
3.3.3. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Polymorphismen . . . 40
3.3.4. Phänotyp der Patienten mit Mutationen im *TMEM67*-Gen . . . 40
3.3.5. Tabellarische Übersicht der Phänotypen von Patienten mit Mutationen im *TMEM67*-Gen . . . 43

4. Diskussion **44**
4.1. *NPHP1*-Gen . . . 45
4.2. *CEP290*-Gen . . . 47
4.2.1. Aufbau und Funktion des CEP290-Proteins (NPHP6) und Lokalisation der gefundenen Mutationen . . . 47
4.2.2. Mutationen im *CEP290*-Gen . . . 48
4.2.3. Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit Mutationen im *CEP290*-Gen . . . 52
4.2.4. Erklärungsansätze für Patienten mit nur einer heterozygoten Mutation im *CEP290*-Gen . . . 54

4.2.5. Polymorphismen im *CEP290*-Gen 55
4.3. *TMEM67*-Gen 57
4.3.1. Aufbau und Funktion des TMEM67-Proteins (Meckelin) und Lokalisation der gefundenen Mutationen 57
4.3.2. Mutationen im *TMEM67*-Gen 58
4.3.3. Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit Mutationen im *TMEM67*-Gen 64
4.3.4. Polymorphismen im *TMEM67*-Gen 64
4.4. Diagnostisches Vorgehen beim Verdacht auf ein Joubert-Syndrom 66
4.4.1. Erklärungsansätze für Patienten, bei denen keine Mutation gefunden werden konnte 67

5. Zusammenfassung 70

6. Literaturverzeichnis 72
6.1. Zeitschriftenverzeichnis 72
6.2. Bücherverzeichnis 81
6.3. Elektronische Datenbanken 81

7. Danksagung 82

8. Lebenslauf 83
8.1. Eigene Veröffentlichungen 84

A. Anhang 85
A.1. Glossar 85
A.2. Abkürzungsverzeichnis 89
A.3. Buchstabencode für Aminosäuren 92
A.4. Primer für *NPHP1*-PCR 92
A.5. Primer für *CEP290*-PCR 93
A.6. Primer für *CEP290*-Sequenzierung 96
A.7. Primer für *TMEM67*-PCR 96
A.8. PCR-Zyklen der einzelnen *CEP290*-Exons 98
A.9. PCR-Zyklen der einzelnen *TMEM67*-Exons 99
A.10. Erklärung zum Ethikantrag 100

Abbildungsverzeichnis

1.1. Das *Molar Tooth Sign* 2
1.2. Aufbau nichtmotiler und motiler Zilien 4

3.1. Agarosegel mit Auswertung der Multiplex-PCR vom *NPHP1*-Gen. 26
3.2. Sequenzausschnitt von Exon 10 des *CEP290*-Gens bei Patient 16. 27
3.3. Sequenzausschnitt von Exon 17 des *CEP290*-Gens bei Patient 5. 28
3.4. Sequenzausschnitt von Exon 17 des *CEP290*-Gens bei Patient 19. 28
3.5. Sequenzausschnitt von Exon 19 des *CEP290*-Gens bei Patient 11. 29
3.6. Sequenzausschnitt von Exon 21 des *CEP290*-Gens bei Patient 2. 29
3.7. Sequenzausschnitt von Exon 22 des *CEP290*-Gens bei Patient 14. 30
3.8. Sequenzausschnitt von Exon 41 des *CEP290*-Gens bei Patient 14. 30
3.9. Sequenzausschnitt von Exon 43 des *CEP290*-Gens bei Patient 19. 31
3.10. Sequenzausschnitt von Exon 2 des *TMEM67*-Gens bei Patient 6. 35
3.11. Sequenzausschnitt von Exon 6 des *TMEM67*-Gens bei Patient 22. 36
3.12. Sequenzausschnitt von Exon 8 des *TMEM67*-Gens bei Patient 2. 36
3.13. Sequenzausschnitt von Exon 11 des *TMEM67*-Gens bei Patienten 2 und 22. . 37
3.14. Sequenzausschnitt von Exon 11 des *TMEM67*-Gens bei Patient 2. 37
3.15. Sequenzausschnitt von Exon 11 des *TMEM67*-Gens bei Patient 23. 37
3.16. Sequenzausschnitt von Exon 13 des *TMEM67*-Gens bei Patient 6. 38
3.17. Sequenzausschnitt von Exon 18 des *TMEM67*-Gens bei Patienten 2 und 22. . 38
3.18. Sequenzausschnitt von Exon 24 des *TMEM67*-Gens bei Patienten 2 und 22. . 39

4.1. Schema des NPHP1-Proteins 45
4.2. Schema des CEP290-Proteins (NPHP6) und Lokalisation der bei unseren Patienten identifizierten Mutationen 47
4.3. Schema des TMEM67-Proteins und Lokalisation der bei unseren Patienten identifizierten Mutationen 57
4.4. Schema des *TMEM67*-Gens mit den bei unseren Patienten identifizierten Mutationen 57
4.5. Vorschlag für eine gezielte Stufendiagnostik 68

Tabellenverzeichnis

1.1. Übersicht Joubert-Syndrom Typ 1-15 13

2.1. Liste der verwendeten allgemeinen Produkte und deren Hersteller. 15
2.2. Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller. 16
2.3. Liste der verwendeten Programme und der herausgebenden Firmen. 16
2.4. Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller. 17
2.5. Liste der verwendeten Lösungen und deren Bestandteile. 18
2.6. PCR-Schema für das *NPHP1*-Gen 20
2.7. PCR-Zyklus für das *NPHP1*-Gen 21
2.8. PCR-Schema für das *CEP290*-Gen 21
2.9. PCR-Zyklus für das *CEP290*-Gen 21
2.10. PCR-Zyklus für das *TMEM67*-Gen 22
2.11. Ablauf der ExoSap-Methode 24
2.12. Zyklus der Sequenzierung nach Sanger 25

3.1. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Mutationen in *CEP290*. 31
3.2. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Polymorphismen in *CEP290*. . 31
3.3. Tabellarische Übersicht der Phänotypen bei Patienten mit Mutationen im *CEP290*-Gen 34
3.4. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Mutationen in *TMEM67*. . . . 39
3.5. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Polymorphismen in *TMEM67*. 40
3.6. Tabellarische Übersicht der Phänotypen bei Patienten mit Mutationen im *TMEM67*-Gen 43

1. Einleitung

Kleinhirnfehlbildungen zählen zu den häufigsten Entwicklungsstörungen des menschlichen Gehirns. Ein Syndrom, das mit Fehlbildungen des Kleinhirns einhergeht, ist das Joubert-Syndrom. Es tritt mit einer Häufigkeit von etwa 1:100.000 auf (Harris, 2007), wobei es keine sicheren epidemiologischen Erhebungen gibt.

Das Joubert-Syndrom wurde erstmals 1969 von der Neuropädiaterin Marie Joubert beschrieben. Sie berichtete über vier betroffene Geschwisterkinder von konsanguinen Eltern einer großen französisch-kanadischen Familie und vermutete daher als Ursache des Syndroms einen autosomal rezessiven Erbgang. Die betroffenen Kinder zeigten eine Agenesie des Kleinhirnwurms, fielen in der Säuglingsperiode durch Atemstörungen mit Phasen der Hyperpnoe in Kombination mit Apnoephasen auf, zeigten eine muskuläre Hypotonie und hatten Augenbewegungsstörungen, dabei vor allem Nystagmen. Im Verlauf wurden bei den Kindern eine Ataxie und eine mentale Retardierung deutlich. Zusätzlich hatte eines der Kinder eine okzipitale Meningoenzephalozele. Von den vier Geschwisterkindern starb eines im Alter von drei Monaten, ein anderes mit 30 Monaten (Joubert et al., 1969).

Acht Jahre später berichteten Boltshauser und Isler von drei weiteren Kindern mit demselben Phänotyp und nannten dieses Krankheitsbild Joubert-Syndrom (Boltshauser und Isler, 1977). In den darauf folgenden Jahren wurden unter der Bezeichnung Joubert-Syndrom viele weitere Fälle publiziert, bei denen eine Agenesie oder Hypoplasie des Kleinhirnwurms sowie auch die anderen Kardinalzeichen, wie episodische Tachy- und Apnoen in der Neugeborenenphase, Hypotonie, Augenbewegungsstörungen, Ataxie und eine mentale Retardierung auffielen. Neben diesen ursprünglich beschriebenen Symptomen wurde aber auch von weiteren ophthalmologischen, nephrologischen und hepatischen Auffälligkeiten berichtet, wie zum Beispiel chorioretinalen Kolobomen (Lindthout et al., 1980), Netzhautdystrophien (Aicardi et al., 1983), Zystennieren (King et al., 1984), und Leberfibrosen oft mit erhöhten Leberenzymen und einer Hepatomegalie (Lewis et al., 1994).

Das Joubert-Syndrom weist klinisch überlappende Zeichen zu anderen bekannten syndromalen Erkrankungen auf. Darunter das COACH-Syndrom (cerebellar vermis hypoplasia, oligophrenia, ataxia, coloboma and hepatic fibrosis), das Senior-Løken-Syndrom, das Bardet-Biedl-Syndrom, das Meckel (Gruber) -Syndrom und das Dekaban-Arima-Syndrom

(Beschreibung der einzelnen Syndrome im Glossar). Diese Syndrome werden unter dem Begriff *Joubert Syndrome and Related Disorders* (JSRD) zusammengefasst. Für Erkrankungen mit der Kombination aus Kleinhirn-, Augen- und Nierenfehlbildungen wird der Überbegriff Cerebello-okulo-renales Syndrom verwendet.

1.1. Das *Molar Tooth Sign*

Das wesentliche diagnostische Merkmal bei Patienten mit Verdacht auf Joubert-Syndrom ist das *Molar Tooth Sign* (MTS), das in der kraniellen Bildgebung zu sehen ist. Es wurde erstmals 1997 von Maria et al. beschrieben. In der Studie wurden 15 Kinder mit der klinischen Diagnose Joubert-Syndrom neuroradiologisch untersucht. Dabei fiel die backenzahnähnliche Konfiguration des Mittelhirns in axialen MRT-Schnittbildern auf. Diese kommt durch eine Vermishypoplasie oder -agenesie in Zusammenhang mit einer vertieften Fossa interpeduncularis und verlängerten und verbreiterten Kleinhirnstielen zustande (Maria et al., 1997).

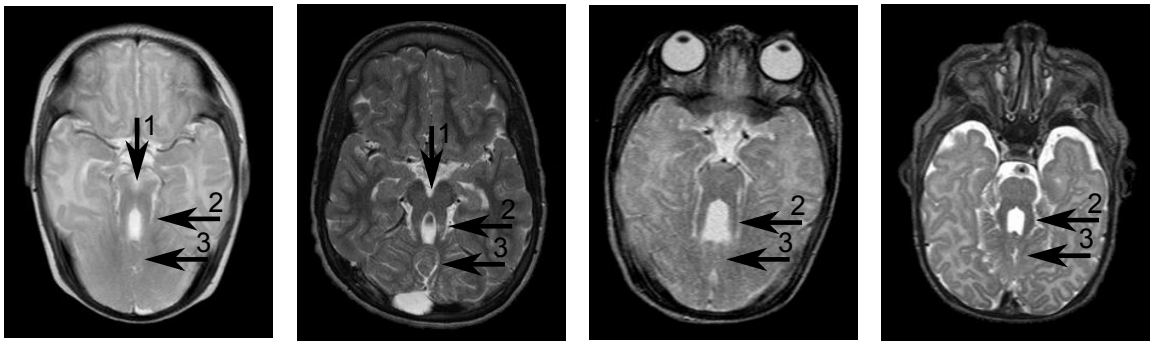


Abbildung 1.1. Verschiedene Ausprägungen des *Molar Tooth Signs* in axialen cMRT-Bildern von Patient 14, 23, 2 und 8 (von links nach rechts). Pfeil 1 zeigt dabei auf die vertiefte Fossa interpeduncularis, Pfeil 2 auf die verlängerten und verbreiterten Kleinhirnstiele und Pfeil 3 auf die Vermishypoplasie.

Im Rahmen einer Nachuntersuchung im Jahre 1999 konnte auch bei dem jüngsten der ursprünglich von Joubert et al. beschriebenen Geschwister ein MTS nachgewiesen werden (Andermann et al., 1999).

1.2. Ziliopathien

Das Joubert-Syndrom zählt zusammen mit anderen Erkrankungen, wie der primär ziliären Dyskinesie, der polyzystischen Nierenerkrankung und der Nephronophthise zu den Ziliopathien. Zilien sind feine Zellfortsätze, die mit ihrem Basalkörper (Kinetosom) im

apikalen Zytoplasma verankert sind. Im menschlichen Organismus übernehmen sie verschiedenste Aufgaben. So dienen sie als Mechano-, Chemo- und Osmorezeptoren und spielen für Entwicklungsprozesse eine wichtige Rolle.

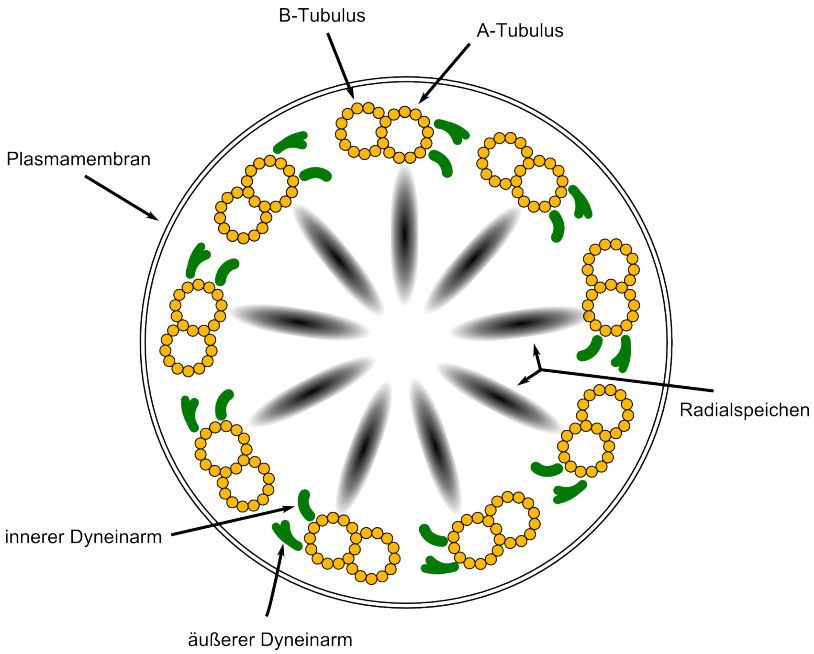
Unterschieden werden dabei bewegliche Zilien (motile Zilien) von unbeweglichen (nichtmotilen) Zilien, die zum Teil auch als primäre Zilien bezeichnet werden. Die meisten Zilien gehören zu den nichtmotilen Zilien. Man findet sie unter anderem in Niere, Leber, Augen, Ohren und dem zentralen Nervensystem. Hier beeinflussen sie die Entwicklung der Achsendeterminierung, Links-Rechts-Symmetrie, sowie die Ausbildung von Gliedmaßen und orofazialen Strukturen (Harris et al., 2009). Dagegen kommen motile Zilien zum Beispiel in der Trachea oder den Adnexen vor, wo sie für den Transport von Mukus und Schmutzpartikeln aus den Atemwegen bzw. für den Transport der Eizelle in den Uterus zuständig sind. Motile und nichtmotile Zilien unterscheiden sich aber nicht nur in ihrer Lokalisation und Funktion, sondern auch in ihrem Aufbau voneinander.

Beiden gemeinsam ist eine äußere Plasmamembran, in der das Axonem liegt, das von Mikrotubuli gebildet wird. Die Mikrotubuli sind bei nichtmotilen Zilien nach dem 9x2+0-Muster angeordnet. Das bedeutet, dass am Rand des Ziliums neun Doppeltubuli zirkulär verteilt liegen. Motile Zilien besitzen zusätzlich zwei zentrale Tubuli, sind also nach dem 9x2+2-Schema aufgebaut (Green, 2010). Eine Ausnahme bilden dabei die Kinozilien des Innenohrs. Diese gehören zu den nichtmotilen Zilien, sind aber nach dem 9x2+2-Schema aufgebaut. Dagegen werden die nodalen Zilien des Embryos den motilen Zilien zugeordnet, haben aber ein 9x2+0-Muster (Omran und Olbrich, 2010).

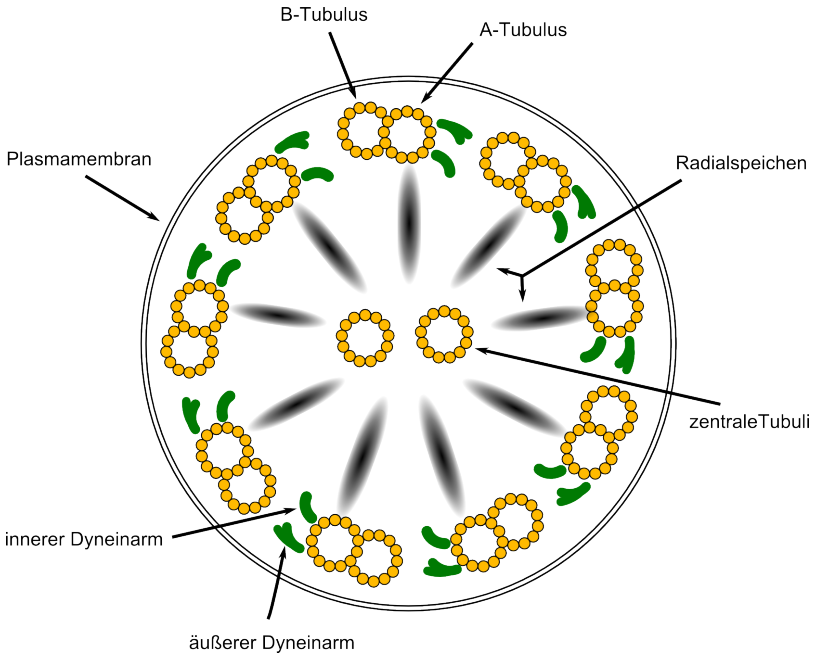
Tritt ein Funktionsverlust nichtmotiler Zilien auf, liegt also eine Ziliopathie vor, so können Entwicklungsstörungen aller möglichen nichtmotiler Zilien tragender Organe die Folge sein. Daher ist das phänotypische Spektrum sehr weit. Mittlerweile wurde eine Vielzahl von Genen gefunden, die für Proteine kodieren, die in nichtmotilen Zilien lokalisiert sind. Dazu gehören unter anderem alle fünfzehn Gene, die derzeit als Ursache des Joubert-Syndroms identifiziert wurden.

1.3. Genetische Ursachen

Die genetischen Ursachen der JSRDs sind sehr heterogen. 1999 wurde der erste Genort für das Joubert-Syndrom lokalisiert. Mittlerweile sind fünfzehn Gene als Auslöser des Syndroms bekannt. Nach ihnen werden die verschiedenen Typen des Joubert-Syndroms (JBTS1-15) unterschieden. Viele der Gene sind zusätzlich für andere, zum Teil verwandte, Krankheitsbilder ursächlich.



(a) Nichtmotile Zilie.



(b) Motile Zilie.

Abbildung 1.2. Aufbau nichtmotiler und motiler Zilien (nach: Omran und Olbrich, 2010). Nichtmotile Zilie mit 9x2+0-Muster und motile Zilie mit 9x2+2-Schema. Beiden gemeinsam sind die zirkulär verteilten neun Doppeltubuli. Motile Zilien besitzen zusätzlich zwei zentrale Tubuli.

1.3.1. Joubert-Syndrom Typ 1 (JBTS1, *INNP5E*)

Dieser erste identifizierte Genort liegt auf Chromosom 9q34.3. Er wurde 1999 von Saar et al. mittels *Homozygosity Mapping* in einer konsanguinen Familie aus dem Iran lokalisiert, bei der vier Kinder den Phänotyp eines Joubert-Syndroms aufwiesen (Saar et al., 1999). Im Verlauf wurde auch bei anderen Patienten eine Verbindung zu dieser Region gefunden (Valente et al., 2005). 2009 konnten bei Mitgliedern von sieben betroffenen Familien mit Joubert-Syndrom fünf verschiedene homozygote Mutationen im *INPP5E*-Gen (*Inositol polyphosphate-5-phosphatases*) als Ursache des Syndroms nachgewiesen werden. *INPP5E* ist in primären Zilien in den Organen, die hauptsächlich vom Joubert-Syndrom betroffen sind, lokalisiert. Alle Mutationen waren *Missense*-Mutationen und betrafen die katalytische Domäne des Proteins. Die betroffenen Proteine zeigten eine verminderte 5-Phosphatase-Aktivität (Bielas et al., 2009). Vor kurzem wurde eine weitere Mutation im *INNP5E*-Gen gefunden. Hierbei handelte es sich um eine *Nonsense*-Mutation, die in einer Familie mit MORM-Syndrom (***m**ental retardation, truncal **o**besity, **r**etinal dystrophy, **m**icropenis*) nachgewiesen wurde (Jacoby et al., 2009).

1.3.2. Joubert-Syndrom Typ 2 (JBTS2, *TMEM216*)

Dieser Genort liegt auf Chromosom 11p12-q13. Er wurde ursprünglich in Familien mit einer okulorenalen Form des Joubert-Syndroms lokalisiert (Keeler et al., 2003). 2010 konnten erstmals Mutationen im *TMEM216*-Gen (*Transmembrane protein 216*) als Ursache des Joubert-Syndroms gefunden werden. Bei 13 betroffenen Mitgliedern aus acht Ashkenazi-jüdischen Familien wurde eine homozygote Mutation (R12L in Exon 3) nachgewiesen. Die Patienten mit JBTS2 waren moderat bis schwer mental retardiert und zeigten eine muskuläre Hypotonie. Mit Ausnahme eines Patienten lag bei allen eine Augenbewegungsstörung vor, wobei sich meist ein rotatorischer Nystagmus zeigte. Nur zwei Patienten hatten eine Beteiligung der Nieren. Bei einem Teil der Patienten wurde auch eine Polydaktylie oder ein Dolichozephalus beschrieben (Edvardson et al., 2010). Das *TMEM216*-Gen kodiert für ein Protein bestehend aus 87 Aminosäuren mit zwei Transmembrandomänen. Die Funktion dieses Proteins ist noch ungeklärt.

1.3.3. Joubert-Syndrom Typ 3 (JBTS3, *AHI1*)

2004 wurde dieser Genort erstmalig mittels *Homozygosity Mapping* in zwei großen konsanguinen Familien aus der Türkei und der Schweiz auf Chromosom 6q23.3 lokalisiert (Lagier-Tourenne et al., 2004). Nur ein paar Monate später konnten pathogene Mutationen im *AHI1*-Gen (*Abelson helper integration site 1*) von zwei unabhängigen Forschungsgruppen

als Auslöser des Joubert-Syndroms identifiziert werden. Eine Arbeitsgruppe untersuchte Patienten aus drei konsanguinen Familien und fand insgesamt drei Mutationen, eine *Missense*- und zwei *Frameshift*-Mutationen (Dixon-Salazar et al., 2004). Die andere Gruppe konnte ebenfalls drei Mutationen im *AHI1*-Gen nachweisen (Ferland et al., 2004). Mittlerweile wurde eine große Anzahl von Patienten mit Joubert-Syndrom auf Mutationen im *AHI1*-Gen untersucht. Dabei zeigte sich, dass Veränderungen in diesem Gen bei ca. 10% der Patienten die Ursache der Erkrankung sind (Parisi et al., 2006). Ungefähr 80% der betroffenen Patienten leiden dabei an einer Retinopathie, während nur bei ca. 15% ausschließlich die klassischen Zeichen des Joubert Syndroms zu finden sind. Seltener zeigen sich eine Nierenbeteiligung, weitere ZNS-Manifestationen und Auffälligkeiten der Leber (Valente et al., 2008).

Das *AHI1*-Gen besteht aus 28 Exons und kodiert das Protein Jouberin, das vor allem in den Verbindungszilien der Photorezeptoren und den Basalkörpern angereichert ist. Außerdem interagiert es mit Nephrocystin-1, dessen Gen häufig bei Patienten mit juveniler Nephronophthise deletiert ist (Eley et al., 2008).

1.3.4. Joubert-Syndrom Typ 4 (JBTS4, *NPHP1*)

Das *NPHP1*-Gen (*Nephrocystin-1*) besteht aus 30 Exons und ist auf Chromosom 2q13 in einer ca. 290 kb großen genomischen Region, die von großen invertierten repetitiven Elementen flankiert ist, lokalisiert (Parisi et al., 2009). Ursprünglich waren große homozygote Deletionen in diesem Gen als Ursache der juvenilen Nephronophthise beschrieben worden. Später gelang es auch kleinere Mutationen bei Erkrankten nachzuweisen (Saunier et al., 1997). 2004 konnten Parisi et al. homozygote Deletionen im *NPHP1*-Gen ebenfalls bei drei Patienten, davon zwei Geschwistern, mit einer relativ milden Form des Joubert-Syndroms identifizieren (Parisi et al., 2004). Bei den Kindern lag ein leicht ausgeprägtes MTS vor, eine Netzhautdystrophie war bei keinem der Kinder nachweisbar. Zwei der Kinder (keine Geschwister) zeigten eine Beteiligung der Nieren in Form einer Nephronophthise. Bei dem dritten Kind konnte im Alter von acht Jahren noch keine Veränderung der Nieren nachgewiesen werden. Die beiden Kinder, bei denen eine Nephronophthise vorlag, waren zusätzlich leicht mental retardiert, wohingegen das andere Kind eine normale Intelligenz aufwies. Bei ihm zeigte sich lediglich eine leichte Verzögerung der motorischen Entwicklung.

Die Mutationsdetektionsrate im *NPHP1*-Gen liegt bei Patienten mit juveniler Nephronophthise zwischen ca. 20 und 30%, bei Joubert-Patienten dagegen nur bei 1-3% (Parisi et al., 2009). Eine Korrelation zwischen dem Ausmaß der Deletion oder der Art der Mutation und dem daraus resultierenden Phänotyp konnte nicht gefunden werden. Häufig konnte aber bei den Patienten mit Joubert-Syndrom, bei denen eine Deletion im *NPHP1*-Gen vorlag,

zusätzlich eine heterozygote Mutation im *AHI1*- oder *CEP290*-Gen gefunden werden. Es wird vermutet, dass die Kombination aus verschiedenen genetischen Defekten einen schwereren Phänotyp verursacht. So lagen bei Patienten mit Veränderungen in zwei verschiedenen Genen oft eine stärkere neurologische Beteiligung sowie Veränderungen an der Netzhaut vor (Tory et al., 2007).

1.3.5. Joubert-Syndrom Typ 5 (JBTS5, *CEP290*)

Das *CEP290*-Gen (*Centrosomal protein 290kD*) ist eines der interessantesten Gene, die als Ursache menschlicher Ziliopathien beschrieben worden sind. Mutationen im *CEP290*-Gen führen zu einem großen phänotypischen Spektrum. Dieses reicht vom Senior-Løken-Syndrom über das Meckel-Syndrom und das Bardet-Biedel-Syndrom bis hin zu einer isolierten Leberschen kongenitalen Amaurose (Parisi et al., 2009; Valente et al., 2008).

Das *CEP290*-Gen ist auf dem langen Arm von Chromosom 12 lokalisiert. Es handelt sich um ein sehr großes Gen, bestehend aus 53 Exons. Diese kodieren für das CEP290-Protein (NPHP6), das in Zentromeren, Zellkernen von Nierenepithelien und in den Verbindungszilien von Photorezeptoren zu finden ist (Sayer et al., 2006). Zwei unabhängige Forschergruppen konnten 2006 erstmals Mutationen im *CEP290*-Gen als Ursache der verschiedenen JSRDs nachweisen (Valente et al., 2006; Sayer et al., 2006). Valente et al. untersuchten in ihrer Studie fünf Familien mit unterschiedlich ausgeprägter Beteiligung des Gehirns, der Augen und der Nieren (Valente et al., 2006). Sayer et al. führten ein genomweites *Mapping* in 25 kleinen konsanguinen Familien mit Nephronophthise, Senior-Løken-Syndrom oder Joubert-Syndrom durch und wurden dabei auf die Region 12q aufmerksam. Anschließend führten sie eine direkte Sequenzierung bei 96 Patienten durch und entdeckten so neun Mutationen in sieben Familien mit JSRD bei einem okulo-renalem Phänotyp und einer Familie mit Senior-Løken-Syndrom. Außerdem fanden sie in zwei weiteren Familien jeweils nur eine heterozygote Mutation. Bei allen gefundenen Mutationen handelte es sich um *Missense*- oder *Frameshift*-Mutationen (Sayer et al., 2006). Die meisten Joubert-Patienten mit *CEP290*-Mutationen haben einen okulo-renalen Phänotyp. Die Mutationsrate bei diesen Patienten liegt bei ca. 50%. Untersucht man dagegen unselektierte JSRD-Patientenkollektive lassen sich lediglich bei ca. 10% *CEP290*-Mutationen nachweisen (Valente et al., 2006).

Außerdem konnten den Hollander et al. 2006 bei 16 von 76 Patienten mit isolierter Leberschen kongenitalen Amaurose Mutationen im *CEP290*-Gen detektieren und so zeigen, dass diese bei ca. 20% der Erkrankten die Ursache sind. Bei den gefundenen Mutationen handelte es sich um intronische Spleiß-Mutationen, bei denen im Gegensatz zu den anderen *Nonsense*-Mutationen im *CEP290*-Gen noch eine geringe Menge korrekt gespleißte mRNA gebildet werden. Diese ist möglicherweise für eine normale Kleinhirnentwicklung und Nierenfunktion ausreichend, nicht aber für die korrekte Funktion der Photorezeptoren,

so dass sich auf diese Weise die sehr unterschiedlichen Phänotypen erklären ließen (den Hollander et al., 2006).

1.3.6. Joubert-Syndrom Typ 6 (JBTS6, *TMEM67*)

Das *TMEM67*-Gen (*Transmembrane protein 67*) wurde ursprünglich unter der Bezeichnung *MKS3*-Gen beschrieben. Dieses ist darauf zurückzuführen, dass es im Jahr 2006 zuerst als Ursache des Meckel-Syndroms Typ 3 nachgewiesen werden konnte (Smith et al., 2006). Erst kurz darauf wurden Mutationen im *TMEM67*-Gen auch bei Patienten mit Joubert-Syndrom gefunden. Aufgrund des überlappenden Phänotyps beim Joubert-Syndrom und beim Meckel-Syndrom stellten Baala et al. die Hypothese auf, dass Mutationen in den bereits identifizierten Meckel-Genen, *MKS1* und *MKS3*, auch Ursache des Joubert-Syndroms sein könnten. Daraufhin analysierten sie die Gene von 22 Joubert-Patienten und konnten bei vier von ihnen Mutationen im *MKS3*-Gen nachweisen (Baala et al., 2007). 2009 wurde eine große Studie an 232 unselektierten Familien mit JSRD durchgeführt. Dabei konnten bei 19 Patienten Mutationen im *MKS3/TMEM67*-Gen gefunden werden, sodass man davon ausgeht, dass diese bei ca. 9% Ursache des Syndroms sind, wobei bei den meisten Betroffenen eine Leberbeteiligung vorliegt (Doherty, 2009).

Liegt die klinische Diagnose eines COACH-Syndroms vor, so liegt die Mutationsrate im Bereich zwischen 57% (Brancati et al., 2009) und 83% (Doherty et al., 2009). Bei den JSRD-Patienten lagen meist *Missense*- Mutationen oder eine Kombination aus einer Spleiß- und einer *Nonsense*-Mutation vor, während beim Meckel-Syndrom typischerweise compound-heterozygote *Missense*- und Kettenabbruch-Mutationen oder homozygote Spleiß-Mutationen zu finden waren (Parisi et al., 2009). Außerdem wurden bei Patienten mit isolierter Nephronophthise und Leberfibrose homozygote bzw. compound-heterozygote hypomorphe *Missense*-Mutationen im *TMEM67/MKS3*-Gen gefunden.

Das *TMEM67*-Gen besteht aus 28 Exons und kodiert für das Transmembranprotein Meckelin. Meckelin ist in primären Zilien und der Plasmamembran lokalisiert. Seine Funktion ist noch weitgehend ungeklärt. Es konnte aber gezeigt werden, dass Meckelin mit MKS1 interagiert und außerdem *Missense*-Mutationen zu einer reduzierten Expression von Meckelin in Zilien-tragenden Zelllinien und damit zu einer Blockade der Migration des Basalkörpers mit darauf folgender fehlender Ausbildung eines nichtmotilen Ziliums führen (Dawe et al., 2007).

1.3.7. Joubert-Syndrom Typ 7 (JBTS7, *RPGRIP1L*)

Das *RPGRIP1L*-Gen (*Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 like*) ist auf Chromosom 16q12.2 lokalisiert. Es besteht aus 26 kodierenden Exons in einer ca. 103 kb großen genomischen Region. Delous et al. gaben dem *RPGRIP1L*-Gen dessen Bezeichnung wegen seiner signifikanten Homologie zum *RPGRIP1*-Gen. Dessen Protein ist in den Verbindungszilien der Photorezeptoren lokalisiert und Mutationen des Gens verursachen eine Form der Leberschen kongenitalen Amaurose. RPGRIP1L interagiert mit NPHP4 und ist mit diesem, wie auch mit CEP290, im Bereich der Basalkörper vor allem der Verbindungzilien der Photorezeptoren kolokalisiert (Delous et al., 2007).

Mutationen im *RPGRIP1L*-Gen wurden 2007 das erste Mal von zwei unabhängigen Forschergruppen beschrieben (Delous et al., 2007; Arts et al., 2007). Delous et al. konnten bei drei Patienten mit Meckel-Syndrom homozygote oder compound-heterozygote *Nonsense*-Mutationen nachweisen. Arts et al. untersuchten Patienten mit Joubert-Syndrom und einer renalen Beteiligung und identifizierten in drei Familien Mutationen, die zu einem Funktionsverlust des Proteins führen. Das phänotypische Spektrum umfasst an erster Stelle Nierenerkrankungen, vor allem eine Nephronophthise, außerdem liegt bei einigen Patienten eine okzipitale Meningoenzephalozele und selten eine Beteiligung der Netzhaut oder Kolobome vor. Auch bei Patienten mit der Diagnose COACH-Syndrom konnten Mutationen in *RPGRIP1L* nachgewiesen werden. Untersucht man unselektierte Patientenkollektive mit JSRD, so liegt die Mutationsdetektionsfrequenz bei nur ca. 1% (Parisi et al., 2009). Liegt dagegen ein cerebello-renaler Phänotyp vor, so erhöht sich die Mutationsrate auf ca. 9% (Wolf et al., 2007) bis 12% (Brancati et al., 2008).

1.3.8. Joubert-Syndrom Typ 8 (JBTS8, *ARL13B*)

Das *ARL13B*-Gen (*ADP-Ribosylation factor-like 13B*) besteht aus zehn Exons und erstreckt sich über einen ca. 70 kb großen genomischen Bereich. Es ist auf Chromosom 3q11.2 lokalisiert und gehört zur Familie der Ras GTPasen. *ARL13B* kodiert für ein Protein, das in den Zilien aller Organe exprimiert wird. Insbesondere kommt es in den Zilien des sich entwickelnden Gehirns, der distalen Sammelrohre der Niere sowie in den Verbindungzilien zwischen Innen- und Außensegment der Photorezeptoren vor.

2008 konnten Cantagrel et al. Mutationen im *ARL13B*-Gen in zwei Familien mit einer überwiegend klassischen Form des Joubert-Syndroms nachweisen. Bei zwei Kindern lag zusätzlich eine kleine okzipitale Enzepahlozele vor, ein weiteres hatte eine milde unspezifische Retinopathia pigmentosa (Cantagrel et al., 2008). Derzeit geht man davon aus, dass nur ein geringer Prozentsatz (ca. 1%) der JSRDs von Mutationen im *ARL13B*-Gen verursacht wird.

1.3.9. Joubert-Syndrom Typ 9 (JBTS9, *CC2D2A*)

Im Jahr 2008 wurden erstmals Mutationen im *CC2D2A*-Gen (*Coiled-coil and C2 domain-containing protein 2A*) idenifiziert. Sie wurden in einer großen konsanguinen Familie aus Pakistan nachgewiesen, in der eine mentale Retardierung und eine Retinopathia pigmentosa vorlagen (Noor et al., 2008). Kurz darauf analysierten Gordon et al. die DNA von 70 Patienten mit den klinischen Symptomen eines Joubert-Syndroms und fanden in sechs Familien (9%) sieben verschiedene Mutationen in demselben Gen. Daraufhin reevaluierten sie die MRT-Bilder der Patienten, bei denen von Noor et al. Mutationen gefunden worden waren, und konnten deren Krankheitsbild so nachträglich ebenfalls als Joubert-Syndrom klassifizieren. Das phänotypische Spektrum bei den Betroffenen war sehr weit. Es reichte vom klassischen Joubert-Syndrom mit und ohne Enzephalozele bis hin zum COACH-Syndrom. Eine Polydaktylie lag bei keinem der Patienten vor (Gordon et al., 2008). Zusätzlich konnte in 11 finnischen Familien bei Feten mit Meckel-Syndrom eine homozygote Deletion im *CC2D2A*-Gen nachgewiesen werden (Tallila et al., 2008).

CC2D2A ist auf dem kurzen Arm von Chromosom 4 lokalisiert (4p15.3), besteht aus 37 Exons und erstreckt sich genomisch über einen Bereich von ca. 131 kb. Es interagiert mit *CEP290* und ist ebenfalls im Bereich des Basalkörpers von Zilien lokalisiert (Doherty, 2009).

1.3.10. Joubert-Syndrom Typ 10 (JBTS10, *OFD1*)

Das zehnte Gen, das als Ursache des Joubert-Syndroms gefunden wurde, unterscheidet sich von den anderen Joubert-Genen. So verursachen Mutationen im *OFD1*-Gen (*Oro-facio-digital syndrome type 1*) die einzige X-chromosomal rezessive Form des Joubert-Syndroms. Ursprünglich waren Mutationen im *OFD1*-Gen 2001 als Ursache des oro-facio-digitalen Syndroms (s. Glossar) beschrieben worden (Ferrante et al., 2001). 2009 konnten auch bei acht männlichen Betroffenen einer großen malaiischen Familie mit Joubert-Syndrom und bei einem weiteren isolierten männlichen Joubert-Patienten Mutationen im *OFD1*-Gen nachgewiesen werden. Die betroffenen Patienten zeigten im MRT ein MTS, waren schwer mental retardiert und hatten eine Retinopathia pigmentosa und eine postaxiale Polydaktylie. Das *OFD1*-Gen liegt auf dem Chromosom Xp22.3-p22.2 und interagiert mit Lebercilin, einem ziliären Protein, dessen Gen (*LCA5*) bei einer Form der Leberschen kongenitalen Amaurose mutiert ist (Coene et al., 2009).

1.3.11. Joubert-Syndrom Typ 11 (JBTS11, *TTC21B*)

Das *TTC21B*-Gen (*Tetratricopeptide Repeat Domain 21B*) liegt auf Chromosom 2q24.3 und kodiert für das THM1-Protein (*Tetratricopeptide repeat-containing Hedgehog Modulator-1*), welches in Zilien lokalisiert ist (Tran et al., 2008). Tran et al. konnten am Maus-Modell die Bedeutung dieses Gens für den Sonic-Hedgehog-Signalweg zeigen. Dieser Signaltransduktionsweg spielt eine essentielle Rolle in der Embryonalentwicklung sowie in der Erneuerung der Stammzellen. Störungen dieses Signalweges können zu dem Auftreten von Fehlbildungen sowie Krebserkrankungen führen.

2011 untersuchten Davis et al. die Rolle des *TTC21B*-Gens für die Entstehung von verschiedenen Ziliopathien beim Menschen. Dafür sequenzierten sie die 29 Exons des Gens in einer Kohorte von 753 Patienten, die an unterschiedlichen Ziliopathien erkrankt waren. Das Spektrum reichte von einer isolierten Nephronophthise, über eine Nephronophise in Kombination mit extrarenalen Manifestationen, das Joubert-Syndrom, das Bardet-Biedel-Syndrom, das Meckel-Gruber-Syndrom bis hin zum Jeune-Syndrom (s. Glossar). In der Arbeit konnten Mutationen des *TTC21B*-Gens bei allen verschiedenen Ziliopathien gefunden werden. Darunter drei verschiedene *Missense*-Mutationen bei Patienten mit Joubert-Syndrom. Insgesamt wurden bei 5% der Kohorte krankheitsverursachende Mutationen im *TTC21B*-Gen gefunden. Daher vermuten Davis et al., dass Mutationen dieses Gens eine häufige Ursache für viele verschiedene Ziliopathien sein könnten. Daraus, dass Mutationen dieses Gens auch in Kombination mit anderen krankheitsverursachenden Genen vorliegen können, resultiert ein breites Spektrum an Phänotypen (Davis et al., 2011).

1.3.12. Joubert-Syndrom Typ 12 (JBTS12, *KIF7*)

Das *KIF7*-Gen (*Kinesin Family Member 7*) ist Auslöser des Joubert-Syndroms Typ 12. Es handelt sich dabei um das menschliche Ortholog des bereits bekannten *Drosophila* Kinesin *Costal2*-Gen. Es umfasst 19 Exons und ist auf Chromosom 15q26.1 lokalisiert. Das Gen kodiert für ein Protein, das mit Zilien assoziiert ist und ebenfalls eine Schlüsselrolle im Sonic-Hedgehog-Signalweg spielt.

Mutationen im *KIF7*-Gen konnten bei Patienten mit Hydrolethalus-Syndrom (s. Glossar), einem mit dem Meckel-Gruber-Syndrom verwandtem Krankheitsbild, und mit Acrocallosalem-Syndrom (s. Glossar) beschrieben werden (Potoux et al., 2011). Außerdem fanden Potoux et al. acht verschiedene heterozygote *Missense*-Mutationen bei Patienten mit verschiedenen Formen von Ziliopathien, darunter auch das Meckel-Gruber-, das Bardet-Biedel- und das Joubert-Syndrom. Auch eine deutsche Arbeitsgruppe konnte den Zusammenhang zwischen Mutationen im *KIF7*-Gen und dem Joubert-Syndrom nachweisen. Sie analysierten die DNA von 63 Patienten mit Joubert-Syndrom und fanden bei vier von ihnen Mutationen des

Gens. Zusätzlich konnte nachgewiesen werden, dass *KIF7* mit *NPHP1* (JBTS4) interagiert und Einfluss auf die Regulation des Golgi-Apparates hat (Dafinger et al., 2011).

1.3.13. Joubert-Syndrom Typ 13 (JBTS13, *TCTN1*)

Das *TCTN1*-Gen (*Tectonic 1*) ist das dreizehnte Gen, das mit der Entstehung des Joubert-Syndroms in Verbindung gebracht wird. Es ist auf Chromosom 12q24.1 lokalisiert und wurde erstmals 2006 von Reiter und Skarnes beschrieben. Diese fanden heraus, dass *TCTN1* eine Rolle im Hedgehog-Signalweg bei Mäusen spielt (Reiter und Skarnes, 2006). 2011 untersuchten Garcia-Gonzalo et al. die Funktion von *TCTN1* an *TCTN1*-Knockout-Mäusen und konnten zeigen, dass *TCTN1* eine Bedeutung für die Entwicklung von Zilien in verschiedenen Geweben hat. Dabei bildet es einen Proteinkomplex mit verschiedenen anderen Proteinen, die ebenfalls mit Ziliopathien in Verbindung gebracht werden. Unter diesen Proteinen sind z.B. auch die der Joubert-Gene *TMEM67*, *CEP290* und *CC2D2A* zu finden. Teile des Komplexes befinden sich in der Übergangszone zwischen Basalkörper und dem Axonem der Zilien, sodass Veränderungen in diesem Bereich vermutlich die Ursache vieler Ziliopathien sind.

Auf dieser Grundlage suchten Garcia-Gonzalo et al. mittels *Homozygosity Mapping* nach Mutationen im *TCTN1*-Gen bei Joubert-Patienten. Dabei konnten sie bei zwei Schwestern konsanguiner Eltern eine homozygote Mutation von Spleißstellen nachweisen. Die Mutation bewirkt vermutlich eine Unterbrechung des kodierten TCTN1-Proteins und stört damit dessen Funktion. Die beiden betroffenen Schwestern zeigten im MRT ein MTS. Zusätzlich lag bei einem der Mädchen eine bilaterale frontotemporale Pachygyrie (Reduzierung der Gyrie mit Vergröberung der Hirnwindungen) vor. Eine Augenuntersuchung sowie eine Ultraschalluntersuchung der Nieren waren im Alter von vier bzw. sieben Jahren unauffällig (Garcia-Gonzalo et al., 2011).

1.3.14. Joubert-Syndrom Typ 14 (JBTS14, *TMEM237*)

Das *TMEM237*-Gen (*Transmembrane protein 237*) befindet sich auf Chromosom 2q33.1. Huang et al. konnten 2011 den Zusammenhang zwischen *TMEM237* und dem Joubert-Syndrom zeigen. Dafür führten sie zuerst ein *Homozygosity Mapping* durch, um homozygote Genorte bei verwandten Erkrankten aufzudecken. Anschließend suchten sie mittels *Next-Generation-Sequencing* in diesem Bereich gezielt nach Veränderungen. Dabei fanden sie verschiedene Mutationen, die vermutlich alle mit einer vollständigen Störung der Proteinfunktion einhergehen, sodass dieses die Ursache für das Joubert-Syndrom Typ 14 sein könnte. Darüber hinaus zeigten Huang et al. in ihrer Studie, dass das TMEM237-Protein in der Übergangszone von Zilien lokalisiert ist und eine Rolle in der Ziliogenese sowie dem

Wnt-Signalweg spielt (Huang et al., 2011). Bei diesem handelt es sich, ähnlich wie beim Sonic-Hedgehog-Signalweg, um einen Signaltransduktionsweg, der in der Embryogenese und der Krebsentstehung Bedeutung hat.

1.3.15. Joubert-Syndrom Typ 15 (JBTS15, *CEP41*)

Das letzte Gen, das derzeit als Auslöser des Joubert-Syndroms beschrieben wird, ist das *CEP41*-Gen (C*entrosomal protein 41kD*). Es ist auf Chromosom 7q32.2 lokalisiert und Voraussetzung für die Glutamylation von Tubulinproteinen. Dabei handelt es sich um eine posttranslationale Änderung von Glutamatresten vorwiegend im Axonem von Zilien, die wichtig für deren Funktion ist. Lee et al. konnten 2012 zeigen, dass das CEP41-Protein in Basalkörpern und primären Zilien lokalisiert ist und die Aufnahme von TTLL6 (*Tubulin Tyrosine Ligase-Like Family, Member 6*) reguliert. TTLL6 ist ein Enzym, das die Polylgutamylationsreaktion katalysiert.

Durch Sequenzierung des *CEP41*-Gens konnten Lee et al. drei unterschiedliche homozygote Mutationen in drei ägyptischen Familien mit Joubert-Syndrom nachweisen. Bei den Mutationen handelte es sich um Veränderungen der Spleißstellen, die alle zu einem vorzeitigen Kettenabbruch in der Proteinbiosynthese führten (Lee et al., 2012).

1.3.16. Übersicht Joubert-Syndrom Typ 1-15

Joubert-Syndrom Typ	**Gen**	Chromosom
JBTS1	*INNP5E*	9q34.4
JBTS2	*TMEM216*	11q13
JBTS3	*AHI1*	6q23.3
JBTS4	*NPHP1*	2q13
JBTS5	*CEP290*	12q21.3
JBTS6	*TMEM67*	8q22.1
JBTS7	*RPGRIP1L*	16q12.2
JBTS8	*ARL13B*	3q11.2
JBTS9	*CC2D2A*	4p15.3
JBTS10	*OFD1*	Xp22
JBTS11	*TTC21B*	2q24.3
JBTS12	*KIF7*	15q26.1
JBTS13	*TCTN1*	12q24.11
JBTS14	*TMEM237*	2q33.1
JBTS15	*CEP41*	7q32.2

Tabelle 1.1. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die bekannten, das Joubert-Syndrom auslösenden Gene und deren Lokalisation auf den Chromosomen.

1.4. Zielsetzung der Arbeit

Da die genetische Ursache und das Mutationsspektrum bei einer Vielzahl von Patienten mit den klinischen Zeichen eines Joubert-Syndroms noch nicht geklärt sind, befasst sich die hier vorliegende Arbeit mit der Mutationssuche in drei Joubert-Genen (*NPHP1*, *CEP290* und *TMEM67*). Es ist bekannt, dass Veränderungen in diesen Genen zu verschiedenen Formen des Joubert-Syndroms (JBTS4-6) führen. Mit *CEP290* und *TMEM67* analysierten wir zwei der drei häufigsten das Joubert-Syndrom auslösenden Gene, bei *NPHP1* handelt es sich um ein weiteres Gen, das zu Beginn der Dissertation als krankheitsverursachend bekannt war.

Unser Patientenkollektiv bestand aus 25 Patienten, vorwiegend deutscher und türkischer Herkunft, deren DNA wir mit dem Einverständnis der Eltern auf Veränderungen in ihrer Nukleotidsequenz untersuchten. Zuvor waren die Patienten bereits auf Mutationen im *AHI1*-Gen, dem dritten häufigen Gen, analysiert worden. Dort waren keine Veränderungen identifiziert worden.

Die Ziele dieser Arbeit waren bei den 25 Betroffenen:

- mittels PCR-Methode homozygote Deletionen im *NPHP1*-Gen zu suchen.
- die 53 kodierenden Exons des *CEP290*-Gens und die 28 Exons des *TMEM67*-Gens mittels PCR zu amplifizieren, anschließend zu sequenzieren und die ermittelten Nukleotidsequenzen mit Sequenzen aus Datenbanken zu vergleichen.
- mögliche Veränderungen nach der internationalen Nomenklatur zu benennen.
- die Häufigkeiten der Veränderungen innerhalb des Probenkollektives zu bestimmen und mit denen aus der Literatur zu vergleichen.
- bei Veränderungen zwischen Mutationen und Polymorphismen zu unterscheiden.
- die Phänotypen der Patienten, bei denen Mutationen nachgewiesen werden konnten, unter Berücksichtigung eventueller Gemeinsamkeiten und Unterschiede, einer möglichen Phänotyp-Genotyp-Korrelation und der bereits dazu publizierten Ergebnisse zu beschreiben.

2. Material und Methoden

2.1. Allgemeine Materialien

Produkt	Hersteller
Pipettenspitzen Finntip (0,5-10μl)	Thermo Scientific
Pipettenspitzen Finntip (10-300μl)	Thermo Electron Corporation
Pipettenspitzen (-2μl)	ART 10 Reach Molecular Bio Products
Pipettenspitzen (2-200μl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (200-400μl)	Sarstedt
Pipettenspitzen (-2μl)	Eppendorf
Tubes (-0,5, - 1,5, -2ml)	Sarstedt
96 Well Reaction Plate	peQLab
0,2 ml 8-Strip Reaction Caps	peQLab
Micro Amp®optical 96 Well reaction plate	Applied Biosystems
Plate Septa 96-Well	Applied Biosystems
Acetate Foil for Microtest Well plates	Sarstedt
MultiScreen®-HV Plate	Millipore
Microtest Plate 96- Well Vee Bottom	Sarstedt
Gelkammer	
Kämme	
Elektrophorese Kammer He 99x	Hoefer
Submarine elektrophorese Unit He 99x	Amersham Biosciences

Tabelle 2.1. Liste der verwendeten allgemeinen Produkte und deren Hersteller.

2.2. Geräte

Gerät	Hersteller
Pipetman (2-1000μl)	Gilson
Finnpipette®(0,5-10μl)	Labsystems BRAND W-Germany
Automatische Finnpipette®mit 50 und 300μl Aufsatz	Labsystems BRAND W-Germany
Pipetten Discovery Autoclavable (0,5-10μl)	ABIMED
Pipetten Discovery Autoclavable (2-20μl)	ABIMED
Pipetten Discovery Autoclavable (20-200μl)	ABIMED
Pipetten Discovery Autoclavable (100-1000μl)	ABIMED
Transferpipette®-8 Labsystems	BRAND W-Germany
Vortex Top Mix 11118	Fisher Bioblock Scientific
Zentrifuge sprout*	Heathrow Scientific
Centrifuge 5415 C	Eppendorf
Centrifuge 5804	Eppendorf
Cycler Biometra TGradient	Biometra
2720 Thermal Cycler	Applied Biosystems
Waage	Kern
Gene Power Supply GPS 200/400	Pharmacia
UV-Strahler	Vetter GmbH
BioDocAnalyze	Biometra
Digital Graphic Printer	Sony

Tabelle 2.2. Liste der verwendeten Geräte und deren Hersteller.

2.3. Software

Programm	Firma
BioDocAnalyze Software	Biometra
Sequenzing Analysis 5.1 Version	Applied Biosystems
SeqScape V2.5 Applied	Biosystems
SeqWorks! V1.03 beta	By Sven Opitz, 2003

Tabelle 2.3. Liste der verwendeten Programme und der herausgebenden Firmen.

2.4. Chemikalien

Produkt	Hersteller
aq.dest. (HPLC)	Merck
dNTPs (je 10 mM)	Q-Biogene
Taq-DNA-Polymerase (5U/μl)	Q-Biogene
Incubation Mix T. Pol. mit $MgCl_2$	Q-Biogene
Agarose	StarLab
Ethidiumbromid (10mg/ml)	Merck
Ficoll 400	Pharmacia
50bp DNA-Ladder	invitrogen
100bp DNA-Ladder	invitrogen
Low DNA Mass Ladder	invitrogen
Sephadex	GE Healthcare
Formamid (Hi-Di)	Applied Biosystems
ExoSap-IT®	USB
5x- Seq. Puffer	
Terminator Mix v1.1	Applied Biosystems

Tabelle 2.4. Liste der verwendeten Chemikalien und deren Hersteller.

2.5. Lösungen

Lösung	Bestandteile
1× TBE- Puffer	36g Tris 18,3g Borsäure 2,47g Titriplex III auf 4l aq. dest.
2%ige Agarosegel-Lösung	100ml 1x TBE-Puffer 2g Agarose 2,5μl Ethidiumbromid
50bp DNA Ladder	Für 200μl mit einer Verdünnung von 50ng/μl: 10μl 50bp DNA Ladder 70μl 6x Ficoll 120μl aq. dest.
100bp DNA Ladder	Für 200μl mit einer Verdünnung von 50ng/μl: 10μl 100 bp DNA Ladder 70μl 6x Ficoll 120μl aq. dest
Low DNA Mass Ladder	50μl DNA Ladder 12,5μl 10xGlycerin 3x Ficoll- Lösung 145μM Bromphenolblau 186μM Xylencyanol 15% (w/v) Ficoll 400

Tabelle 2.5. Liste der verwendeten Lösungen und deren Bestandteile.

2.6. Primer

Die verwendeten Primer hatten eine Länge von 20 +/- 2 Nukleotiden. Sie wurden so gesetzt, dass die kompletten Exons sowie die Intron-Exon-Übergänge amplifiziert werden konnten. Eine Tabelle aller Primersequenzen für das *NPHP1*-, *CEP290*- und *TMEM67*-Gen befindet sich im Anhang.

2.7. DNA-Proben

Die DNA-Proben wurden uns von verschiedenen humangenetischen Instituten und neuropädiatrischen Zentren zugesandt. Die Analysen erfolgten mit Einverständnis der Eltern der betroffenen Kinder. Für die Doktorarbeit wurde ein Ethikantrag gestellt, der unter dem Aktenzeichen 06-122 zu finden ist und den Titel „Genetische Ursachen von Kleinhirnfehlbildungen“ trägt.

2.8. Die Polymerase-Kettenreakion (PCR)

2.8.1. Prinzip

Die Polymerase-Kettenreaktion ist eine Methode, die es erlaubt eine spezifische DNA-Sequenz in vitro nachzuweisen und exponentiell zu amplifizieren.

Hierfür werden neben einer geringen Menge der zu amplifizierenden DNA zwei einzelsträngige Oligonukleotid-Primer, eine hitzestabile DNA-Polymerase und freie Nukleotide (dATP, dCTP, dGTP und dTTP) benötigt. Bei den synthetisch hergestellten Primern wird zwischen dem Vorwärts-(F-)-Primer und dem Rückwärts-(R-)Primer unterschieden. Die Sequenz des F-Primers entspricht dem Beginn der zu amplifizierenden Region im kodierenden Strang, wohingegen der R-Primer den Endpunkt dieser Region im komplementären Strang markiert. Als thermostabile DNA-Polymerase wird die sogenannte Taq-Polymerase verwendet. Diese wird unter anderem aus dem Bakterium Thermus aquaticus gewonnen. Sie ist in der Lage bei Anwesenheit von freien Nukleotiden die Primer zu verlängern und hat den Vorteil, dass sie bei der Erhitzung auf 95°C nicht denaturiert wird.

Die PCR besteht aus einem dreiteiligen Zyklus. Im ersten Schritt wird der DNA-Doppelstrang bei 95°C denaturiert. Darauf folgt bei Temperaturen zwischen 50°C und 65°C die Anlagerung der Primer an die komplementären Stellen der nun einzeln vorliegenden DNA-Stränge (Hybridisierung und Annealing). Im letzten Schritt, der Extension, heftet die thermostabile DNA-Polymerase bei 72°C die zugefügten Nukleotide an die 3'OH-Enden der Primer und synthetisiert so eine zum Einzelstrang komplementäre DNA-Sequenz. Am Ende dieses dritten Schrittes liegt daher der definierte DNA-Abschnitt in zweifacher Ausführung vor.

Der Zyklus aus Denaturierung, Hybridisierung und Extension wird üblicherweise 30 bis 35 mal wiederholt, sodass das PCR-Produkt am Ende den von den beiden Primern umschlossenen DNA-Abschnitt in einer großen Anzahl von Kopien enthält, weil sich diese bei jedem Zyklus verdoppeln (exponentielles Wachstum).

Um ein optimales Ergebnis erzielen zu können, muss man für jede PCR Primer-abhängig die Konzentrationen der verschiedenen Reagenzien, die Temperaturen und die Zyklenanzahlen variieren.

2.8.2. Durchführung

Für die Reaktionsansätze wurden insgesamt 150μl von der Patienten-DNA in einer Konzentration von 50ng/μl benötigt. Für die Herstellung dieser Verdünnung wurden die

Konzentrationen der vorhandenen Stock-DNAs photometrisch bestimmt. Anhand der folgenden Formel

$$\text{Menge der benötigten DNA} = \frac{\text{gewünschte Konzentration} \times \text{gewünschter Menge}}{\text{vorhandene Konzentration}}$$

wurde die Menge der benötigten Stock-DNA berechnet.

Die Reaktionsansätze hatten jeweils ein Gesamtvolumen von 25μl. Dafür wurden der F- und der R-Primer in die Mikrotiterplatte vorgelegt. Anschließend wurde auf Eis der Mix aus H_2O, Inkubations-Mix, dNTPs und Taq-Polymerase hergestellt und auf die Primer in der Mikrotiterplatte verteilt. Als letzter Schritt wurden die verschiedenen DNA-Verdünnungen hinzupipettiert. Pro Exon wurde eine Leerkontrolle mitgeführt.

Von diesem Schema abweichend wurde die PCR des *NPHP1*-Gens durchgeführt. Das *NPHP1*-Gen wurde mittels Multiplex-PCR amplifiziert. Es wurden also die Primer aller Exons in einen Ansatz gegeben. Dieses war möglich, weil die Exons im Anschluss an die PCR nicht sequenziert werden mussten und der Unterschied in der Basenpaaranzahl zwischen den Fragmenten der 5 Exons groß genug war, um diese in der anschließenden Agarosegel-Elektrophorese voneinander trennen zu können.

PCR-Schema für das *NPHP1*-Gen

Produkt	Menge für einen Ansatz
DNA (50 ng/μl)	1μl
H_2O (HPLC grade)	10,95μl
PCR-Puffer (10x)	2,5μl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5μl
Primer *NPHP1* Ex 1f (10 pmol/μl)	1μl
Primer *NPHP1* Ex 1r (10 pmol/μl)	1μl
Primer *NPHP1* Ex 5f (10 pmol/μl)	1μl
Primer *NPHP1* Ex 5r (10 pmol/μl)	1μl
Primer *NPHP1* Ex 10f (10 pmol/μl)	1μl
Primer *NPHP1* Ex 10r (10 pmol/μl)	1μl
Primer *NPHP1* Ex 15f (10 pmol/μl)	1μl
Primer *NPHP1* Ex 15r (10 pmol/μl)	1μl
Primer *NPHP1* Ex 20f (10 pmol/μl)	1μl
Primer *NPHP1* Ex 20r (10 pmol/μl)	1μl
Taq-Polymerase (5U/μl)	0,05μl
	$\Sigma = 25\mu$l

Tabelle 2.6. PCR-Schema für das *NPHP1*-Gen. Gezeigt werden die verschiedenen Produkte mit den Mengenangaben, die für einen PCR-Ansatz zur Amplifizierung des *NPHP1*-Gens benötigt werden.

Für das *NPHP1*-Gen wurde folgender PCR-Zyklus gewählt:

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	$\times$ 30
Annealing	55°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	30 Sekunden	
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

Tabelle 2.7. PCR-Zyklus für das *NPHP1*-Gen. Gezeigt werden die verschiedenen PCR-Schritte mit den dazugehörigen Temperaturen und der benötigten Zeit.

PCR-Schema für das *CEP290*-Gen

Produkt	Menge für einen Ansatz
DNA (50 ng/μl)	1μl
H_2O (HPLC grade)	18,95μl
PCR-Puffer (10x)	2,5μl
dNTP-Mix (je 10 mM)	0,5μl
Primer *CEP290* Ex f (10 pmol/μl)	1μl
Primer *CEP290* Ex r (10 pmol/μl)	1μl
Taq-Polymerase (5U/μl)	0,05μl
	$\Sigma = 25\mu$l

Tabelle 2.8. PCR-Schema für das *CEP290*-Gen. Gezeigt werden die verschiedenen Produkte mit den Mengenangaben, die für einen PCR-Ansatz zur Amplifizierung des *CEP290*-Gens benötigt werden.

Für das *CEP290*-Gen wurde üblicherweise folgender PCR-Zyklus gewählt:

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	$\times$ 35
Annealing	58°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	45 Sekunden	
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

Tabelle 2.9. PCR-Zyklus für das *CEP290*-Gen. Gezeigt werden die verschiedenen PCR-Schritte mit den dazugehörigen Temperaturen und der benötigten Zeit.

Eine Tabelle mit den PCR-Zyklen für die einzelnen Exons befindet sich im Anhang.

PCR-Schema für das *TMEM67*-Gen

Der Reaktionsansatz für die PCR des *TMEM67*-Gens entsprach dem des *CEP290*-Gens. Die meisten Exons von *TMEM67* wurden mit folgendem PCR-Zyklus amplifiziert:

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	× 30
Annealing	55°C	30 Sekunden	× 30
Elongation	72°C	30 Sekunden	× 30
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

Tabelle 2.10. PCR-Zyklus für das *TMEM67*-Gen. Gezeigt werden die verschiedenen PCR-Schritte mit den dazugehörigen Temperaturen und der benötigten Zeit.

Eine Tabelle mit den PCR-Zyklen für die einzelnen Exons befindet sich im Anhang.

2.9. Agarosegel-Elektrophorese

2.9.1. Prinzip

Mit der Agarosegel-Elektrophorese lassen sich die DNA-Fragmente der PCR-Produkte auf unkomplizierte und schnelle Weise nach ihrer Größe (Anzahl der Basenpaare) trennen. Sie wird durchgeführt, um den Erfolg einer vorherigen PCR zu beurteilen. Das Prinzip dieser Methode beruht darauf, dass sich die negativ geladenen DNA-Fragmente im elektrischen Feld in Richtung der Anode bewegen. Die Wanderungsgeschwindigkeit der verschiedenen Fragmente ist dabei unter anderem von ihrer Größe, also der Anzahl der Basenpaare abhängig: kleinere Fragmente wandern im Gel schneller als große Fragmente. Des Weiteren hängt die Wanderungsgeschwindigkeit von der Viskosität der Trägersubstanz, also der Konzentration der Agarose im Gel und von der angelegten Spannung ab. Das Ethidiumbromid, das in das Gel gegeben wird, ist wichtig für die anschließende Auswertung. Es interkaliert in die DNA und fluoresziert unter ultraviolettem Licht, sodass die DNA-Fragmente als Banden sichtbar werden.

2.9.2. Durchführung

Als Standardgel wurde ein Gel mit einem Agaroseanteil von 2% verwendet. Zur Herstellung eines Gels wurden 2g Agarose in 100ml 1xTBE-Puffer aufgekocht und auf ca. 60°C abgekühlt. Dann wurden 2,5μl Ethidiumbromid zugegeben. Anschließend wurde die noch flüssige Lösung in den Gelträger der Gelkammer gegossen, in die zuvor zwei

oder drei Kämme gehängt worden waren. Pro Kamm entstand im erstarrten Gel eine Reihe von jeweils 30 Gelkammern, die sogenannten Slots. Als das Gel vollständig erstarrt war, wurden in die Slots jeweils 3μl PCR-Produkt und 3μl 3xFicoll-Ladepuffer pipettiert. Als Vergleichsreferenz für die spätere Abschätzung der Produktgröße bzw. Bandenintensität wurden 5μl eines 50- und 100bp-Ladders (*NPHP1*) bzw. 2μl Low Mass Ladder (*CEP290, TMEM67*) mitgeführt. Dann erfolgte für 30 Minuten bei einer gleichmäßigen Spannung von 120 Volt die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente in einer mit 1xTBE-Puffer gefüllten Elektrophoresekammer. Bei der Multiplex-PCR dauerte die Auftrennung ca. 60 Minuten. Zur Auswertung wurde das Gel anschließend unter UV-Licht fotografiert.

2.10. DNA-Sequenzierung mittels Didesoxynukleotidverfahren

2.10.1. Prinzip

Die Didesoxynukleotidmethode ist auf Sanger et al. zurückzuführen und wird auch als Kettenabbruchmethode bezeichnet (Sanger et al., 1977). Sie wird verwendet, um die Nukleotidsequenz eines DNA-Stranges zu ermitteln. Das Prinzip basiert auf der Neusynthese eines komplementären DNA-Einzelstrangs entlang einer DNA-Matrize. Für die Sequenzreaktion werden neben einer DNA-Polymerase und freien Nukleotiden (dNTPs) zusätzlich fluoreszenzmarkierte Stoppnukleotide (Didesoxynukleotide = ddNTPs) eingesetzt. Sie enthalten an der 3'-Stelle der Desoxyribose eine OH-Gruppe, die die Anlage weiterer Nukleotide verhindert. Bei Einbau der ddNTPs in den entstehenden Strang kommt es also zum Syntheseabbruch. Dadurch, dass der Einbau der ddNTPs an zufälligen Stellen erfolgt (abhängig vom Verhältnis dNTPs zu ddNTPs), erhält man am Ende der Sequenzreaktion letztlich einen Mix, der DNA-Fragmente aller möglichen Längen enthält.

Diese fluoreszenzmarkierten Sequenzfragmente lassen sich auf einem Polyacrylamidgel der Größe nach auftrennen und mittels Laserlichtanregung detektieren. Da die ddNTPs mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markiert werden, ist es möglich, die vier Basen bei der Detektion zu unterscheiden und ihre Abfolge anhand der Fragmentgrößen zu bestimmen. Die gelelektrophoretische Fragmentauftrennung (Kapillarelektrophorese) sowie auch die Rohdatenaufzeichnung und deren anschließende Auswertung erfolgt mittels computergesteuerter Apparatur und Software.

2.10.2. Durchführung

Primär-PCR: Vor der Sequenzreaktion wurde eine PCR des gewünschten Genabschnitts durchgeführt, um die DNA-Matrize für die Sequenzreaktion herzustellen (s. Abschnitt 2.8.). Anschließend erfolgte eine Agarosegel-Elektrophorese, um die Konzentrationen der PCR-Produkte semiquantitativ unter optischem Vergleich der Bandenintensität mit der einer mitgeführten „Low DNA Mass Ladder“ zu bestimmen.

Aufreinigung: Für die Sequenzreaktion ist es notwendig, die PCR-Produkte vor der weiteren Verwendung aufzureinigen. Hierfür wurde die Exo/SAP-Methode angewendet. Dabei steht das Exo für Exonuklease I, das SAP für Shrimp-Alkaline-Phosphatase.

Bei beiden handelt es sich um hydrolytische Enzyme. Die Exonuklease ist in der Lage überschüssige Primer aus der PCR-Reaktion abzubauen. Die Shrimp-Alkaline-Phosphatase dephosphoryliert Nukleotid-Triphosphate zu Monophosphaten, sodass diese in der anschließenden Sequenzreaktion das spezifische Verhältnis von dNTPs zu ddNTPs nicht stören. Verwendet wurde das ExoSap-IT®-Kit der Firma USB. Als Standard wurden zu 5μl PCR-Produkt 2μl ExoSAP-Enzym gegeben. Dieses Mischungsverhältnis wurde in Abhängigkeit der Bandenintensität variiert, sodass manche Proben mit HPLC-H_2O verdünnt wurden. Das Gesamtvolumen des Reaktionsansatzes betrug immer 7μl. Es wurde auf Eis pipettiert. Nach kurzem Zentrifugieren wurde die Reaktion im Thermocycler gestartet. Dort liefen zwei verschiedene Schritte ab. In einer ersten Reaktion erfolgte bei 37°C die Hydrolyse durch die Enzyme. Anschließend wurden die Ansätze in einem zweiten Schritt auf 80°C erhitzt, um eine Inaktivierung der Enzyme hervorzurufen.

Enzymatische Reaktion	37°C	15 Minuten
Enzyminaktivierung	80°C	15 Minuten
Kühlung	4°C	∞

Tabelle 2.11. Ablauf der ExoSap-Methode

Die enzymatisch behandelten PCR-Produkte konnten im Folgenden entweder direkt für die Sequenzierung eingesetzt, oder bei -20°C gelagert werden.

Sequenzierung: Für die Sequenzreaktion wurden standardmäßig 1μl PCR-Produkt aus der ExoSap-Reaktion, 1,5μl 5xSeq.-Puffer, jeweils 0,5μl Primer und Terminator Mix v1.1 und 6,5μl HPLC-H_2O eingesetzt, sodass das Gesamtvolumen 10μl betrug. Als Standard-Sequenzierungs-Protokoll galten folgende Temperaturen und Zeiten:

Prädenaturierung	96°C	1 Minute	
Denaturierung	96°C	10 Sekunden	$\times$ 30
Annealing	60°C	5 Sekunden	
Elongation	60°C	1 Minute	
Kühlung	4°C	∞	

Tabelle 2.12. Zyklus der Sequenzierung nach Sanger. Gezeigt werden die verschiedenen Sequenzierschritte mit den dazugehörigen Temperaturen und der benötigten Zeit.

Nach der Sequenzreaktion erfolgte die Aufreinigung der Produkte mittels Sephadex. Dabei werden die überschüssigen Nukleotide und Primer von den Sequenzprodukten getrennt.

Bei Sephadex handelt es sich um ein poröses Dextrangel, welches durch Quervernetzung unterschiedlicher Dextranfraktionen mit Epichlorhydrin hergestellt wird. Durch den hohen Gehalt an Hydroxylgruppen in den Polysaccharidketten ist das Polymer stark hydrophil und quillt daher in wässriger Lösung zu einem Gel.

Sephadex wird in Pulverform geliefert. Für die Aufreingung wurde das Sephadex zuerst auf eine Filterplatte aufgetragen und mit 300μl HPLC-H_2O versetzt. Dann musste es mindestens eine Stunde quellen.

Nach dem Quellen wurde die Sephadexplatte fünf Minuten zentrifugiert und das Wasser in einer Auffangplatte gesammelt. Im Anschluss daran wurden 10μl der Sequenzprodukte, die zuvor mit 10μl HPLC-H_2O verdünnt worden waren, in die Filterplatte mit Sephadex pipettiert und wiederum 5 Minuten zentrifugiert. Die Produkte wurden in einer Produktauffangplatte aufgefangen.

In einem letzten Schritt wurden 5μl der aufgereinigten Sequenzprodukte mit 10μl HiDi-Formamid versetzt und zur Sequenzanalyse in den Sequenzer gestellt.

Nach der Messung wurden die ermittelten Sequenzen unter Verwendung des Programmes SeqScape v.2.5 ausgewertet. Hierbei wurden die detektierten Sequenzen mit Referenzsequenzen verglichen. Dazu verwendeten wir bei der Analyse von *CEP290* die Sequenz mit der Ensembl Transkript-ID ENST00000552810 und bei *TMEM67* die mit der Ensembl Transkript-ID ENST00000453321. Zu beachten ist dabei, dass es für *CEP90* noch ein zweites Transkript mit der ID ENST00000309041 gibt, das in der Literatur zum Teil als Referenzsequenz verwendet wird. Bei diesem Transkript liegen sechs zusätzliche Nukleotide an Position 1624-1629 vor. Daraus erfolgt ab dieser Position ein Verschub der Nummerierung um 6 Nukleotiden in der DNA-Sequenz, bzw. um 2 Proteine auf Proteinebene nach hinten. Die detektierten Sequenzveränderungen wurden nach der internationalen Nomenklatur benannt und es wurde in der Literatur nach Vorbeschreibungen gesucht.

3. Ergebnisse

3.1. Auswertung der *NPHP1*-Analyse

Für die Analyse des *NPHP1*-Gens erfolgte zunächst die spezifische Amplifikation der Exons 1, 5, 10, 15 und 20 mittels Multiplex-PCR und anschließend die elektrophoretische Auftrennung der Fragmente. Nach erfolgreicher PCR konnten die Produkte dann unter UV-Licht als fluoreszierende Banden nachgewiesen und von einander differenziert werden (s. Abschnitt 2.9.). Bei der Auswertung der *NPHP1*-Fragmente der 25 DNA-Proben konnten keine Auffälligkeiten beobachtet werden. Alle Exons konnten amplifiziert werden. Bandenausfälle, die für eine homozygote Deletion des *NPHP1*-Gens sprechen würden, traten nicht auf.

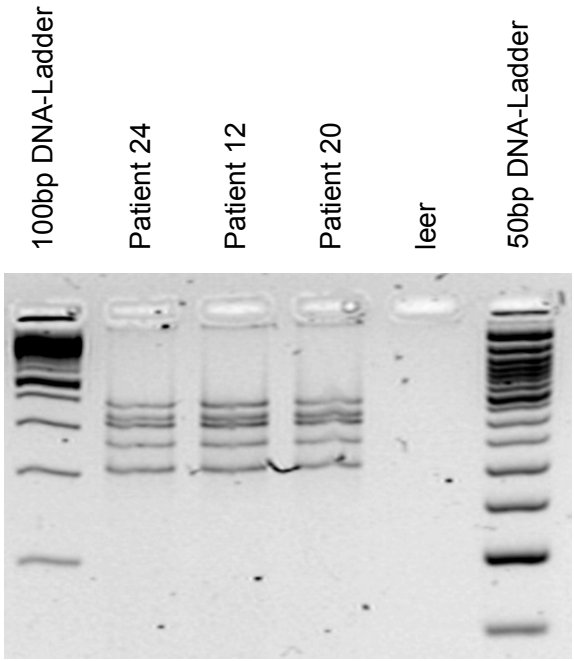


Abbildung 3.1. Auswertung der Multiplex-PCR vom *NPHP1*-Gen. 2%iges Agarosegel mit DNA-Proben der Patienten 24, 12 und 20 sowie einer Leerkontrolle. Es lassen sich jeweils alle fünf Banden (von Exon 1, 5, 10, 15 und 20) darstellen. Das Vorliegen einer homozygoten Deletion kann damit ausgeschlossen werden.

3.2. Auswertung der *CEP290*-Analyse

Auch für die Analyse des *CEP290*- und des *TMEM67*-Gens erfolgte zuerst eine exonspezifische Amplifikation der Gene mit einer anschließenden Kontrolle der Fragmente per Agarosegel-Elektrophorese. Nach erfolgreicher PCR konnten die Produkte dann für die Sequenzanalysen eingesetzt werden. Die so ermittelten Nukleotidsequenzen wurden mit bekannten cDNA-Sequenzen aus einer Internet-Datenbank verglichen.

3.2.1. Sequenzierung des *CEP290*-Gens

Exon 1-9 Die Sequenzierungen der ersten 9 Exons von *CEP290* zeigten keine Auffälligkeiten. Bei allen Patienten stimmte die Basenreihenfolge dieser Exons mit denen aus der Datenbank überein.

Exon 10 Die erste Veränderung konnten wir in Exon 10 bei Patient 16 detektieren. An der Position 829 liegt hier statt Guanin die Base Cytosin vor (c.829G>C). Daraus resultiert ein Austausch der Aminosäure Glutaminsäure zu Glutamin an Position 277 der Polypeptidkette (p.E277Q). Es handelt sich also um eine *Missense*-Mutation, bei der eine saure durch eine neutrale Aminosäure ersetzt wird. Diese Veränderung ist als Polymorphismus unter der Nummer rs45502896 in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI) zu finden.

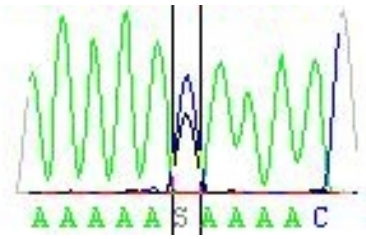


Abbildung 3.2. Die Abbildung zeigt einen Ausschnitt der Sequenz von Exon 10 bei Patient 16. Bei der Betroffenen liegen an Position 829 (markiert durch die beiden senkrechten Striche) sowohl ein G- als auch ein C-Signal vor. Die Referenz-Sequenz weist an dieser Position nur Guanin auf.

Exon 11-16 In den Exons 10-16 zeigten sich bei unseren Patientenproben keine Auffälligkeiten.

Exon 17 In Exon 17 konnten wir eine Veränderung bei der Sequenzierung der Probe von Patient 5 nachweisen. Es handelt sich um eine heterozygote Mutation, bei der an Position 1669 der cDNA die Base Cytosin durch Thymin ersetzt ist (c.1669C>T). Dieses

hat auf Proteinebene eine Substitution der Aminosäure Arginin durch Cystein an der Position 557 zur Folge (p.R557C). Bei Arginin handelt es sich um eine basische Aminosäure. Diese wird mit Cystein durch eine schwefelhaltige Aminosäure ersetzt. Es liegt somit eine *Missense*-Mutation vor.

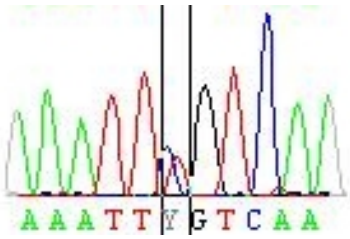


Abbildung 3.3. Heterozygote Mutation in Exon 17 bei Patient 5. An Position 1669 (markiert durch die beiden senkrechten Striche) lässt sich statt eines reinen C-Signals ebenfalls ein T-Signal darstellen.

Auch bei Patient 19 fanden wir eine Auffälligkeit in Exon 17. Hier fehlt an den Positionen 1665 und 1666 der cDNA-Sequenz die Base Adenin (c.1665_1666delAA). Es handelt sich also um die Deletion zweier aufeinanderfolgender Nukleotide. Die Folge davon ist auf Proteinebene eine Verschiebung des Leserasters und ein Abbruch der Polypeptidkette nach 19 Aminosäuren (p.K555fs*19).

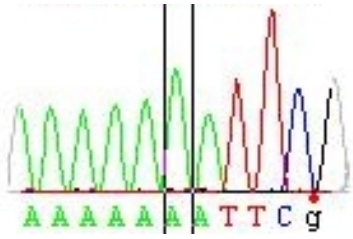


Abbildung 3.4. Heterozygote Mutation in Exon 17 bei Patient 19. Es fehlen zwei A-Signale, wodurch es nach 19 Aminosäuren zu einem Kettenabbruch kommt.

Exon 18 Wir fanden bei keinem Patienten eine Veränderung der Nukleotidsequenz in Exon 18.

Exon 19 Bei der Probe von Patient 11 zeigte sich in der Sequenzierung eine Auffälligkeit in Exon 19. An der Position 1908 des einen Allels ist Adenin durch Thymin ersetzt (c.1908A>T). Dadurch wird die Aminosäure Lysin durch Asparagin an der Position 636 auf Proteinebene ersetzt (p.K636N). Es liegt damit eine *Missense*-Mutation vor, bei der statt einer basischen eine saure Aminosäure in die Polypeptidkette eingebaut wurde.

Exon 20 In Exon 20 fanden wir in keiner Probe eine Veränderung.

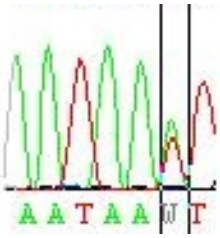


Abbildung 3.5. Ausschnitt aus der Sequenz von Exon 19 des Patienten 11. Es liegt eine heterozygote Mutation vor. Es zeigt sich an Position 1908 (markiert durch die beiden senkrechten Striche) zusätzlich zu dem A-Signal ein T-Signal.

Exon 21 Bei den Proben von Patient 2, 3, 4, 5, 6, 13, 15 und 21 zeigte sich eine heterozygote Veränderung an Position 2055 der Nukleotidsequenz. Hier liegt eine Substitution der Base Cytosin statt Thymin vor (c.2055T>C). Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine stille Mutation, die keine Auswirkungen auf die Reihenfolge der Aminosäuren in der entstehenden Polypeptidkette hat. Sie ist in der Datenbank des NCBI unter der Nummer rs45465996 zu finden.

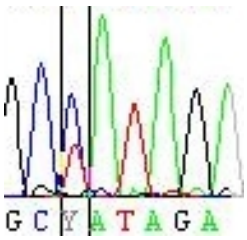


Abbildung 3.6. Polymorphismus c.2055T>C am Beispiel eines Sequenzausschnitts von Patient 2. An Position 2055 (markiert durch die beiden senkrechten Striche) sind ein T- und ein C-Signal zu sehen. Es handelt sich um eine heterozygote Veränderung.

Exon 22 In Exon 22 des *CEP290*-Gens konnten wir bei allen Patienten eine Abweichung von der Referenzsequenz finden. Bei ihnen lag ein hetero- (Patienten 1, 2, 4, 5, und 16) oder homozygoter (Patienten 3, 6, 7, 9, 11, 12, 13, 14, 15, 17, 18, 19, 20, 21, 24 und 25) Austausch von Adenin zu Guanin an Position 2268 vor (c.2268A>G). Auch bei dieser Veränderung, beschrieben unter der Nummer rs2468255, handelt es sich um eine stille Mutation ohne Auswirkungen auf die Proteinebene. (Bei den Patienten 8, 10, 22 und 23 haben wir *CEP290* nicht sequenziert, weil z.B. zuvor schon Mutationen in *TMEM67* gefunden worden waren, die das Auftreten der Krankheit erklären konnten.)

Exon 23-40 Bei den Sequenzierungen der Exons 23-40 konnten wir wiederum keine weiteren Sequenzveränderungen finden.

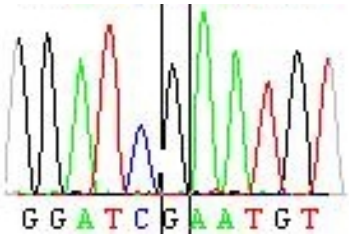


Abbildung 3.7. Polymorphismus c.2268A>G bei Patient 14 in der häufigeren homozygoten Variante. An Position 2268 der Sequenz (markiert durch die beiden senkrechten Striche) zeigt sich ein reines G-Signal.

Exon 41 In diesem Exon haben wir bei zwei Proben dieselbe homozygote Mutation gefunden. Bei den Proben von Patient 14 und 18 ist an der Position 5668 der cDNA-Sequenz Guanin durch Thymin ersetzt (c.5668G>T). Auf Proteinebene führt dies zu einer *Nonsense*-Mutation und damit zum Kettenabbruch an Position 1890 (p.G1890*).

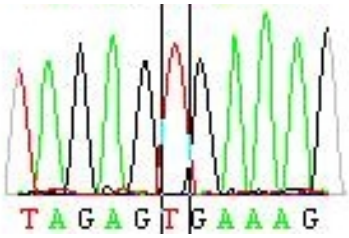


Abbildung 3.8. Sequenzausschnitt von Exon 41 des Patienten 14. An Position 5668 (markiert durch die beiden senkrechten Striche) lässt sich ein reines T-Signal darstellen.

Exon 42 Die Ergebnisse der Sequenzierungen von Exon 42 waren bei allen Proben unauffällig.

Exon 43 Im Exon 43 fand sich bei Patient 19 eine Auffälligkeit. Hier liegt an der Position 5932 der Nukleotidsequenz ein Austausch der Base Cytosin zu Thymin vor (c.5932C>T). Es handelt sich bei der Veränderung um eine heterozygote Mutation, die auf Proteinebene an Position 1978 zu einem Abbruch der Polypeptidkette führt (p.R1978*). Somit liegt eine *Nonsense*-Mutation vor.

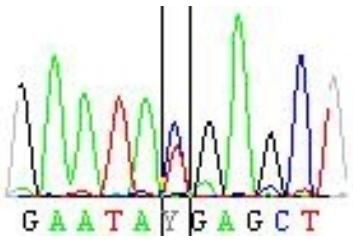


Abbildung 3.9. Heterozygote Veränderung in der Sequenz von Patient 19 in Exon 43. Anstelle eines reinen C-Signals zeigt sich an Position 5932 der cDNA (markiert durch die beiden senkrechten Striche) bei diesem Patienten ein zusätzliches T-Signal.

Exon 44-53 In den letzten neun Exons vom *CEP290*-Gen stimmte die Reihenfolge der Nukleotide aus unseren Sequenzierungen mit denen der Datenbank überein. Wir konnten keine weiteren Veränderungen in diesem Gen finden.

3.2.2. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Mutationen

Patient	Exon	Veränderung auf DNA-Ebene	Veränderung auf Proteinebene	heterozygot	homozygot
5	17	c.1669C>T	p.R557C	×	
11	19	c.1908A>T	p.K636N	×	
14	41	c.5668G>T	p.G1890*		×
18	41	c.5668G>T	p.G1890*		×
19	17 43	c.1665_1666delAA c.5932C>T	p.K555fs*19 p.R1978*	× ×	

Tabelle 3.1. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Mutationen in *CEP290*.

3.2.3. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Polymorphismen

Exon	Veränderung auf DNA-Ebene	Veränderung auf Protein-ebene	rsNummer	Heterozygot bei Patient	Homozygot bei Patient
10	c.829G>C	p.E277Q	rs45502896	16	
21	c.2055T>C	still	rs45465996	2, 3, 4, 5, 6, 15, 21	
22	c.2268A>G	still	rs2468255	1, 2, 4, 5, 16	3, 6, 7, 9, 11–15, 17–21, 24, 25

Tabelle 3.2. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Polymorphismen in *CEP290*.

3.2.4. Phänotyp der Patienten mit Mutationen im CEP290-Gen

Patient 5 (c.1669C>T, p.R557C, heterozygot)

Patient 5 wurde 1999 als Sohn deutscher nicht-konsanguiner Eltern geboren. In den uns vorliegenden Unterlagen aus dem Jahr 2008 wird über Sauerstoffabfälle in der Postpartalperiode berichtet. Zusätzlich sollen bei dem Jungen eine muskuläre Hypotonie, eine Ataxie und eine geistige Retardierung vorliegen. Im cMRT konnte ein MTS nachgewiesen werden. Auch werden ein Aderhautkolobom des rechten Auges und ein Nystagmus beschrieben.

Patient 11 (c.1908A>T, p.K636N, homozygot)

Bei Patient 11 handelt es sich um die 2003 geborene Tochter nicht-konsanguiner deutscher Eltern. Sie ist ein ehemals eutrophes Frühgeborenes aus der 34+4 SSW mit perinataler Asphyxie, cerebralem Krampfanfall, Atemnotsyndrom, subaaortalem Ventrikelseptumdefekt und einer beidseitigen postaxialen Hexadaktylie. Die frühkindliche Entwicklung verlief verzögert. Ein cMRT im Alter von drei Jahren zeigte erweiterte Seitenventrikel, sowie eine Vermisagenesie. Zusätzlich wird in einem Arztbrief aus dem Jahr 2007 von einer somatomotorischen Entwicklungsstörung, einem Nystagmus und einem Hydrocephalus internus berichtet.

Patient 14 (c.5668G>T, p.G1890*, homozygot)

Es handelt sich um die Tochter konsanguiner türkischer Eltern. Das Mädchen wurde 2008 nach unauffälliger Schwangerschaft in der 38. SSW als hypotrophes Neugeborenes geboren. Einem Arztbrief von 2009 ist zu entnehmen, dass das Kind in der Postpartalperiode durch rezidivierende Hypoglykämien und ein unzureichendes Trinkverhalten auffiel. Im Alter von einem Monat zeigten sich bei der Patientin ruckartige, wiederkehrende Kopfbewegungen und ein vermehrtes Zittern von Armen und Beinen, deren Ursache vorerst nicht festgestellt werden konnte. Diese ungezielten Kopf- und Extremitätenbewegungen nahmen im Verlauf ab und treten seitdem nur noch vereinzelt auf. Seit dem 2. Lebensmonat führt das Mädchen unwillkürliche Augenbewegungen sowohl in der vertikalen, als auch in der horizontalen Ebene durch. Es konnten ein zeitweiser dissoziierter Pendelnystagmus, eine inkonstante Augenstellung, eine inkonstante Fixation sowie eine hochgradige Fehlsichtigkeit diagnostiziert werden. Des Weiteren besteht bei der Patientin eine generalisierte muskuläre Hypotonie mit zum Teil dystonem Bewegungsmuster der Arme. Auch berichtet die Mutter von Phasen einer Hyperpnoe. Das cMRT-Bild des Mädchens zeigte einen nach kranial verzogenen 4. Ventrikel sowie eine deutliche Kleinhirnhypoplasie (MTS). Hinweise

für eine Nieren- oder Leberbeteiligung bestanden zum Zeitpunkt der Untersuchung im Alter von einem Jahr nicht.

Patient 18 (c.5668G>T, p.G1890*, homozygot)

Patient 18 kam 2005 als Sohn konsanguiner türkischer Eltern zur Welt. Über die Postpartalperiode und mögliche Atemregulationsstörungen in dieser Zeit liegen keine Informationen vor. Der Junge ist stark mental retardiert und leidet unter einer Epilepsie sowie einem Nystagmus. Im cMRT konnte ein MTS gefunden werden. Es liegt eine Augenbeteiligung in Form einer Hyperpigmentierung der Retina vor. Außerdem wurde bei ihm eine Nephronophthise festgestellt.

Patient 19 (c.1665_1666delAA, p.K555fs*19 und c.5932C>T, p.R1978*, compound-heterozygot)

Die Tochter zweier nicht-konsanguiner deutscher Eltern wurde 2009 als hypotrophes Neugeborenes in der 37+4 SSW geboren. Bei einer Untersuchung im Alter von neun Monaten war das Mädchen deutlich entwicklungsretardiert, litt unter einer starken Hyperopie und zeigte einen überwiegend horizontalen Nystagmus, teilweise auch einen Downbeat-Nystagmus. Es bestand der Verdacht auf ein linksseitiges Sehnervkolobom. Der Rumpf der Patientin war deutlich hypoton. Dabei zeigt sie ein ataktisch-dystones Bewegungsmuster. Das Mädchen hatte in der Neugeborenenperiode Phasen starker Hypopnoe mit Sättigungsabfällen auf bis zu 70% Sauerstoffgehalt, die vor allem in den Einschlafphasen auftraten und dann selbstlimitierend waren. Im cMRT konnte ein MTS nachgewiesen werden. Eine abdominelle Sonographie im Rahmen einer Nachuntersuchung 2011 ergab den Verdacht auf eine Nephronophthise, Hinweise für Zysten in der Leber wurden nicht gefunden.

3.2.5. Tabellarische Übersicht der Phänotypen von Patienten mit Mutationen im *CEP290*-Gen

Nr.	Mutation in CEP290	m/w	GJ	e. K.	MTS	a. rad.	Atmung	Augen	Leber	Niere	Andere
5	c.1669C>T, p.R557C (heteroz.)	m	1999	-	+		AP	NY, KOL			MR, MHT, AT
11	c.1908A>T, p.K636N (heteroz.)	w	2003	-	+	HC, CVA	AP	NY			MR, VSD, PD
14	c.5674G>T, p.G1892X (homoz.)	w	2008	+	+		TP	NY, S			EV, AT, MHT
18	c.5674G>T, p.G1892X (homoz.)	m	2005	+	+			NY, HR		NPH	MR, E
19	c.1665_1666delAA, p.K555fs*19 und c.5932C>T, p.R1978*	w	2009	-	+		AP	NY, KOL		NPH	EV,AT, MHT

Tabelle 3.3. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Phänotypen der Patienten, bei denen wir Mutationen im *CEP290*-Gen gefunden haben. **Abkürzungen:** Nr.=Patientennummer, m=männlich, w=weiblich, GJ=Geburtsjahr, e.K.=elterliche Konsanguinität, MTS=*Molar tooth sign*, **a. rad.**=andere radiologische Auffälligkeiten: CVA=Agenesie des Vermis cerebelli, HC=Hydrocephalus, **Atmung:** AP=Apnoe, TP=Tachpnoe, **Augen:** HR=Hyperpigmentierung der Retina, KOL=Kolobom, NY=Nystagmus, S=Strabismus, **Niere:** NPH=Nephronophthise, **Andere:** AT=Ataxie, E=Epilepsie,EV=Entwicklungsverzögerung, MHT=muskuläre Hypotonie, MR=Mentale Retardierung, PD=Polydaktylie, VSD=Ventrikelseptumdefekt

3.3. Auswertung der *TMEM67*-Analyse

3.3.1. Sequenzierung des *TMEM67*-Gens

Exon 1 Im ersten Exon des *TMEM67*-Gens konnten wir keine Veränderungen nachweisen.

Exon 2 Die erste heterozygote Mutation im *TMEM67*-Gen fanden wir in Exon 2 in der Probe von Patient 6. Bei ihm zeigte sich eine *Missense*-Mutation an Position 226 der cDNA. Hier liegt ein Basenaustausch von Adenin zu Guanin vor (c.226A>G). Dieser hat an Position 76 der Polypeptidkette einen Ersatz der hydrophilen Aminosäure Threonin zu der hydrophoben Aminosäure Alanin zur Folge (p.T76A).

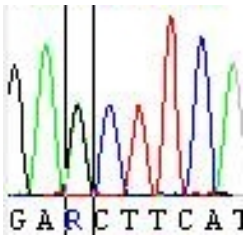


Abbildung 3.10. Sequenzausschnitt von Exon 2 bei Patient 6. An Position 226 (markiert durch die beiden senkrechten Striche) befindet sich zusätzlich zu dem Signal der Base Adenin ein Signal von Guanin.

Exon 3-5 Die Ergebnisse der Sequenzierungen der Exons 3-5 waren unauffällig. Es konnten keine Sequenzveränderungen gefunden werden.

Exon 6 Die nächste Auffälligkeit zeigte sich in der Probe von Patient 22 im sechsten Exon. Hier detektierten wir an der Position 579 der cDNA-Sequenz eine Deletion (c.579delA). Es fehlt die Base Adenin. Auf Proteinebene kommt es dadurch zu einem Verschub des Leserasters, einem sogenannten *Frameshift*. An der 195. Stelle der Polypeptidkette wird zuerst statt der neutralen Aminosäure Glycin die saure Aminosäure Asparaginsäure eingesetzt, dann folgt nach 25 weiteren Aminosäuren der Abbruch der Peptidkette (G195Dfs*27).

Exon 7 Wir fanden bei keinem Patienten eine Veränderung der Nukleotidsequenz in Exon 7.

Exon 8 Bei der Sequenzierung von Exon 8 detektierten wir bei Patient 2 eine heterozygote Veränderung in der Basenreihenfolge. Wir konnten einen Ersatz der Base Guanin durch

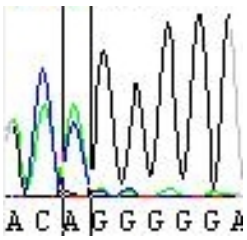


Abbildung 3.11. Sequenzausschnitt von Exon 6 bei Patient 22. Durch das Fehlen eines Adenin-Signals kommt es zu einem Verschub der darauffolgenden Basen.

Adenin an Position 781 der cDNA nachweisen (c.781G>A). Auf Proteinebene führt dieses an Position 261 dazu, dass die Aminosäure Asparaginsäure durch Asparagin ersetzt wird (p.D261N). Es wird dabei also eine saure durch eine neutrale Aminosäure ausgetauscht. Diese Veränderung wird als Polymorphismus eingeschätzt und trägt die Nummer rs35793208.

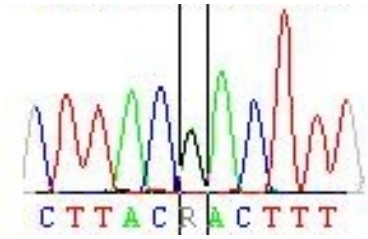


Abbildung 3.12. Heterozygote Veränderung der Sequenz des Exon 8 bei Patient 2. An Position 781 (markiert durch die beiden senkrechten Striche) befindet sich neben dem üblichen G-Signal ein A-Signal.

Exon 9 und 10 In Exon 9 und 10 entsprachen unsere ermittelten Sequenzen der Referenzsequenz aus der Datenbank.

Exon 11 Eine häufige Veränderung fanden wir am Ende von Intron 10 in der Nähe der Spleißregion zu Exon 11. Bei 14 unserer Patienten konnten wir hier einen hetero- (Patient 1, 3, 6, 10, 16, 17 und 22) oder homozygoten (2, 4, 5, 11, 15, 21 und 25) Ersatz von Cytosin durch Thymin nachweisen (c.1066-3C>T). Da die Veränderung im nicht-kodierenen Abschnitt, also im Intron lokalisiert ist, hat sie keine Auswirkungen auf die Proteinebene. Sie ist als Polymorphismus unter der Nummer rs3097427 beschrieben.

Des Weiteren konnten wir bei drei Patienten Mutationen in Exon 11 finden. Patient 2 zeigte an Position 1073 der cDNA eine heterozygote Veränderung. Hier liegt Thymin statt Cytosin vor (c.1073C>T). Als Folge davon wird an Position 358 statt Prolin Leucin in die Polypeptidkette eingebaut (p.P358L). Hierbei handelt es sich um eine *Missense*-Mutation,

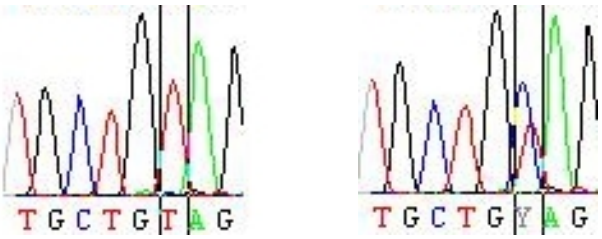


Abbildung 3.13. Sequenzausschnitt vom Übergangsbereich vom Intron 10 zu Exon 11 bei Patient 2 (links) und Patient 22 (rechts). Es liegen einmal ein homozygoter und einmal ein heterozygoter Ersatz der Base Cytosin durch Thymin vor (markiert durch die beiden senkrechten Striche).

bei der das heterozyklische Prolin, das im Gegensatz zu den anderen Aminosäuren keine freie Aminogruppe enthält, durch das hydrophobe Leucin ersetzt wird.

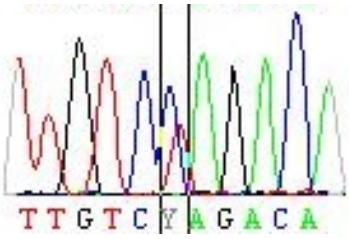


Abbildung 3.14. An Position 1073 (markiert durch die beiden senkrechten Striche) der Sequenz liegt bei Patient 2 neben dem C-Signal ein T-Signal vor.

Bei den Patienten 8 und 23 ist die Position 1115 der cDNA betroffen. An dieser Stelle ist bei ihnen Cytosin durch Adenin ersetzt (c.1115C>A). Dieses führt auf Proteinebene zu einem Austausch der hydrophilen Aminosäure Threonin durch das basische Lysin (p.T372K).

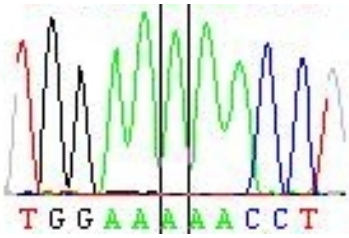


Abbildung 3.15. Bei 23 konnten wir an Position 1115 der Sequenz (markiert durch die beiden senkrechten Striche) anstelle des in der Referenzsequenz vorhandenen C-Signals ein A-Signal nachweisen. Dieselbe Veränderung fanden wir auch bei Patient 8.

Exon 12 Die Ergebnisse der Sequenzierungen von Exon 12 zeigten keine Besonderheiten.

Exon 13 In Exon 13 konnten wir in der Probe von Patient 6 eine Veränderung nachweisen. Hier zeigt sich in Position 1321 der cDNA-Sequenz der heterozygote Austausch von Cytosin

durch Thymin (c.1321C>T). Daraus resultiert der Einbau von der neutralen Aminosäure Cystein an die 441 Stelle der Polypeptidkette anstatt der basischen Aminosäure Arginin (p.R441C).

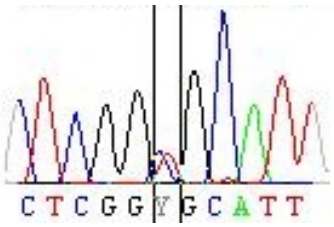


Abbildung 3.16. An Position 1321 (markiert durch die beiden senkrechten Striche) befinden sich bei Patient 6 sowohl ein C- als auch ein T-Signal.

Exon 14-17 In den nächsten vier Exons konnten wir keine Mutationen oder Polymorphismen nachweisen.

Exon 18 In Exon 18 fanden wir wieder bei vielen Patienten dieselbe Veränderung. Auch diese liegt bei einigen Patienten hetero- (Patient 1, 3, 5, 6, 10, 17 und 22) bei anderen (2, 4, 11, 15, 16, 21 und 25) homozygot vor. Es handelt sich um den Austausch von Adenin zu Guanin in Position 1810 der cDNA (c.1810A>G). Dieser führt auf Proteinebene zum Ersatz von Isoleucin durch Valin (p.I604V). Beide Aminosäuren sind Vertreter derselben Gruppe und gehören zu den hydrophoben Aminosäuren. Bei dieser Veränderung handelt es sich um den bereits bekannten Polymorphismus rs3134031.

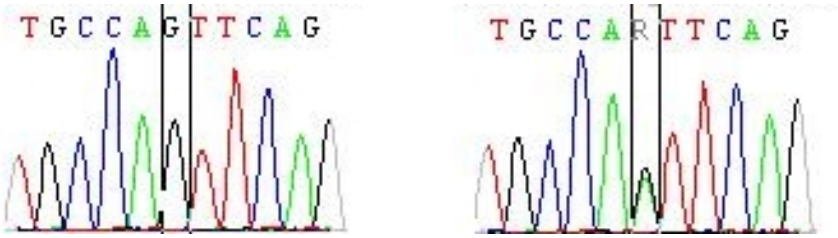


Abbildung 3.17. Homozygote (bei Patient 2; linkes Bild) und heterozygote (bei Patient 22; rechtes Bild) Variante der Veränderung c.1810A>G im Exon 18 (markiert durch die beiden senkrechten Striche).

Exon 19-22 Die Ergebnisse der Sequenzierungen der Exons 19-22 waren bei allen 25 Patienten unauffällig.

Exon 23 In Position 2397 der Nukleotidsequenz liegt bei Patient 1 ein heterozygoter Ersatz von Thymin durch Cytosin vor (c.2397T>C). Hierbei handelt es sich um eine stille Mutation ohne Auswirkungen auf die Bildung der Polypeptidkette.

Exon 24 Eine weitere Veränderung, die wir im *TMEM67*-Gen nachweisen konnten, betrifft das Exon 24. Hier fanden wir in den Proben der Patienten 2 und 22 jeweils dieselbe heterozygote Mutation. An Position 2498 der cDNA-Sequenz liegt hier die Base Cytosin statt der Base Thymin vor (c.2498T>C). Das hat zur Folge, dass auf Proteinebene das hydrophile Threonin satt dem hydrophoben Isoleucin in die Polypeptidkette eingebaut wird (p.I833T).

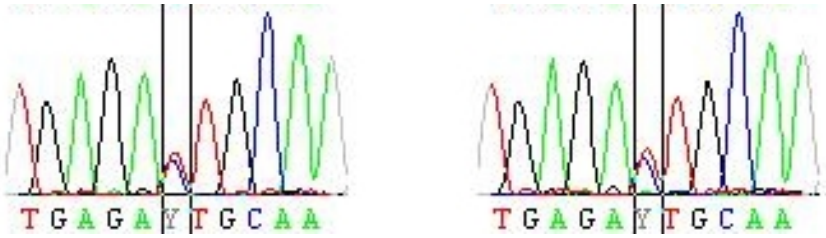


Abbildung 3.18. Bei Patient 2 (links) und 22 (rechts) liegt an Position 2498 (markiert durch die beiden senkrechten Striche) des Exon 24 ein zusätzliches C-Signal vor.

Exon 25-28 Die Sequenzierungen der letzten vier Exons des *TMEM67*-Gens zeigten keine weiteren Veränderungen mehr. Hier stimmten unsere ermittelten Sequenzen wieder mit denen der Datenbank überein.

3.3.2. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Mutationen

Patient	Exon	Veränderung auf DNA-Ebene	Veränderung auf Proteinebene	heterozygot	homozygot
2	11	c.1073C>T	p.P358L	×	
	24	c.2498T>C	p.I833T	×	
6	2	c.226A>G	p.T76A	×	
	13	c.1321C>T	p.R441C	×	
8	11	c.1115C>A	p.T372K		×
22	6	c.579delA	p.G195Dfs*27	×	
	24	c.2498T>C	p.I833T	×	
23	11	c.1115C>A	p.T372K		×

Tabelle 3.4. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Mutationen in *TMEM67*.

3.3.3. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Polymorphismen

Exon	Veränderung auf DNA-Ebene	Veränderung auf Protein-ebene	rsNummer	Heterozygot bei Patient	Homozygot bei Patient
8	c.781G>A	p.D261N	rs35793208	2	
11-20	c.1066-3C>T		rs3097427	1, 3, 6, 10, 16, 17, 22	2, 4, 5, 11, 15, 21, 25
18	c.1810A>G	p.I604V	rs3134031	1, 3, 5, 6, 10, 17, 22	2, 4, 11, 15, 16, 21, 25
23	c.2397T>C	still	nicht bekannt	1	

Tabelle 3.5. Tabellarische Übersicht über die gefundenen Polymorphismen in *TMEM67*.

3.3.4. Phänotyp der Patienten mit Mutationen im *TMEM67*-Gen

Patient 2 (c.1073C>T, p.P358L und c.2498T>C, p.I833T, compound-heterozygot)

Patient 2 ist ein im Jahr 2000 geborenes, mental retardiertes Mädchen. Bei den Eltern liegt keine Konsanguinität vor. Die erste Schwangerschaft der Mutter musste wegen eines Hydrocephalus des Feten mit okzipitaler Enzephalozele beendet werden. Die Patientin fiel in der Postpartalperiode durch Anpassungs- und Atemregulationsstörungen auf. Im cMRT konnte eine Kleinhirnwurmhypoplasie und damit verbunden ein MTS nachgewiesen werden. Zudem liegt eine Beteiligung der Augen in Form eines Koloboms vor. Das Mädchen hat einen Kleinwuchs und zeigt eine ataktische Bewegungsstörung. Des Weiteren sollen faziale Auffälligkeiten bestehen: ein Tiefstand der Ohren, sowie ein Hypertelorismus. Im abdominellen Ultraschall wurden bisher keine (z.B. zystischen) Veränderungen der Nieren und der Leber gefunden. Bei der Patientin besteht eine ausgeprägte Verhaltensproblematik mit Aggressivität, Autoaggressivität und autistischem Verhaltensmuster.

Patient 6 (c.226A>G, p.T76A und c.1321C>T, p.R441C, compound-heterozygot)

Patient 6 wurde 1996 geboren. Der Sohn nicht-konsanguiner Eltern wurde in der 40 SSW. spontan entbunden und hatte eine Geburtslänge von 56cm und ein Geburtsgewicht von 4320g. Bereits im ersten Lebensmonat zeigte er eine muskuläre Hypotonie. Später fiel eine ataktische Bewegungsstörung auf. In den zur Verfügung stehenden Arztbriefen aus dem Geburtsjahr des Patienten wird zusätzlich ein deutlicher Strabismus und ein Horizontalnystagmus mit Bulbusabweichung nach temporal links unten beschrieben. Auch wird von Dysmorphien des Gesichtsschädels berichtet. So sollen ein Hypertelorismus, eine

leicht prominente Stirn und ein tiefer Ohrenansatz vorliegen. Das cMRT zeigte ein MTS. Leber und Milz sind im Sinne einer Hepatosplenomegalie verändert.

Patient 8 (c.1115C>A, p.T372K, homozygot)

Patient 8 kam 2008 als Sohn türkischer konsanguiner Eltern zur Welt. In der Neugeborenenperiode fielen bei ihm Atemregulationsstörungen mit Phasen von Tachy- und Hypopnoen auf. Der Junge zeigt eine allgemeine Entwicklungsverzögerung und eine ataktische Bewegungsstörung. Im cMRT des Gehirns des Jungen konnte ein MTS nachgewiesen werden. Eine Augenbeteiligung hat er nicht, aber bei einer ebenfalls betroffenen Cousine des Jungen wurde ein Kolobom diagnostiziert. Patient 8 hat eine Leberfibrose mit Erhöhung der Leberwerte. Über eine Beteiligung der Nieren ist nichts bekannt.

Patient 22 (c.579delA, p.G195Dfs*27 und c.2498T>C, p.I833T, compound-heterozygot)

Bei Patient 22 handelt es sich um ein im Jahr 2003 geborenes Mädchen, deren Eltern nicht konsanguin sind. Das Mädchen hat eine globale mental betonte Entwicklungsretardierung. In der Postpartalperiode litt es unter Atemregulationsstörungen und einer Muskelhypotonie. Bei einer Augenuntersuchung im dritten Lebensmonat wurden beidseitige Iriskolobome diagnostiziert. Ein cMRT legte dann die Diagnose eines Joubert-Syndroms nahe. Dort zeigten sich ein MTS mit einer Vermisagenesie und Fehlbildungen der oberen Kleinhirnstiele, sowie eine Balkenhypoplasie. Das Mädchen hat eine Ataxie und kann bis heute nicht frei laufen. Auch die Leber des Kindes ist betroffen. Bereits mit 18 Monaten wurde eine Erhöhung der Leberwerte diagnostiziert. Eine Biopsie mit ca. 3,5 Jahren ergab eine schwere septenbildende Fibrose mit nodulärem Umbau im Sinne einer beginnenden Zirrhose. Die Untersuchungen der Nieren zeigten einen Normalbefund. Zusätzlich zu den typischen Symptomen des Joubert-Syndroms ist die Patientin laut den uns zur Verfügung stehenden klinischen Unterlagen minderwüchsig und hat eine Hörstörung.

Patient 23 (c.1115C>A, p.T372K, homozygot)

Die Tochter konsanguiner Eltern wurde 1996 spontan in der 39+3 SSW geboren. Bei ihr zeigten sich eine deutliche psychomotorische Retardierung, eine hypoton-ataktische Bewegungsstörung und Atemregulationsstörungen. Ophthalmologisch konnten im Alter von 14 Monaten eine Hyperopie, ein chorioretinales Kolobom sowie ein Strabismus diagnostiziert werden. Im daraufhin angefertigten cMRT imponierte eine schwere Vermishypoplasie mit typischen Veränderungen vom 4. Ventrikel und Hirnstamm (MTS). Im Alter von

11,5 Jahren zeigten sich eine Hepatopathie mit Erhöhung der Leberenzyme sowie eine Organvergrößerung ohne strukturelle Anomalien.

Die Patientin hat einen ebenfalls betroffenen drei Jahre älteren Bruder. Dieser zeigt mit Ausnahme der ophthalmologischen Befunde ähnliche Symptome. Die augenärztliche Untersuchung im Alter von ca. 5,5 Jahren ergab bei ihm retrobulbäre zystische Veränderungen mit Optikusatrophie, einen Mikrophthalmus beidseits, einen Zustand nach Ablatio retinae links sowie eine Amaurose. Die Leber des Jungen war im Alter von 11,5 Jahren schon stärker betroffen als die seiner Schwester. So zeigte die Biopsie eine schwergradige septenbildende Fibrose mit nodulärem Umbau im Sinne einer beginnenden Zirrhose. Bei dem Patienten liegt außerdem eine ausgeprägte autistische Verhaltensstörung vor.

3.3.5. Tabellarische Übersicht der Phänotypen von Patienten mit Mutationen im *TMEM67*-Gen

Nr.	Mutation in TMEM67	m/w	GJ	e. K.	MTS	a. rad.	Atmung	Augen	Leber	Niere	Andere
2	c.1073C>T, p.P358L und c.2498T>C, p.I833T	w	2000	-	+		AP/TP	KOL			MR, AT, KW, HT, TO
6	c.226A>G, p.T76A und c.1321C>T, p.R441C	m	1996	-	+			NY, S	HSM		MR, AT, MHT, HT, TO
8	c.1115C>A, p.T372K (homoz.)	m	2008	+	+		AP/TP	KOL (bei Cousine)	LF, ELE		EV, AT
22	c.579delA, p.G195Dfs*27 und c.2498T>C, p.I833T	w	2003	-	+	CVA, HCC	AP/TP	KOL	LF, ELE		MR, MHT, AT, KW, HS
23	1115C>A, p.T372K (homoz.)	w	1996	+	+		AP/TP	KOL, S, HO	LF, ELE		MR, AT

Tabelle 3.6. Die Tabelle gibt eine Übersicht über die Phänotypen der Patienten, bei denen wir Mutationen im *TMEM67*-Gen gefunden haben. **Abkürzungen:** Nr.=Patientennummer, m=männlich, w=weiblich, GJ=Geburtsjahr, e.K.=elterliche Konsanguinität, MTS=*Molar tooth sign*, **a. rad.**=andere radiologische Auffälligkeiten: CVA=Agenesie des Vermis cerebelli, HCC=Hypoplasie des Corpus callosum, **Atmung:** AP=Apnoe, TP=Tachpnoe, **Augen:** HO=Hyperopie, KOL=Kolobom, NY=Nystagmus, S=Strabismus, **Leber:** ELE=erhöhte Leberenzyme, HSM=Hepatosplenomegalie LF=Leberfibrose, **Andere:** AT=Ataxie, EV=Entwicklungsverzögerung, HS=Hörstörung, HT=Hypertelorismus, KW=Kleinwuchs, MHT=muskuläre Hypotonie, MR=Mentale Retardierung, TO= Tiefstand der Ohren

4. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von 25 Patienten mit den klinischen Zeichen eines Joubert-Syndroms auf Deletionen im *NPHP1*-Gen sowie auf Mutationen im *CEP290*- und *TMEM67*-Gen analysiert. Dabei sollte bei Sequenzveränderungen der beiden letzten Gene auch zwischen Mutationen und Polymorphismen unterschieden werden.

In der Humangenetik wird der Begriff „Mutation“ oft nicht einheitlich verwendet. In dieser Arbeit bezieht er sich auf Veränderungen in der DNA-Sequenz, bei denen eine Krankheitsrelevanz zu erwarten ist. Man unterscheidet verschiedene Formen von Mutationen, deren Folgen mehr oder weniger schwerwiegend für die Funktion des entstehenden Proteins sein können.

Häufig vorkommende Veränderungen sind Punktmutationen. Darunter versteht man Mutationen, die ein einziges Basenpaar betreffen. Sie können durch drei verschiedene Mechanismen entstehen. Am häufigsten kommt es zu einem Basenaustausch, einer Substitution. Es ist auch möglich, dass eine zusätzliche Base in die Sequenz eingeschoben wird (Insertion), oder der Verlust einer Base vorliegt (Deletion).

Die Folgen einer Punktmutation sind sehr variabel und davon abhängig, wo die Mutation lokalisiert ist, ob sie zu einem Aminosäureaustausch führt und wenn ja, welche Aminosäuren gegeneinander ausgetauscht werden. So haben viele Punktmutationen, vor allem wenn es sich um die dritte Base eines Kodons handelt, keine Auswirkungen auf die Aminosäuresequenz und die Proteinfunktion. Sie werden als stille Mutationen bezeichnet und in der vorliegenden Arbeit den Polymorphismen zugeordnet, weil sie keine Krankheitsrelevanz besitzen.

Anders ist es bei Punktmutationen, bei denen es zu einem Aminosäureaustausch kommt, sogenannten *Missense*-Mutationen. Die funktionellen Auswirkungen dieser Mutationen sind meist schwer vorherzusagen. Oft führen sie durch den Einbau einer Aminosäure mit veränderten Eigenschaften zu einer geringeren Stabilität und einem damit verbundenem vorzeitigem Abbau des Proteins. Sie können aber auch einen Funktionsverlust bei erhaltener Stabilität verursachen.

Führt ein Aminosäureaustausch zu einem Stoppkodon, werden die Mutationen als *Nonsense*-Mutationen bezeichnet. Die Folge ist ein vorzeitiger Abbruch der Polypeptidkette und es

kommt üblicherweise zu einem vollständigen Funktionsverlust des zu synthetisierenden Peptids.

Kleine Deletionen oder Insertionen führen in der Regel, insofern es sich bei den fehlenden bzw. zusätzlichen Basen nicht um drei oder ein Vielfaches von drei handelt, zu einem Verschub des Leserasters. Man spricht in diesem Falle von *Frameshift*-Mutationen. Auch *Frameshift*-Mutationen führen in den meisten Fällen durch die vorzeitige Entstehung eines Stoppkodons zu Abbrüchen der Polypeptidkette mit der Folge des Funktionsverlustes des Peptids (Vergl. Lehrbücher der Humangenetik z.B. Schaaf und Zschocke, Basiswissen der Humangenetik, S.51-53).

Von den Mutationen müssen die Polymorphismen abgegrenzt werden. Der Begriff Polymorphismus wird in der Genetik häufigkeitsabhängig definiert. Er wird für Sequenzvarianten verwendet, bei denen das seltenere Allel in der untersuchten Population eine Frequenz von mindestens 1% aufweist (Schaaf und Zschocke, Basiswissen der Humangenetik, S.41) Die häufigste Variante ist der Einzel-Nukleotid-Polymorphismus (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP). Dabei handelt es sich um den Austausch einer einzigen Nukleotidbase. SNPs finden sich sowohl in kodierenden als auch in nicht-kodierenden Regionen des Genoms. Oft haben diese Veränderungen keinen Einfluss auf Proteinebene. Allerdings wird mittlerweile davon ausgegangen, dass viele *SNPs* möglicherweise zu multifaktoriellen Krankheiten prädisponieren können (Frazer et al., 2009).

In dieser Arbeit wurden solche Veränderungen der Nukleotidsequenz als Polymorphismen bezeichnet, die in den Datenbanken als bekannte SNPs eingetragen waren, bei vielen unserer Patienten vorlagen oder die auch bei Normalpersonen gefunden werden können.

Bei der Analyse des *CEP290*- und des *TMEM67*-Gens haben wir sowohl *Missense*-, *Nonsense*- und *Frameshift*-Mutationen, als auch Deletionen und verschiedene Polymorphismen gefunden.

4.1. *NPHP1*-Gen

Abbildung 4.1. Schema des NPHP1-Proteins (nach: Wolf et al., 2005). CC=*coiled-coil*-Domänen, SH3= *src homology 3*-Domäne, E-rich= Glutamatreiche Domäne, NHD=Nephrocystin-homologe Domäne.

In der vorliegenden Arbeit konnte bei keinem der 25 Patienten eine homozygote Deletion im *NPHP1*-Gen nachgewiesen werden. In der Literatur sind diese bei 1-2% der Joubert-Patienten einer nicht vorselektierten Kohorte als Ursache der Erkrankung beschrieben. Höher sind die Detektionsraten, wenn bei den Patienten eine Beteiligung der Nieren, vor allem eine juvenile Nephronophthise, vorliegt (Parisi et al., 2009). Dieses lässt sich aus der Proteinstruktur und -funktion erklären.

Das Genprodukt des *NPHP1*-Gens heißt Nephrocystin-1. Im Jahr 2000 konnten Donaldson et al. nachweisen, dass Nephrocystin-1 eine SH3-Domäne (*src homology 3*) aufweist. SH3-Domänen sind Proteindomänen, die bestimmte Interaktionen zwischen Proteinen vermitteln. Sie erkennen prolinreiche Aminosäuremotive, die nach dem Muster PXXP (P=Prolin, X=beliebige Aminosäure) aufgebaut sind. Daher spielen SH3-Domänen eine besondere Rolle in Proteinen, die mit anderen interagieren und an Signaltransduktionsprozessen beteiligt sind. SH3-Domänen wurden in Proteinen gefunden, die eine Bedeutung für die fokale Adhäsion zwischen der tubulären Basalmembran und den Tubuluszellen haben. So konnten Donaldson et al. nachweisen, dass Nephrocystin-1 mit dem p130Cas-Protein interagiert. Dieses ist ein Substrat der Tyrosinkinase und spielt eine wesentliche Rolle für die fokale Adhäsion. Dabei ist es mit Nephrocystin-1 in der Zonula adhaerens von renalen Epithelzellen kolokalisiert (Donaldson et al., 2000). Ein Jahr später zeigten Benzing et al. außerdem, dass Nephrocystin direkt mit Pyk2 interagiert und Komplexe mit p130Cas, Pyk2 (*proline-rich tyrosine kinase 2*) und Tensin in embryonischen Nieren- und Hodenzellen bildet. Nephrocystin-1 triggert dabei die Phosphorylierung des Tyrosins 402 von Pyk2. Diese Phosphorylierung wiederum bewirkt die Verstärkung von Kinasen aus der Src-Familie und die Interaktion mit anderen Adapter- und Effektormolekülen. Daher gehen die Autoren davon aus, dass Nephrocystin-1 eine wesentliche Rolle in einem Pyk2-abhängigen Signalweg in bestimmten Tubuluszellen spielt (Benzing et al., 2001). Mutationen im *NPHP1*-Gen, die ein funktionsloses oder in der Funktion eingeschränktes Nephrocystin-Protein zur Folge haben, könnten demnach also dazu führen, dass es zu einer Störung von Signalwegen der fokalen Adhäsion in Tubuluszellen kommt und dadurch die Entwicklung von Zysten in den Nieren der Betroffenen verursacht wird. So ließe sich auch erklären, warum Deletionen im *NPHP1*-Gen bisher nur bei Joubert-Patienten mit einem relativ mild ausgeprägtem Phänotyp gefunden wurden, die Nieren der Betroffenen aber zumeist stark (in Form einer Nephronophthise) beteiligt waren (Parisi et al., 2004). Untersucht man ein Kollektiv von Patienten mit Joubert-Syndrom, bei denen eine Nephronophthise diagnostiziert wurde, so betragen die Detektionsraten zwischen 10% und 30% (Parisi et al., 2009). In unserem Kollektiv waren aber, soweit uns klinische Daten vorliegen, nur sehr wenige Patienten zusätzlich an einer Nephronophthise erkrankt. Damit unterstützen unsere Ergebnisse die in der Literatur beschriebenen Beobachtungen.

Allerdings wäre es möglich, dass unsere Patienten andere Veränderungen in der *NPHP1*-Sequenz aufweisen könnten. Lägen zum Beispiel heterozygote Mutationen oder kleinere Deletionen sowie Punktmutationen vor, so hätten wir diese mit unserer Methode nicht detektieren können. Bisher wurde in der Literatur aber kein Joubert-Patient mit einer solchen Veränderung beschrieben.

4.2. *CEP290*-Gen

4.2.1. Aufbau und Funktion des CEP290-Proteins (NPHP6) und Lokalisation der gefundenen Mutationen

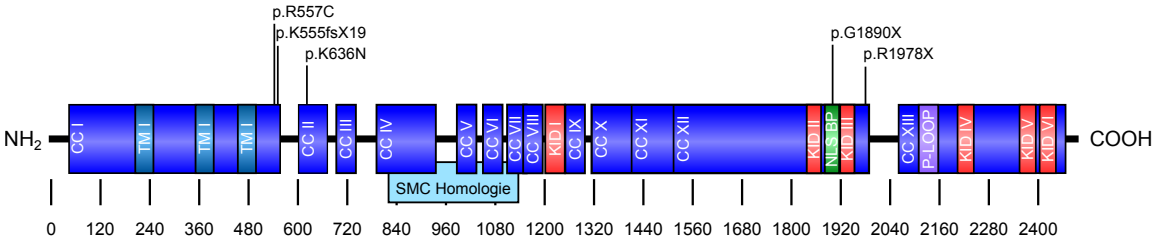


Abbildung 4.2. Schema des CEP290-Proteins (NPHP6) und Lokalisation der identifizierten Mutationen (nach: Sayer et al., 2006). Die Zahlen geben die Nummern der Aminosäuren an. CC=*coiled-coil*-Domänen, TM=Tropomyosin-homologe Domänen, SMC Homologie=Zu SMC-Proteinen homologe Region, KID=RepA/Rep+ KID-Motive, P-loop=ein ATP/GTP-Bindungsmotiv, NLS_BP=bipartite nuclear localization signal (zweiteiliges nukleäres Lokalisationssignal).

Das *CEP290*-Gen kodiert für das sogenannte NPHP6-Protein. NPHP6 ist in Zentromeren, Zellkernen von Nierenepithelien und in den Verbindungszilien von Photorezeptoren lokalisiert. Es enthält 13 *coiled-coil*-Domänen, drei Tropomyosin-homologe Domänen, ein ATP/GTP-Bindungsmotiv (P-loop), sechs RepA/Rep+ KID-Motive sowie ein zweiteiliges nukleäres Lokalisationssignal. Ungefähr mittig befindet sich außerdem eine Region, die homolog zu SMC-Proteinen (*Structural Maintenance of Chromosomes*) ist (s. Abbildung 4.2.). Bei den Untergruppen SMC1 und SMC3 konnte gezeigt werden, dass sie direkt mit dem Retinopathia Pigmentosa GTPase Regulator (RPGR) interagieren. Dabei handelt es sich um ein Protein, das in nichtmotilen Zilien und Zentromeren exprimiert wird und bei 15-20% der Individuen mit Retinopathia Pigmentosa mutiert ist. Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass das NPHP6-Protein strukturelle Ähnlichkeiten zu dem Kinetochor-Protein CENPF (*Centromere protein F*) besitzt. CENPF spielt eine Rolle in der Trennung von Chromosomen während der Mitose und ist mit der nukleären Matrix in der Interphase assoziiert (Sayer et al., 2006). Sayer et al. konnten ebenfalls nachweisen, dass NPHP6 mit ATF4 (*Activating transcription factor 4*) interagiert. Dabei handelt es ich um einen Transkriptionsfaktor, der mit der cAMP-abhängigen Bildung von renalen Zysten in Verbindung gebracht wird. NPHP6

verhält sich dabei antagonistisch zu CENPF. Es aktiviert ATF4 und ist somit relevant für die ATF4-vermittelte Transkription. Eine Ausschaltung des *CEP290*-Gens bei Zebrafischen führte zu den typischen renalen, retinalen und cerebellaren Zeichen, die bei Patienten mit Joubert-Syndrom gefunden werden. Außerdem spielt *CEP290* eine zentrale Rolle im G-Protein-gekoppelten Transport olfaktorischer Zellen (McEwen et al., 2007).

Betrachtet man die Lokalisation der von uns gefunden Mutationen in NPHP6, so fällt auf, dass sie alle in *coiled-coil*-Domänen liegen.

4.2.2. Mutationen im *CEP290*-Gen

Wir konnten bei drei Patienten krankheitsverursachende Mutationen im *CEP290*-Gen nachweisen. Das entspricht einer Mutationsrate von ca. 12,5% (3 von 24 Patienten). Der Anteil von *CEP290*-Mutationen in unselektierten Patientenkollektiven liegt in der Größenordnung von ca. 10% (Valente et al. 2006). Unser Ergebnis kommt diesem also sehr nahe. Zusätzlich fanden wir bei zwei weiteren Patienten jeweils eine heterozygote Mutation. Im nächsten Abschnitt werden die gefundenen Mutationen im Detail analysiert.

c. 1665_1666delAA, p.K555fs*19

Die erste Mutation fanden wir bei Patient 19 in Exon 17. Hierbei handelt es sich um eine Deletion. An den Positionen 1665 und 1666 der cDNA-Sequenz fehlt die Base Adenin. Daraus folgen auf Proteinebene eine Verschiebung des Leserasters und ein Abbruch der Polypeptidkette nach 19 Aminosäuren. Eine solche *Frameshift*-Mutation führt in der Regel zur Bildung eines funktionslosen Proteins. Man kann also davon ausgehen, dass die gefundene *Frameshift*-Mutation mit großer Sicherheit zur Ausbildung der Erkrankung bei unserem Patienten beigetragen hat. In der Literatur wurde diese Mutation bislang noch nicht beschrieben. Bei uns liegt sie als compound-heterozygote Mutation in Verbindung mit der *Nonsense*-Mutation c.5932C>T, p.R1978* vor.

c.1669C>T, p.R557C

Bei Patient 5 fanden wir die *Missense*-Mutation c.1669C>T. Auf Proteinebene führt sie zu einem Austausch der basischen Aminosäure Arginin zu der schwefelhaltigen Aminosäure Cystein. Auch diese Mutation wurde in der Literatur bisher noch nicht beschrieben. Durch den Austausch der beiden sehr verschiedenen Aminosäuren ist es aber wahrscheinlich, dass diese Mutation bei unserem Patienten zur Entstehung der Krankheit beigetragen hat. Da Cystein durch die Bildung von Disulfidbrücken in Proteinen vor allem für die Entstehung der Tertiär- und Quartärstruktur verantwortlich ist, kann eine solche zusätzliche

Aminosäure in der Polypeptidkette die Faltung des Proteins verändern und damit die Funktion stören.

Weiter würde die Verwendung der Internet-Software *„PolyPhen“* (`http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/`, letzter Zugriff 31.01.12) dafür sprechen, dass es sich bei der gefundenen Veränderung um eine relevante Mutation handelt. Diese schätzt die Mutation als „vermutlich krankheitsverursachend“ ein. Die Internet-Software "*Mutation Taster*"hat die Veränderung als Polymorphismus einstuft, wobei die Aminosäure im Tierreich konserviert ist. So befindet sich sowohl beim Rhesusaffen, beim Schimpansen als auch bei der Maus an der Position 557 der Polypeptidkette die Aminosäure Arginin. Da sich Gene im Laufe der Evolution immer wieder durch Mutationen verändern, geht man davon aus, dass die Aminosäuren, die im Tierreich konserviert sind, d.h. im Verlauf der Evolution Spezies-unabhängig erhalten geblieben sind, für die Struktur und Funktion des Proteins essentielle Bedeutung haben. Dieses würde also eher gegen einen Polymorphismus sprechen.

Leider konnten wir bei dem Patienten mit dieser *Missense*-Mutation keine weitere Mutation im *CEP290*-Gen finden, sodass wir die Ursache der Erkrankung bei diesem nicht vollständig aufklären konnten.

c.1908A>T, p.K636N

Auch diese *Missense*-Mutation lag bei einem unserer Patienten in heterozygoter Form als einzige Mutation im CEP290-Gen vor. Wir fanden sie in Exon 19 von Patient 11. An der Position 1908 ist Adenin durch Thymin ersetzt, wodurch die Aminosäure Asparagin statt Lysin an der Position 636 in die Polypeptidkette eingebaut wird.

Bei Asparagin handelt es sich um eine neutrale Aminosäure, wohingegen Lysin eine saure Seitenkette besitzt. Das Verhalten vieler Proteine hängt von der Aufnahme und Abgabe von Protonen durch dissoziable Gruppen in den Seitenketten einiger Aminosäuren in den Proteinen ab. So können die Seitenketten der geladenen Aminosäuren abhängig vom ph-Wert der Umgebung protoniert und deprotoniert werden. Während Aminosäuren mit einer basischen Seitenkette in ihrer protonierten Form einfach positiv geladen und in deprotonierter Form ungeladen sind, sind saure Aminosäuren in ihrer deprotonierten Form einfach negativ geladen und protoniert ungeladen. Das hat Einfluss auf die Löslichkeit der Aminosäuren. So sind in einer polaren Umgebung Aminosäuren mit geladenen Seitenketten gegenüber ungeladenen besser löslich. Je nachdem wie in einem Protein die Verteilung von sauren und basischen Aminosäuren vorliegt, können Abschnitte hydrophiler oder hydrophober werden. Dieses wiederum hat Einfluss auf die Faltung der Proteine, da sich hydrophobe Abschnitte zumeist ins Innere eines Proteins lagern, hydrophile Abschnitte dagegen nach außen. Ein Ersatz einer neutralen Aminosäure

durch eine basische Aminosäure kann daher die Struktur eines Proteins möglicherweise verändern und die Funktion desselben stören. Häufig wirken die geladenen Aminosäuren auch als chemisch aktive Gruppen bei der Substratumsetzung in Enzymen mit, sodass auch diese Funktion eines Proteins durch Wegfall einer basischen Aminosäure und Ersatz durch eine neutrale Aminosäure gestört werden könnte (Vgl. Löffler und Petrides, Biochemie und Pathobiochemie, Auflage 7, Seite 60).

Verwendet man die Internet-Software "*Mutation Taster*", so beurteilt diese die Veränderung als Polymorphismus und auch „*PolyPhen*"' gibt an, dass es sich voraussichtlich um eine „benigne Veränderung" handelt.

Zusammenfassend ist es also sowohl möglich, dass die gefundene *Missense*-Mutation bei Patient 11 zur Entstehung des Joubert-Syndroms beigetragen hat, es könnte aber auch sein, dass es sich lediglich um einen noch nicht beschriebenen Polymorphismus handelt und die Ursache der Erkrankung von Patient 11 in einem anderen Gen zu finden ist.

c.5668G>T, p.G1890*

Diese Mutation fanden wir bei zwei unserer Patienten (Patient 14 und 18) in Exon 41. Es handelt sich um eine *Nonsense*-Mutation. Durch den Austausch von Guanin durch Thymin in Position 5668 entsteht auf Proteinebene ein Stoppkodon, das zum Kettenabbruch an Position 1890 führt. Folge einer solchen *Nonsense*-Mutation sind unvollständige oder funktionslose Proteine. Die Mutation liegt bei unseren Patienten in homozygoter Form vor, sodass sie bei diesen mit hoher Wahrscheinlichkeit ursächlich für die Erkrankung ist.

Auch in anderen Studien wurde diese Mutation mehrmals nachgewiesen. 2006 konnte sie sowohl von Sayer et al., als auch von Valente et al. gefunden werden. Sayer et al. detektierten in ihrer Studie neun verschiedene Mutationen im *CEP290*-Gen in sieben Familien mit Joubert-Syndrom und einer Familie mit Senior-Løken-Syndrom. Die Mutation c.5668G>T konnten sie dabei in drei Familien nachweisen, einmal in heterozygoter und zweimal in homozygoter Form. Als heterozygote Variante lag die Mutation in einer deutschen Familie vor. Eine zweite Mutation im *CEP290*-Gen konnte aber nicht nachgewiesen werden. Bei dem Betroffenen sind eine Kleinhirnwurmaplasie, eine okzipitale Menigoenzephalozele, eine Ataxie, ein Nystagmus und eine mentale Retardierung beschrieben worden. Auch eine Beteiligung der Augen in Form einer kongenitalen Amaurose, eines zystischen Augentumors und einer tapetoretinalen Degeneration wurde diagnostiziert sowie eine Niereninsuffizienz, die mit 12 Jahren im Endstadium war.

Beide Familien, in denen die Mutation als homozygote Variante gefunden wurde, stammen aus der Türkei und die erkrankten Kinder haben konsanguine Eltern. In beiden Familien sind zwei Geschwisterkinder betroffen. In der ersten Familie wurden bei den Kindern

eine Kleinhirnwurmaplasie, eine Ataxie und eine mentale Retardierung diagnostiziert. Bei dem jüngeren Kind lag zusätzlich eine okzipitale Menigoenzephalozele vor, es hatte einen Nystagmus und eine kongenitale Amaurose. Bei dem älteren Kind wurde eine tapetoretinale Degeneration beschrieben. Auch bei diesen Geschwistern lag eine fortschreitende Niereninsuffizienz vor, die bei dem älteren Kind mit 11 Jahren im Endstadium war. Bei dem jüngeren Kind war die Nierenfunktion bereits im Alter von zwei Monaten signifikant reduziert. Auch die Symptome der Geschwister der anderen türkischen Familie sind mit den schon genannten vergleichbar. Auch bei ihnen wurden eine Kleinhirnwurmaplasie, eine Ataxie und eine fortschreitende Niereninsuffizienz beschrieben. Zu einer Beteiligung der Augen lagen keine Daten vor (Sayer et al., 2006).

Auch Valente et al. fanden 2006 Mutationen im *CEP290*-Gen in fünf Familien mit Joubert-Syndrom und unterschiedlichen neurologischen, retinalen und renalen Manifestationen, darunter auch die von uns gefundene Mutation. Diese lag bei einem 15- und einem 17-jähigen Jungen einer türkischen Familie vor. Beide hatten ein MTS, litten unter einer muskulären Hypotonie, einer Ataxie, einer okulomorischen Apraxie und waren mental retardiert. Bei dem älteren Jungen waren zusätzlich Atemstörungen aufgetreten. Auch hatten beide eine Augenbeteiligung. So lag bei ihnen eine Retinopathia Pigmentosa mit einer Visusverminderung vor. Bei dem 15-jährigen konnten außerdem Drusen im linken Auge gefunden werden Die Niere war bei ihnen in Form einer Nephronophthise betroffen. Bei dem jüngeren Jungen wurden auch kortikale Zysten der Niere beschrieben. Eine Erkrankung der Leber war zum Zeitpunkt der Untersuchung bei keinem der Jungen nachweisbar (Valente et al., 2006).

2007 konnte die Mutation in einer großen Studie von Brancati et al. nachgewiesen werden. Dort wurde die DNA von 128 Patienten mit *JSRDs* für Mutationen im *CEP290*-Gen analysiert. Gefunden wurden 23 verschiedene Mutationen darunter viermal die Mutation c.5668G>T in homozygoter Form. Bei allen betroffenen Patienten lagen ein MTS und die typischen neurologischen Zeichen eines Joubert-Syndroms vor. Eine Patientin mit der Mutation stammt aus Italien. Zusätzlich zu den schon genannten Mutationen wurden bei ihr eine Lebersche kongenitale Amaurose, eine Nephronophthise und ein Vorhofseptumdefekt beschrieben. Die zweite Patientin stammt aus Indien und hat ebenfalls eine Nephronophthise sowie eine Retinopathia Pigmentosa und einen Ventrikelseptumdefekt. Bei den anderen beiden Patienten handelt es sich um zwei Jungen aus den Vereinigten Arabischen Emiraten, deren Eltern jeweils konsanguin sind. Zu dem ersten Kind, einem achtjährigen Jungen, gibt es wenige klinische Daten. Neben dem MTS ist nur bekannt, dass ein Ultraschall der Nieren unauffällig war. Auch eine Erkrankung der Augen wurde nicht diagnostiziert. Bei dem andern fünfjährigen Jungen wurde lediglich eine Nephronophthise beschrieben. Auch bei ihm ist über eine Beteiligung der Augen nichts bekannt (Brancati et al., 2007).

Vergleicht man die Klinik der Patienten aus der Literatur mit der unserer Patienten, fällt auf, dass auch unsere Patienten beide einen Nystagmus haben so wie bei den Patienten von Sayer et al. beschrieben. Patient 18 hat unter anderem eine Nephronophthise, wodurch auch hier eine Übereinstimmung zu den Patienten der anderen Studien zu finden ist. Leider fehlen uns die Informationen über eine Nierenbeteiligung von Patientin 14. Es wäre interessant zu wissen, ob auch sie eine Nephronophthise oder eine andere Erkrankung der Niere hat. Zusätzlich ist anzumerken, dass weder bei unseren Patienten, noch bei denen aus den oben genannten Studien eine Beteiligung der Leber vorliegt.

c.5932C>T, p.R1978*

Auch die letzte Mutation, die wir im *CEP290*-Gen gefunden haben, ist eine *Nonsense*-Mutation. In Exon 43 liegt an der Position 5932 der Nukleotidsequenz ein Austausch der Base Cytosin zu Thymin vor. Es handelt sich um eine heterozygote Mutation, die auf Proteinebene an Position 1978 zur Entstehung eines Stoppkodons und damit dem Abbruch der Polypeptidkette führt. Bei unserem Patienten liegt die Mutation in Kombination mit der bereits beschriebenen *Frameshift*-Mutation, die ebenfalls zu einem Kettenabbruch führt, vor. Dass eine Kombination dieser beiden Mutationen bei unserem Patienten zur Entstehung des Syndroms geführt hat, ist damit sehr wahrscheinlich.

Die Mutation c.5932C>T wurde von Helou et al. 2007 ebenfalls gefunden. In der Studie wurde die DNA von 75 Familien mit Senior-Løken-Syndrom, 99 Familien mit Joubert-Syndrom und 21 Familien mit einer isolierten Nephronophthise für Mutationen im *CEP290*-Gen analysiert. Die Mutation wurde dabei als homozygote Variante in einer italienischen Familie nachgewiesen. Der Betroffene hat den Phänotyp eines Senior-Løken-Syndroms mit einer tapetoretinalen Degeneration. Daten zu möglichen Veränderungen des zentralen Nervensystems liegen nicht vor (Helou et al., 2007).

4.2.3. Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit Mutationen im *CEP290*-Gen

Bei der klinischen Beurteilung von Mutationen stellt sich grundsätzlich die Frage, ob eine Genotyp-Phänotyp-Korrelation zu erkennen ist. *CEP290*-Mutationen werden vor allem bei einem okulo-renalen Phänotyp gefunden (Sayer et al., 2006). Betrachtet man die klinischen Daten unserer Patienten, so findet sich auch bei diesen ein überwiegend okulo-renaler Phänotyp. Bei allen liegt eine Beteiligung der Augen vor. Bei Patient 14 findet sich unter anderem eine starke Fehlsichtigkeit, Patient 18 leidet an einer Hyperpigmentation der Retina und Patient 19 hat den Verdacht auf ein Sehnervenkolobom. Auch bei Patient 5, bei dem wir nur eine heterozygote Mutation im *CEP290*-Gen finden konnten, liegt

eine Augenbeteiligung in Form eines Aderhautkoloboms vor. Allerdings ist bei keinem unserer Patienten eine Retinopathia Pigmentosa beschrieben. Dieses ist eine typische Netzhautdegeneration bei Patienten mit Mutationen im *CEP290*-Gen, die auch bei einigen Patienten aus der Literatur mit denselben Mutationen vorgelegen hat (S. Abschnitt 4.2.2).

Es ist nicht ganz einfach eine klare Aussage über die Beteiligung der Nieren bei unseren Patienten zu machen. Bei Patient 18 konnte eine Nephronophthise gefunden werden und bei Patient 19 wurde sonographisch der Verdacht auf eine Nephronophthise geäußert, bei Patient 14 bestanden zum Zeitpunkt der Untersuchung aber noch keine Hinweise auf eine Erkrankung der Nieren. Dabei muss man bedenken, dass Patient 14 mit ca. zwei Jahren noch sehr jung ist. Die juvenile Nephronophthise ist gekennzeichnet durch eine langsam einsetzende tubulointerstitielle Nephritis. Zwischen dem vierten und sechsten Lebensjahr beginnt häufig eine Polyurie. Da die Symptomatik anfangs sehr gering ausgeprägt sein kann, wird die juvenile Nephronophthise oft erst in einem weit fortgeschrittenen Stadium der chronischen Niereninsuffizienz diagnostiziert (Hildebrandt et al., 2000). Es ist also zu erwarten, dass auch bei Patient 14 eine Beteiligung der Nieren vorliegt, die noch nicht diagnostiziert wurde bzw., dass sich eine Nephronophthise erst in den nächsten Jahren entwickeln wird. Dafür sprächen auch die klinischen Daten der Patienten aus der Literatur, bei denen die gleichen Mutationen vorliegen wie bei unseren Patienten. Bei vielen von ihnen wurde eine Nephronophthise bzw. eine fortschreitende Niereninsuffizienz gefunden (Sayer et al., 2006; Valente et al., 2006; Brancati et al., 2007). Es wäre daher interessant, unsere Patienten in den nächsten Jahren auf die Entwicklung einer Nierenerkrankung hin zu untersuchen.

Das gleiche gilt für eine Leberbeteiligung, die bei JBTS5-Patienten untypisch ist. Auch diese zeigt sich oft erst in einem fortgeschrittenen Lebensalter. Bei zwei unserer Patienten haben wir keine Informationen über eine Leberbeteiligung bekommen. Allerdings können wir sagen, dass bei den Patienten mit Mutationen im *TMEM67*-Gen häufig schon früh eine Erkrankung der Leber, oft mit einer Erhöhung der Leberenzyme einhergehend, diagnostiziert wurde (S. Abschnitt 3.3.4). Dieses ist bei unseren Patienten mit *CEP290*-Mutationen nicht der Fall gewesen, sodass man einen Unterschied zwischen den Patienten dieser beiden Gruppen feststellen kann. Hier ist es ebenfalls sinnvoll, die klinischen Daten aus der Literatur heranzuziehen. Denn auch dort wird bei den Patienten mit *CEP290*-Mutationen nicht über eine Beteiligung der Leber berichtet (Vgl. Sayer et al., 2006; Valente et al., 2006; Brancati et al., 2007).

Interessant wäre es auch zu untersuchen, ob und wie weit sich Träger homozygoter und Träger compound-heterozygoter Mutationen in ihrem Phänotyp unterscheiden. Diese Frage ist bei unseren Patienten nur schwer zu beantworten, weil dazu das Patientenkollektiv

nicht ausreichend ist. Es wäre sinnvoll in einer größeren Kohorte zu untersuchen, ob und in welchem Ausmaß Unterschiede im Phänotyp der Patienten bestehen.

4.2.4. Erklärungsansätze für Patienten mit nur einer heterozygoten Mutation im *CEP290*-Gen

Zusätzlich zu den beschriebenen drei Patienten, bei denen wir durch Analyse des *CEP290*-Gens das Auftreten des Joubert-Syndroms erklären konnten, konnten wir bei zwei weiteren Patienten nur die Mutation eines Allels nachweisen. Es handelt sich damit um heterozygote Träger einer Mutation im *CEP290*-Gen. Da das Joubert-Syndrom autosomal rezessiv vererbt wird, müssen entweder eine homozygote oder zwei compound-heterozygote Mutationen vorliegen, um eine sichere Aussage über die Ursache der Erkrankung machen zu können. Bei den beiden Patienten gab es keine Hinweise auf eine weitere Mutation dieses Gens. Allerdings können wir mit der von uns angewandten Sequenzierungsmethode die Deletion kompletter Exons nicht erfassen, sodass es möglich wäre, dass auf dem zweiten Allel eine Deletion von Teilen des Gens vorhanden ist, die wir nicht detektieren konnten.

Auch wäre es möglich, dass diese zwei Patienten eine Mutation beider Allele in einem anderen der selteneren Joubert-Gene haben, die in dieser Arbeit nicht sequenziert wurden. Sie wären dann also nicht an Joubert-Syndrom Typ 5, sondern an einer der anderen Formen, zum Beispiel Typ 1, Typ 2 oder Typ 7-15 erkrankt. Zudem könnte es sein, dass die Ursache in einem ganz anderen, bisher noch nicht beschriebenem Gen zu finden ist. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, lässt sich mit den bisher gefundenen 15 Genen nur etwa bei der Hälfte der Joubert-Patienten eine Erklärung für die Erkrankung finden, sodass es sehr wahrscheinlich ist, dass es noch andere mit dem Syndrom assoziierte Gene gibt.

Ein weiterer Erklärungsansatz wäre der einer digenen bzw. polygenen Vererbung. Darunter versteht man ein simultanes Auftreten mehrerer heterozygoter Mutationen in verschiedenen, mit der Krankheit assoziierten, Genen. Dieses könnte zu einer Summation der Auswirkungen der einzelnen Mutationen und damit zu der Entstehung des Krankheitsbildes führen. Eine solche digene Vererbung ist bereits für das Bardet-Biedel-Syndrom beschrieben worden (Katsanis et al. 2001). Kürzlich konnte auch bei einer Patientin mit Joubert-Syndrom, Patientin 2 aus dieser Studie, bei der wir zwei Mutationen im *TMEM67*-Gen nachgwiesen haben, eine zusätzliche Mutation im *KIF7*-Gen (JBTS12) gefunden werden. Dabei handelt es sich um die Deletion c.3986_3997del12 in Exon 18 des Gens. Die Autoren gehen davon aus, dass der Phänotyp dieser Patientin aus einem Zusammenspiel von drei mutierten Allelen in zwei verschiedenen Joubert-Genen resultiert. Dieses würde den Beobachtungen, die schon beim Bardet-Biedel-Syndrom gemacht wurden, entsprechen (Dafinger et al., 2011).

Noch ist wenig über das Zusammenspiel verschiedener Mutationen in unterschiedlichen Genen bekannt. Es zeigt sich aber immer deutlicher, dass sich viele Erkrankungen mit der Annahme einer rein monogenen Vererbung nicht erklären lassen. So sollte auch bei Patienten mit Joubert-Syndrom das Vorliegen einer digenen Vererbung in Betracht gezogen werden. Es könnte hilfreich sein, bei den Patienten, bei denen bisher nur eine heterozygote Mutation festgestellt werden konnte, nach Mutationen in den anderen Joubert-Genen zu suchen und dabei später auch Gene einzubeziehen, die zum heutigen Zeitpunkt noch nicht bekannt sind. Zusätzlich wäre es sinnvoll, bei Patienten, bei denen schon zwei heterozygote Mutationen bzw. eine homozygote Mutation gefunden wurden, nach weiteren Mutationen in den anderen Genen zu suchen, weil auch hier die Möglichkeit einer digenen Vererbung mit mehreren mutierten Allelen besteht und so mehr Informationen über die Vererbung des Joubert-Syndroms gewonnen werden könnten.

Zuletzt muss man in Betracht ziehen, dass es sich bei den von uns gefundenen Mutationen um noch nicht beschriebene Polymorphismen handeln könnte. Dieses halte ich bei der Mutation c.1669C>T (p.R557C) für sehr unwahrscheinlich. Bei Patient 11 und der Mutation c.1908A>T (p.K636N) wäre dies aber nach Angaben der verwendeten Internet-Software eine plausible Erklärung.

4.2.5. Polymorphismen im *CEP290*-Gen

Neben den genannten Mutationen fanden wir drei weitere Veränderungen im *CEP290*-Gen, die wir den Polymorphismen zugeordnet haben. Sie sollen im folgenden Abschnitt genauer beschrieben werden.

c.829G>C, p.E277Q

Den ersten Polymorphismus konnten wir in Exon 10 bei Patient 16 detektieren. An der Position 829 liegt hier statt Guanin die Base Cytosin vor, woraus auf Proteinebene ein Austausch von Glutaminsäure zu Glutamin an Position 277 der Polypeptidkette resultiert. Dieser Polymorphismus ist in der Datenbank des NCBI bekannt und unter der Nummer rs45502896 zu finden. Wir konnten in unserer Studie den Polymorphismus bei einem von 21 Patienten nachweisen. Das entspricht einer Häufigkeit von 4,76% und einer Allel-Häufigkeit für das C-Allel von 2,38%. Die Datenbank gibt für das C-Allel eine Häufigkeit von 1,7%, für das G-Allel eine von 98,3% an (`http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=45502896`, letzter Zugriff: 20.08.11), sodass unsere Ergebnisse diesen nahe kommen.

c.2055C>T

Einen zweiten Polymorphismus fanden wir bei sieben unserer Patienten. Bei ihnen zeigte sich eine heterozygote Veränderung an Position 2055 der Nukleotidsequenz. Anstelle der Base Thymin lag bei ihnen Cytosin vor (c.2055T>C). Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine stille Mutation ohne Auswirkungen auf die Reihenfolge der Aminosäuren in der entstehenden Polypeptidkette. Beschrieben ist dieser Polymorphismus unter der Nummer rs45465996 in der Datenbank des NCBI. Dort wird für das Allel T eine Häufigkeit von 83,3%, für das Allel C eine Häufigkeit von 16,7% angegeben (`http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=45465996`, letzter Zugriff: 20.08.11). Bei uns lag bei sieben von 21 Patienten die Base Cytosin statt der Base Thymin vor. Das entspricht einer Häufigeit von 16,7% für das seltenere C-Allel und deckt sich damit mit dem Wert aus der Datenbank.

c.2268A>G

Auch bei dem letzen Polymorphismus, den wir detektieren konnten, handelt es sich um eine stille Mutation. In der Datenbank ist er unter der Nummer rs2468255 zu finden. Bei uns lag der Polymorphismus bei 5 (ca. 23%) der Patienten in heterozygoter und bei 16 Patienten (ca. 73%) in homozygoter Form vor. Für diesen Polymorphismus gibt es eine große Anzahl unterschiedlicher Häufigkeitsangaben für verschiedene Populationen. Fasst man die verschiedenen Angaben zusammen, so erhält man für den Wildtyp A/A eine Häufigkeit von 19,1% (237 von 1241), für die heterozygote Variante A/G eine Häufigkeit von 22,8% (290 von 1241) und für die homozygote Form G/G eine Häufigkeit von 56% (714 von 1241) (`http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_ref.cgi?rs=2468255`, letzter Zugriff: 15.09.11; auf der Internetseite ist der Gegenstrang angegeben).

Vergleicht man diese Angaben mit unseren Häufigkeiten, so stimmt die Häufigkeit des Polymorphismus in seiner heterozygoten Form mit 23% bei uns und 22,8% in der Datenbank sehr gut überein. Der Wildtyp lag bei uns dagegen im homozygoten Zustand gar nicht vor, dafür war die Häufigkeit der Variante G/G bei uns mit 73% höher, als zu erwarten war. Eine Ursache hierfür ist sicherlich in den Vergleichspopulationen zu finden. So wurden bei der Erfassung der Gesamtzahlen auch Populationen aus Asien und Afrika mit ausgewertet, bei denen der Anteil der Variante A/A erheblich höher als in den europäischen Populationen ist. So wird zum Beispiel die Häufigkeit von A/A in einer Population aus Kenia mit 60% angegeben, wohingegen dieser Genotyp in einer großen europäischen Population ebenfalls gar nicht vorliegt.

4.3. *TMEM67*-Gen

4.3.1. Aufbau und Funktion des TMEM67-Proteins (Meckelin) und Lokalisation der gefundenen Mutationen

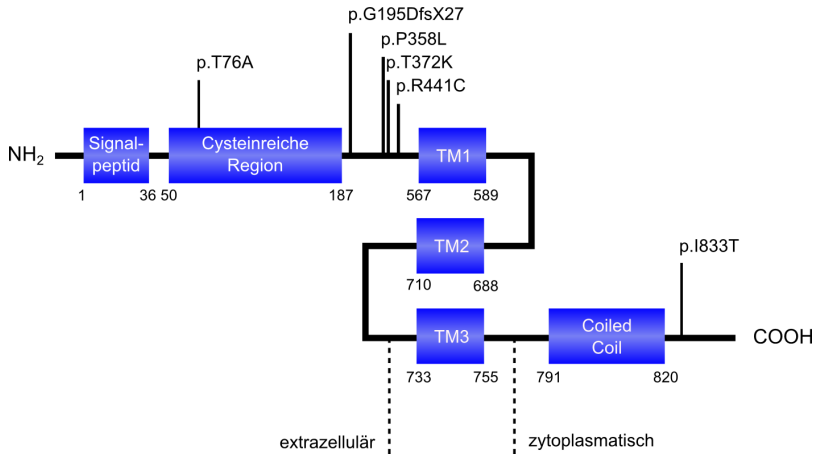


Abbildung 4.3. Schema des *Transmembrane protein 67* und Lokalisation der identifizierten Mutationen (nach: Brancati et al., 2009). Die Nummern geben die Position der Aminosäuren im Protein wieder. TM=Transmembrandomäne.

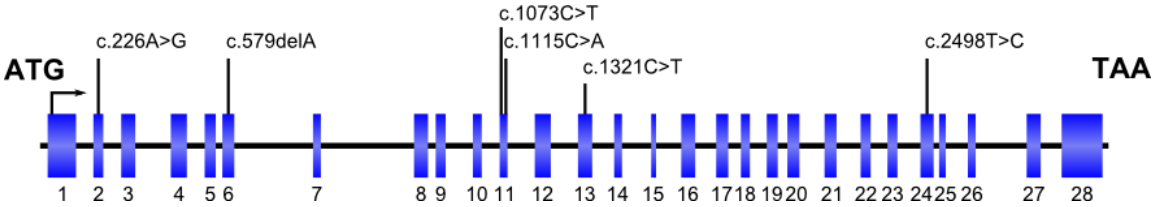


Abbildung 4.4. Schema des *TMEM67*-Gens mit den identifizierten Mutationen (nach: Brancati et al., 2009). Dargestellt sind die Exons des *TMEM67*-Gens nummeriert von 1-28 und die Lokalisation der detektierten Mutationen.

Das *TMEM67*-Gen kodiert für das Protein Meckelin. Dieses ist vor allem in Zellen der proximalen Nierentubuli sowie in biliären Epithelzellen lokalisiert und spielt eine Rolle für die Formation von primären, also nichtmotilen, Zilien (Dawe et al., 2007). Meckelin ist ein Transmembranprotein und durchquert die Membran dreimal. Es handelt sich damit um ein *Multipass*-Transmembranprotein. Zusätzlich zu den drei Transmembrandomänen enthält Meckelin ein Signalpeptid am Anfang des Proteins, sowie eine extrazelluläre cysteinreiche Region und eine *coiled-coil*-Domäne im zytoplasmatisch gelegenen Anteil. Auffällig ist, dass mit Ausnahme einer Mutation alle von uns gefundenen Veränderungen in Regionen lokalisiert sind, denen bisher keine bestimmte Proteinfunktion zugeordnet werden konnte. Nachfolgend werden die gefundenen Mutationen genauer betrachtet.

4.3.2. Mutationen im *TMEM67*-Gen

Im *TMEM67*-Gen fanden wir bei fünf von 22 Patienten Mutationen. Die Mutationsrate beträgt damit ca. 23%. In der Literatur wird für unselektierte Patientenkollektive eine Mutationsrate von 9%, für Patienten mit COACH-Syndrom eine Rate von 57-83% angegeben (Brancati et al., 2009; Doherty et al., 2009). Unser Ergebnis lässt sich dadurch erklären, dass es sich bei unserem Kollektiv zwar um ein unselektiertes handelte, bei einigen Patienten aber die Klinik eines COACH-Syndroms vorlag, sodass bei ihnen eine Mutation im *TMEM67*-Gen wahrscheinlich war.

c.226A>G, p.T76A

Diese Mutation ist in der cysteinreichen Region des *Transmembrane protein 67* lokalisiert. Cystein ist eine schwefelhaltige Aminosäure mit der Seitenkette -CH_2-SH. Zwischen zwei Cysteinseitenketten können unter Bildung von Cystin Disulfidbrücken entstehen. Diese spielen eine Rolle bei der Bildung und dem Erhalt der Tertiär- und Quartärstruktur von Proteinen (vgl. Lehrbücher der Biochemie). Daher ist es möglich, dass eine Mutation in diesem Bereich zu einer veränderten Proteinstruktur und einer damit einhergehenden gestörten Funktion führen kann. Unsere Mutation hat die Substitution der hydrophilen Aminosäure Threonin zu der hydrophoben Aminosäure Alanin bewirkt. Diese beiden Aminosäuren unterscheiden sich also erheblich in ihrem Aufbau. Des Weiteren ist Alanin vor allem für die Bildung von β-Helices, also die Sekundärstruktur eines Proteins, verantwortlich, wohingegen Threonin an seiner Hydroxygruppe phosphoryliert werden kann und dadurch zum Beispiel eine Rolle in der Enzymregulation spielen kann. Es ist wahrscheinlich, dass ein Austausch zweier so verschiedener Aminosäuren in einer für die Struktur wichtigen Region zu einer gestörten Proteinfunktion führt. Die Mutation liegt bei unserem Patienten 6 als compound-heterozygote Veränderung zusammen mit der Mutation c.1321C>T (p.R441C) vor.

Die Internet-Software „*PolyPhen*“ schätzt die Veränderung als „voraussichtlich benigne“ ein und auch die Software „*Mutation Taster*“ gibt an, dass es sich um einen Polymorphismus handeln könnte. Allerdings ist die Aminosäure im Tierreich konserviert. So liegt sowohl beim Schimpansen als auch beim Rhesusaffen, bei der Maus und beim Krallenfrosch an Position 76 in der Proteinkette die Aminosäure Threonin vor, was wiederum gegen einen Polymorphismus sprechen würde.

Zusammenfassend bleibt also offen, ob es sich bei der gefundenen Veränderung um eine krankheitsverursachende Mutation oder einen noch nicht beschriebenen Polymorphismus handelt. Sollte eine Mutation vorliegen, so wäre sie in der Literatur noch nicht beschrieben worden, sodass es sich um eine neue, bisher noch nicht gefundene Mutation handeln

könnte. Läge ein Polymorphismus vor, so wäre die Ursache der Erkrankung bei Patient 6 nicht eindeutig erklärt und es sollte nach Veränderungen in den weiteren bekannten Joubert-Genen gesucht werden.

c.579delA, p.G195Dfs*27

Diese Mutation in Exon 6 konnten wir in heterozygoter Form bei Patient 22 nachweisen. Sie lag zusammen mit der ebenfalls heterozygoten Mutation c.2498T>C (p.I833T) vor. Es handelt sich um eine *Frameshift*-Mutation. Diese führen, wie bereits beschrieben, in der Regel durch Kettenabbruch zu einem funktionslosen Protein. Dadurch ist zu erklären, dass die gefundene Mutation große Auswirkungen auf das Protein hat, obwohl sie in keiner relevanten Proteindomäne lokalisiert ist. Zusätzlich liegt die Mutation nahe der Spleißstellen und führt so zu einer veränderten mRNA-Bildung einhergehend mit einer Störung der Proteinfunktion.

2007 wurde diese Mutation erstmals von Consugar et al. beschrieben. Diese sequenzierten in ihrer Arbeit das *MKS1*- und *MKS3*- (*TMEM67*-) Gen in 17 Familien, bei denen in der Schwangerschaft klinisch ein Meckel-Gruber-Syndrom des Feten diagnostiziert worden war. In einer Familie konnte dabei die oben genannte Mutation nachgewiesen werden. Sie lag als heterozygote Mutation zusammen mit einer *Nonsense*-Mutation vor. In der betroffenen Familie fiel in der Schwangerschaft ein Oligohydramnion auf. Bei dem Feten wurden sonographisch eine zystische Nierendysplasie und eine okzipitale Enzephalozele diagnostiziert. Auffälligkeiten der Extremitäten wurden nicht berichtet. Über eine Beteiligung der Leber lagen keine Informationen vor. Die Autoren stuften die Mutation als „krankheitsverursachend“ für das Meckel-Gruber-Syndrom ein (Consugar et al., 2007).

Ein zweites Mal wurde die Mutation 2010 von Iannicelli et al. beschrieben. Bei der dort betroffenen Patientin lag die Mutation homozygot vor. Das unterscheidet sie von der von Consugar beschriebenen Variante und der Mutation unserer Patientin, die beide als compound-heterozygote Mutationen zusammen mit jeweils einer *Nonsense*-Mutation auftraten. Ianicelli et al. beschrieben bei ihrer Patientin eine Dandy-Walker-Malformation. Dabei handelt es sich um eine Kleinhirnhypoplasie in Verbindung mit einer zystischen Erweiterung des vierten Ventrikels. Zusätzlich lag als Fehlbildung des zentralen Nervensystems eine Enzephalomeningozele vor. Des Weiteren litt das Mädchen an einer Gallengangproliferation und einem vaginalen Septum. Zu Veränderungen an den Augen lagen keine Informationen vor (Iannicelli et al., 2010). Damit unterscheidet sich das klinische Bild der Patienten aus der Literatur von dem unserer Patientin. Diese hat eine Vermisagenesie, sowie eine Balkenhypoplasie. Zudem stehen eine Ataxie, eine beginnende Leberzirrhose und eine Beteiligung der Augen in Form eines Iriskoloboms im Mittelpunkt des klinischen Bildes (s. hierzu Abschnitt 3.3.4, Beschreibung des Phänotyps von Patient 22).

c.1073C>T, p.P358L

Diese *Missense*-Mutation in Exon 11 des *TMEM67*-Gens detektierten wir bei Patient 2 in compound-heterozygoter Form mit der Mutation c.2498T>C (p.I833T). Sie führt zu einem Austausch von Prolin zu Leucin. Prolin ist die einzige heterozyklische Aminosäure. Sie besitzt im Gegensatz zu den übrigen Aminosäuren keine freie Aminogruppe und ist in der Lage in Proteinen α-Helices und β-Faltblätter zu unterbrechen. Sie hat also erheblichen Einfluss auf die gesamte Proteinstruktur, sodass ein Austausch dieser Aminosäure mit hoher Wahrscheinlichkeit zu veränderten Proteineigenschaften führt. Zusätzlich bewirkt auch diese Mutation eine Veränderung der Spleißstellen.

In einer großen Studie von Doherty et al., die 2010 veröffentlicht wurde, konnte diese Mutation ebenfalls bei drei betroffenen Mitgliedern einer Familie nachgewiesen werden. In dieser Familie trat die Mutation zusammen mit einer zweiten *Missense*-Mutation auf und wurde damit als Ursache der Erkrankung angesehen. In der Studie wurden 251 Familien mit JSRDs und 26 Patienten aus 23 Familien mit Kriterien eines COACH-Syndroms auf Mutationen im *MKS3*-, *CC2D2A*-, *RPGRIP1L*- und *CEP290*-Gen untersucht. Bei den Kindern mit der oben genannten Mutation handelte es sich um ein Mädchen sowie zwei Jungen. Alle drei Patienten waren im frühen Kindesalter verstorben. Sie hatten eine Entwicklungsstörung, eine muskuläre Hypotonie, eine Ataxie, Augenbewegungsstörungen, sowie eine zystische Nierenerkrankung. Zwei der Kinder waren dysmorph, wobei Einzelheiten nicht näher beschrieben wurden. Bei dem Mädchen wurde ein MTS diagnostiziert, bei einem der Jungen eine Hypoplasie des Kleinhirnwurms. Zusätzlich hatte das Mädchen ein chorioretinales Kolobom. Zwei der Kinder wurden autopsiert, wobei bei dem Mädchen eine Hepatosplenomegalie und eine nicht näher bezeichnete Veränderung des Gallengangs beschrieben worden waren (Doherty et al., 2009).

Die klinischen Zeichen der Patienten überschneiden sich mit denen unserer Patientin, bei der die Mutation ebenfalls als compound-heterozygote Mutation zusammen mit einer *Missense*-Mutation vorliegt. Auch bei ihr wurde ein MTS diagnostiziert, das Mädchen leidet an einer Ataxie, hat ebenfalls ein Kolobom sowie faziale Auffälligkeiten. Im Gegensatz zu den von Doherty et al. beschriebenen Patienten ist unsere Patientin aber bereits 10 Jahre alt geworden. Auch konnten bei ihr bisher noch keine Veränderungen der Nieren und der Leber gefunden werden. (s. Abschnitt 3.3.4, Patient 2).

Ein zweites Mal wurde die Mutation 2010 von Iannicelli et al. gefunden. Beschrieben wurden zwei Kinder einer Familie mit MTS und erhöhten Leberenzymen. Eines der Kinder hatte zusätzlich ein chorioretinales Kolobom, das andere eine Hypoplasie des N. Opticus. Veränderungen der Nieren lagen bei beiden Kindern nicht vor. Auch in dieser Familie liegt die Mutation als compound-heterozygote Mutation mit einer weiteren *Missense*-Mutation

vor. Die Autoren schätzen diese Mutation als „vermutlich krankheitsverursachend“ ein (Iannicelli et al., 2010).

c.1115C>A, p.T372K

Bei den Patienten 8 und 23 konnte eine homozygote Mutation in Exon 11 an Position 1115 der cDNA nachgewiesen werden. Dieser Austausch von Cytosin zu Adenin führt auf Proteinebene zu einem Ersatz der hydrophilen Aminosäure Threonin durch die basische Aminosäure Lysin. Die beiden Aminosäuren unterscheiden sich damit sehr in ihrem Aufbau und ihren Eigenschaften, sodass es unwahrscheinlich ist, dass ein Austausch nicht zu einer veränderten bzw. gestörten Proteinfunktion führt. Des Weiteren hat auch diese Mutation Einfluss auf den Spleißvorgang der DNA.

In der Literatur wurde diese Mutation bereits in mehreren Arbeiten beschrieben, wobei sie bei den Patienten dort, im Gegensatz zu unseren Patienten, als compound-heterozygote Mutation vorliegt. Erstmals wurde die Mutation 2008 von Brancati et al. erwähnt. Dort konnte die Mutation bei zwei Kindern einer italienischen Familie nachgewiesen werden. Bei den Kindern handelte es sich um einen damals sechsjährigen und einen zwei Jahre alten Jungen. Bei beiden konnte ein MTS gefunden werden, es lagen eine Entwicklungsverzögerung, eine muskuläre Hypotonie, Augenbewegungsstörungen und Kolobome vor. Desweitern wurden bei dem sechsjährigen Jungen eine Atemregulationsstörung, eine Dilatation des Gallengangs und eine Hepatomegalie beschrieben. Der zweijährige Junge hatte zusätzlich einen Nystagmus und erhöhte Leberenzyme (Brancati et al., 2008).

Auch Doherty et al. beschrieben diese Mutation 2009 bei einem 10-jährigen Mädchen mit MTS, Atemregulationsstörungen und einer Hepatosplenomegalie. Eine Leberbiopsie ergab bei dem Mädchen Veränderungen des Gallengangs, eine Malformation der Duktalplatte und eine kongenitale Leberfibrose. Auch eine Beteiligung der Nieren in Form einer Nephronophthise wurde diagnostiziert (Doherty et al., 2009).

Als drittes veröffentlichten Iannicelli et al. 2010 die Mutation und schätzten diese als „möglicherweise krankheitsverursachend“ ein. Sie wiesen die Mutation bei einem Mädchen einer italienischen Familie nach. Bei ihr wurden ebenfalls ein MTS und Kolobome sowie eine Hepatosplenomegalie und erhöhte Leberenzyme beschrieben. Außerdem lag eine Nierenbeteiligung in Form von Zysten und einer chronischen renalen Insuffizienz vor (Iannicelli et al., 2010).

Vergleicht man die in der Literatur beschriebene klinische Ausprägung mit der unserer Patienten, so lassen sich viele Übereinstimmungen finden. Neben dem typischen MTS haben auch unsere beiden Patienten Atemregulationsstörungen, sind in ihrer Entwicklung verzögert und haben eine Leberbeteiligung, die sich bei beiden durch erhöhte Leberenzyme

zeigt. Dabei konnte bei Patient 8 bereits eine Leberfibrose nachgewiesen werden. Bei Patient 23 bestand zum Zeitpunkt der letzten Untersuchung lediglich eine Hepatomegalie, strukturelle Veränderungen der Leber wurden noch nicht beschrieben. Es fällt zudem auf, dass auch bei unserem Patienten 23 ein Kolobom gefunden wurde, vergleichbar mit den Angaben von Brancati und Iannicelli. Bei Patientin 8 selbst ist zwar kein Kolobom diagnostiziert worden, dafür aber bei einer ebenfalls betroffenen Cousine des Mädchens.

c.1321C>T, p.R441C

In Exon 13 konnten wir in der Probe von Patient 6 diese heterozygote *Missense*-Mutation nachweisen. An Position 1321 der cDNA-Sequenz ist Cytosin durch Thymin ausgetauscht. Diese Mutation betrifft, wie auch die zuvor genannten, die Spleißstellen der DNA und führt daher zu Störungen der Proteinfunktion. Außerdem resultiert aus der Änderung der Einbau der neutralen Aminosäure Cystein an der Position 441 der Polypeptidkette anstatt der basischen Aminosäure Arginin. Es handelt sich damit also wiederum um zwei in ihrem Aufbau und ihren Eigenschaften unterschiedliche Aminosäuren, sodass es wahrscheinlich ist, dass die Mutation auf Proteinebene zu Funktionsstörungen führt. Auch die Internet-Software „*Mutation Taster*“ beschreibt diese Veränderung als krankheitsverursachend und gibt dafür eine Wahrscheinlichkeit von 99% an.

Beschrieben wurde diese Mutation vorher erst einmal. Doherty et al. konnten sie 2009 bei einem neunjährigen Jungen mit MTS, Kolobomen, erhöhten Leberenzymen und einer Hepatosplenomegalie nachweisen. Eine Leberbiopsie, die bei dem Kind durchgeführt wurde, ergab Gallengangsveränderungen und eine kongenitale Leberfibrose. Außerdem hat der Jungen einen Hypogonadismus. Auch bei diesem Patienten liegt die Mutation als compound-heterozygote Mutation zusammen mit einer weiteren Missense-Mutation vor (Doherty et al., 2009).

Bei uns wurde als zweite Mutation die *Missense*-Mutation c.226A>G (p.T76A) gefunden, die in der cysteinreichen Region des Proteins lokalisiert ist und bereits beschrieben wurde. Bei unserem Patienten handelt es sich ebenfalls um einen Jungen, bei dem neben den typischen Symptomen des Joubert-Syndroms eine Hepatosplenomegalie diagnotiziert wurde.

c.2498T>C, p.I833T

Die letzte Mutation, die wir im *TMEM67*-Gen nachweisen konnten, betrifft Exon 24 der Patienten 2 und 22. Sie liegt bei beiden Patienten als compound-heterozygote Mutation vor. Bei Patient 2 ist sie mit der Mutation c.1073C>T (p.P358L) kombiniert, bei Patient 22 mit der Mutation c.579delA (p.G195DfsX27). An Position 2498 der cDNA-Sequenz liegt

bei den beiden Patienten die Base Cytosin statt der Base Thymin vor (c.2498T>C). Daraus resultiert auf Proteinebene ein Einbau der hydrophilen Aminosäure Threonin statt der hydrophoben Aminosäure Isoleucin an der Position 833 der Polypeptidkette. Es wurden also zwei Aminosäuren mit sehr unterschiedlichen Eigenschaften ausgetauscht, wodurch eine Störung der Proteinfunktion wahrscheinlich ist. Auch hier betrifft die Mutation zusätzlich die Spleißstellen und beeinträchtigt so die Bildung funktionsfähiger Proteine. Der „*Mutation Taster*“ geht mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% davon aus, dass diese Mutation Auslöser einer Krankheit ist.

Auch diese Mutation wurde bereits ebenfalls als compound-heterozygote Mutation in Kombination mit verschiedenen anderen Mutationen in Studien gefunden. Zuerst konnten Brancati al. sie 2008 in einer Familie aus Kroatien und einer weiteren Familie aus Belgien nachweisen. Bei dem kroatischen Kind handelt es sich um ein 1998 geborenes Mädchen, das zuletzt im Alter von neun Jahren untersucht wurde. Neben den typischen Zeichen eines Joubert-Syndroms, wie einem MTS, einer Atemregulationsstörung, einer muskulären Hypotonie, einer mentalen Retardierung, einer Ataxie, Augenbewegungsstörungen und einem Nystagmus, wurde bei dem Mädchen auch eine Beteiligung der Leber mit erhöhten Leberenzymen, einer Hepatomegalie und einer kongenitalen Leberfibrose diagnostiziert. Auch eine Erkrankung der Niere in Form einer Nephronophthise und einer chronischen Niereninsuffizienz konnte gefunden werden. Zusätzlich hatte das Mädchen als Fehlbildung des ZNS eine Enzephalozele. In der Familie aus Belgien waren zwei Mitglieder betroffen. Eine 1971 geborene Frau, zuletzt mit 32 Jahren untersucht und ein bereits verstorbener 1974 geborener Mann, der im Alter von 29 Jahren das letzte Mal untersucht worden war. Beide hatten eine Kleinhirnwurmaplasie, eine muskuläre Hypotonie, eine Ataxie und eine mentale Retardierung. Die Frau hat zusätzlich einen Nystagmus und ein Kolobom der Retina und eine Leberbeteiligung, die sich durch erhöhte Leberenzyme, eine kongenitale Leberfibrose und eine Hepatomegalie äußert. Auch der Mann hatte eine Beteiligung der Leber ebenfalls im Sinne einer kongenitalen Leberfibrose und einer Hepatomegalie und ösophagealen Varizen. Auch bei den Patienten der belgischen Familie trat eine Nephronophthise und eine Niereninsuffizienz auf (Brancati et al., 2008).

Ein Jahr später beschrieben auch Doherty et al. Patienten aus drei Familien mit derselben Mutation. Einen 21-jährigen Jungen, bei dem neben den typischen Symptomen ein Kolobom vorliegt und bei dem mit 12 Jahren eine portale Hypertension und eine progressive Leberfibrose diagnostiziert wurde, und ein 14-, sowie ein vierjähriges Mädchen mit denselben Symptomen (Doherty et al., 2009).

Iannicelli et al. detektierten die Mutation bei einem ebenfalls vier Jahre alten Mädchen aus Deutschland. Auch bei ihr wurden ein MTS, ein Kolobom und eine kongenitale Leberfibrose beschrieben. Die Mutation wurde in dieser Veröffentlichung als „möglicherweise krankheitsauslösend“ beschrieben (Iannicelli et al., 2010).

Bei unserem Patient 2 liegt die Mutation zusammen mit der *Missense*-Mutation c.1073C>T, bei Patient 22 mit der *Frameshift*-Mutation c.579delA vor. Im Vergleich mit den Patienten aus der Literatur fällt auf, dass auch unsere Patienten neben den typischen Symptomen eines Joubert-Syndroms Kolobome haben. Auch hat Patient 22 sowie die eben beschriebenen Patienten eine Leberfibrose, die bereits mit 3,5 Jahren diagnostiziert wurde.

4.3.3. Genotyp-Phänotyp-Korrelation bei Patienten mit Mutationen im *TMEM67*-Gen

Vergleicht man die klinischen Daten der fünf Patienten, bei denen wir Mutationen im *TMEM67*-Gen nachweisen konnten, so fällt auf, dass bei vier von ihnen (bzw. Patient 2, 22, 23 und der Cousine von Patient 8) eine Beteiligung der Augen in Form eines Koloboms vorliegt. Es ist bekannt, dass Kolobome beim Joubert-Syndrom Typ 6 gehäuft auftreten. Dieses ist auch bei unserem Patientenkollektiv sowie bei den Patienten mit den gleichen Mutationen aus der Literatur zu beobachten. Des Weiteren zeigen drei unserer fünf JBTS6-Patienten die typische Symptomkonstellation eines COACH-Syndroms. Wie bei allen unseren Patienten konnte auch bei den Patienten 8, 22 und 23 ein MTS nachgewiesen werden. Zusätzlich zeigen sie eine allgemeine Entwicklungsverzögerung, die bei den beiden älteren Kindern 22 und 23 im Bereich einer mentalen Retardierung liegt. Auch die weiteren Symptome des COACH-Syndroms, nämlich eine ataktische Bewegungsstörung sowie die oben beschriebenen Kolobome der Augen liegen bei den drei Kindern vor. Das letzte Merkmal des COACH-Syndroms ist die Leberfibrose. Auch diese wurde bei den Patienten 8, 22 und 23 bereits im Kindesalter diagnostiziert und ging mit einer typischen Erhöhung der Leberenzyme einher.

4.3.4. Polymorphismen im *TMEM67*-Gen

Zusätzlich zu den sechs verschiedenen Mutationen, die wir im *TMEM67*-Gen nachweisen konnten, fanden wir vier Veränderungen der cDNA-Sequenz, die wir als Polymorphismus einordneten. Diese sollen im nächsten Abschnitt genauer betrachtet werden.

c.781G>A, p.D261N

Diese Veränderung in Exon 8 fanden wir bei Patient 2. Hierbei handelt es sich um einen bekannten Polymorphismus mit der Nummer rs35793208. Bei unserem Patienten liegt er in heterozygoter Form vor, eine homozygote Variante fanden wir bei keinem Patienten. In der Datenbank des NCBI wird die Häufigkeit des Wildtypes G/G mit 97,4% angegeben, die heterozygote Variante kommt in der Bevölkerung danach mit einer Häufigkeit von 2,6% vor (`http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_gf.cgi?pg=2&RSPick=1&tax_id=9606&RSlist=35793208`, letzter Zugriff: 23.05.11). Wir fanden die Veränderung bei einem von 19 Patienten. Das entspricht einer Häufigkeit von ca. 5%, die somit in der zu erwartenden Größenordnung liegt.

c.1066-3C>T

Diese Veränderung ist am Ende von Intron 10 in der Nähe der Spleißregion zu Exon 11 lokalisiert. Sie befindet sich damit in einem nicht kodierenden Abschnitt und hat somit vermutlich keine Auswirkungen auf Proteinebene. Allerdings wäre es möglich, dass eine solche Veränderung negative Folgen für den Spleißvorgang und damit indirekt für die Funktionsfähigkeit des Proteins haben könnte. Da wir diese Veränderung aber bei 14 von 20 Patienten gefunden haben, gehen wir davon aus, dass es sich um einen folgenlosen Polymorphismus handelt. Auch diese Veränderung ist in der Datenbank des NCBI unter der Nummer rs3097427 zu finden. Dort wird für die homozygote Wildtypvariante C/C eine Häufigkeit von 43,3%, für den heterozygoten Polymorphismus C/T eine Häufigkeit von 40% und für den homozygoten Polymorphismus T/T eine Häufigkeit von 16,7% angegeben (`http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_gf.cgi?pg=2&RSPick=1&tax_id=9606&RSlist=3097309`, letzter Zugriff 23.05.2011; Häufigkeitsangaben beziehen sich auf den Gegenstrang).

In unserer Kohorte lag bei fünf von 19 Patienten (ca. 26%) die Variante C/C, bei sieben von 19 Patienten (ca. 37%) die Variante C/T und bei sieben weiteren (ca. 37%) die Variante T/T vor. Damit deckt sich unsere Häufigkeit des heterozygoten Polymorphismus in etwa mit der in der Datenbank, wobei in unserem Patientenkollektiv häufiger die Variante T/T und seltener der eigentliche Wildtyp C/C vorliegt. Eine Ursache für diesen Unterschied könnte sein, dass sich die Häufigkeiten aus der Datenbank auf eine Population aus Utah mit nord- und westeuropäischen Vorfahren beziehen, wohingegen unsere Patienten ausschließlich aus Deutschland und der Türkei stammen.

c.1810A>G, p.I604V

Einen weiteren Polymorphismus fanden wir in Exon 18. Dieser ist in der Datenbank des National Center for Biotechnology Information unter der Nummer rs3134031 beschrieben. Auch diesen Polymorphismus konnten wir sowohl in einer heterozygoten als auch in einer homozygoten Variante nachweisen. In der Datenbank des NCBI sind umfangreiche Häufigkeitsangaben in verschiedenen Populationen für diesen Polymorphismus angegeben. Aus der Summe der verschiedenen Angaben ergibt sich für die Variante A/A eine Häufigkeit von 9,57%, für A/G eine Häufigkeit von 39,18% und für G/G eine Häufigkeit von 51,25% (`http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/snp_gf.cgi?pg=2&RSPick=1&tax_id=9606&RSlist=3134031`, letzter Zugriff 18.09.11).

Bei uns lag bei fünf von 19 Patienten (26%) homozygot A/A vor, bei sieben von 19 (ca.37%) A/G und bei weiteren sieben (37%) homozygot G/G. Unterschiede in den Häufigkeiten lassen sich auch hier wieder durch unsere im Vergleich kleine Fallzahl und die unterschiedlichen Populationen erklären. So handelt es sich bei unseren Patienten ausschließlich um Patienten deutscher oder türkischer Herkunft, während sich die Häufigkeitsangaben aus der Datenbank aus Zahlen von europäischen, asiatischen und afrikanischen Populationen zusammensetzen.

c.2397T>C

Den letzten Polymorphismus konnten wir in Exon 23 bei Patient 1 nachweisen. In Position 2397 der Nukleotidsequenz liegt bei diesem ein heterozygoter Ersatz von Thymin durch Cytosin vor. Bei dieser Veränderung handelt es sich um eine stille Mutation, es kommt also auf Proteinebene zu keiner Veränderung der Reihenfolge der Aminosäuren. Damit ist ein Funktionsverlust des Proteins nicht zu erwarten und die Veränderung besitzt keinerlei Krankheitsrelevanz. In der Datenbank ist dieser Polymorphismus nicht zu finden.

4.4. Diagnostisches Vorgehen beim Verdacht auf ein Joubert-Syndrom

Wie unsere Ergebnisse gezeigt haben, gibt es einen Zusammenhang zwischen dem mutierten Gen und dem daraus resultierendem Phänotyp. Da das Joubert-Syndrom aber ein sehr heterogenes Krankheitsbild mit einer breiten Variabilität des Phänotyps und einer großen Anzahl an potentiell verursachenden Genen ist, lässt sich kein sicherer Rückschluss vom Phänotyp eines Patienten auf das ursächliche Gen ziehen.

Für die Diagnostik bei einem Patienten mit der Verdachtsdiagnose eines Joubert-Syndroms empfiehlt sich daher ein stufenweises Vorgehen. Zuerst sollte bei jedem Patienten ein MRT des Gehirns im Hinblick auf das Vorliegen eines MTS erfolgen. Kann in der Familienanamnese eine Blutsverwandtschaft der Eltern erhoben werden, so wäre der erste diagnostische Schritt eine SNP-Array-Untersuchung. Diese zeigt für welche chromosomalen Genorte das Kind homozygot ist. Daran anschließend kann dann die gezielte Sequenzierung des betroffenen Gens erfolgen. Ein zusätzlicher Vorteil dieses Untersuchungsschrittes ist, dass auf diese Weise neue Genorte nachgewiesen werden könnten. So wäre es möglich, die derzeitige Detektionsrate für Mutationen bei Joubert-Patienten von ca. 50% zu erhöhen.

Liegt keine Blutsverwandtschaft der Eltern vor, so sollte durch die klinische Symptomatik eine Priorisierung der in Frage kommenden genetischen Subtypen erfolgen. Wie auch unsere Ergebnisse gezeigt haben, ist es bei einer Leberbeteiligung und/oder Kolobomen bzw. bei Vorliegen der Symptome eines COACH-Syndroms am sinnvollsten, zuerst das *TMEM67*-Gen zu sequenzieren. Zeigt sich bei dem Kind dagegen eine Beteiligung der Nieren und der Augen, so wäre die Wahrscheinlichkeit einer Mutation im *CEP290*-Gen am höchsten. Anders sieht es aus, wenn eine isolierte Nierenbeteiligung vorliegt. Studien konnten zeigen, dass hierbei am häufigsten Mutationen im *RPGRIP1L*-Gen (JBTS 7), bei einer alleinigen Retinabeteiligung dagegen im *AHI1*- oder ggf. auch im *CEP290*-Gen vorliegen. Abbildung 4.5 gibt einen Überblick über diese gezielte Stufendiagnostik.

Da die genetische Abklärung beim Joubert-Syndrom eine Vielzahl verschiedener Gene umfasst, die zum Teil aus einer großen Anzahl von Exons bestehen, kommt die Diagnostik mittels der Didesoxynukleotidmethode nach Sanger so wie sie in dieser Arbeit durchgeführt wurde, sowohl den Arbeitsaufwand betreffend, als auch aus wirtschaftlichen Gesichtspunkten an ihre Grenzen. Mittlerweile ist es aber möglich, nach einem neuen Verfahren, dem sogenannten „*Next-Generation-Sequencing*“, alle Joubert-Gene in einem Ansatz zu sequenzieren. Dieses ist ein modernes Verfahren, das einen hohen Sequenzierungsdurchsatz ermöglicht, indem gleichzeitig Tausende bis Millionen verschiedene DNA-Fragmente parallel sequenziert werden können. Diese modernen Sequenzierverfahren werden in Zukunft die molekulargenetische Diagnostik beim Joubert-Syndrom so wie bei vielen anderen heterogenen genetischen Krankheitsbildern deutlich vereinfachen.

4.4.1. Erklärungsansätze für Patienten, bei denen keine Mutation gefunden werden konnte

In der vorliegenden Arbeit konnte die Ursache des Joubert-Syndroms bei 17 von 25 Patienten nicht geklärt werden. Dazu können verschiedene Faktoren beigetragen haben. Wie

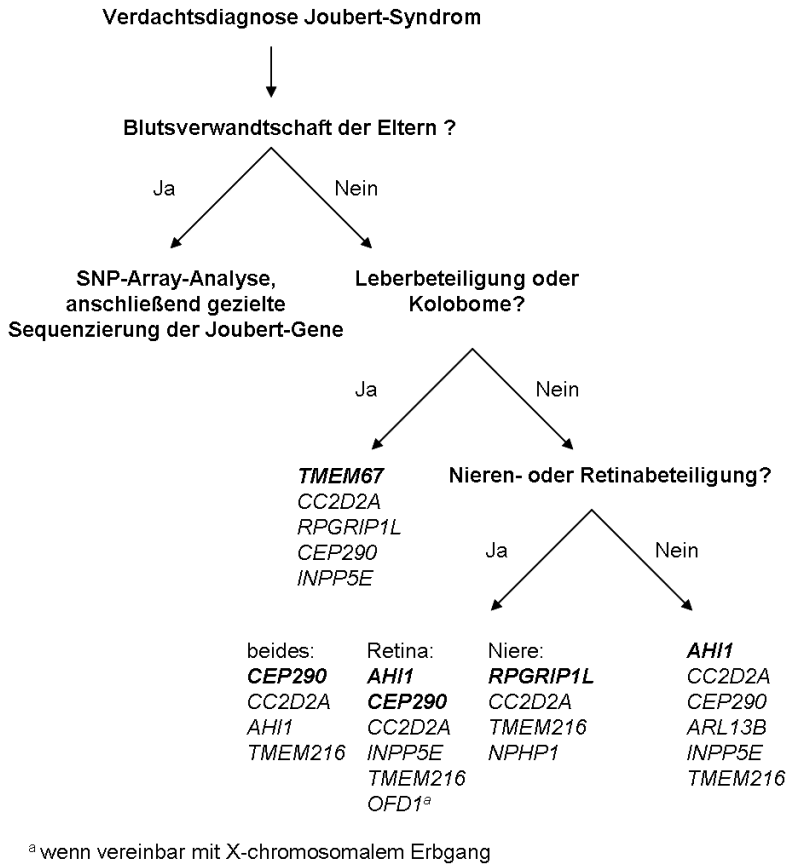


Abbildung 4.5. Vorschlag für eine gezielte Stufendiagnostik (Hellenbroich et al., 2010)

oben bereits beschrieben, haben wir in dieser Arbeit nicht alle bekannten, mit dem Joubert-Syndrom assoziierten Gene sequenziert. Die DNA-Proben wurden neben der Suche nach homozygoten Deletionen im *NPHP1*-Gen (Detektionsrate ca. 1%) lediglich auf Mutationen im AHI1-Gen (Detektionsrate ca. 10%; Sequenzanalyse im Vorfeld dieser Arbeit), im CEP290-Gen (Detektionsrate ebenfalls ca. 10%) und TMEM67-Gen (Detektionsrate ca. 8%) analysiert. Damit haben wir zwar die drei Gene mit den höchsten Detektionsraten abgedeckt, es fehlen aber die elf weiteren bereits bekannten Joubert-Gene, die seltenere Typen des Syndroms auslösen. Es besteht daher eine hohe Wahrscheinlichkeit, dass die Ursache der Erkrankung bei einigen unserer Patienten durch eine Sequenzierung der anderen Gene gefunden werden könnte.

Ebenfalls wurde bereits erwähnt, dass Mutationen in den bekannten 15 Genen nur bei der Hälfte der Joubert-Patienten zu finden sind. Es ist damit zu rechnen, dass in den nächsten Jahren weitere, mit dem Joubert-Syndrom assoziierte, Gene veröffentlicht werden. In diesem Fall sollte die DNA unserer Patienten gegebenenfalls weiter analysiert werden.

Des Weiteren besteht die Möglichkeit, dass Mutationen in Bereichen lokalisiert sein könnten, die von uns nicht sequenziert wurden. Dazu gehören beispielsweise die Intron-Regionen. So sind intronische Sequenzen zwar nicht direkt proteinkodierend, sie können allerdings einen regulativen Einfluss auf die Proteinexpression und das Spleißen haben. So ist es durchaus möglich, dass auch Mutationen im Bereich der Introns durch Veränderung der Spleißstellen und der Genregulation relevante Folgen haben könnten.

Zuletzt lässt sich die Frage stellen, ob überhaupt bei allen unseren Patienten mit Sicherheit ein Joubert-Syndrom vorliegt. Zu vielen Patienten haben wir nur ungenügende klinische Daten, sodass wir uns bei der Diagnosestellung auf den Verdacht anderer verlassen mussten. Da das phänotypische Spektrum der Joubert-Patienten sehr weit ist, wäre es auch möglich, dass einige der Patienten eigentlich an einer anderen, möglicherweise verwandten Erkrankung leiden und die Ursache daher in einem ganz anderen Gen zu suchen ist.

5. Zusammenfassung

Das Joubert-Syndrom ist eine in den meisten Fällen autsomal-rezessiv vererbbare Störung der Kleinhirnbildung. Diese zeigt sich im MRT als so genanntes *Molar Tooth Sign* (MTS), das durch durch eine Vermishypoplasie oder -agenesie in Zusammenhang mit einer vertieften Fossa interpeduncularis und verlängerten und verbreiterten Kleinhirnstielen zustande kommt. Des Weiteren zeigen die Patienten eine zerebelläre Ataxie und im Verlauf eine mentale Retardierung. In der Neugeborenenperiode fallen die Kinder häufig durch eine muskuläre Hypotonie, sowie Atemregulationsstörungen auf. Zusätzlich können weitere Fehlbildungen vor allem der Leber, der Nieren und der Augen beobachtet werden. Das Syndrom wurde erstmals 1969 von der Neuropädiaterin Marie Joubert beschrieben. Heute geht man von einer Häufigkeit der Erkrankung von ca. 1:100.000 aus. Es sind mittlerweile 15 Gene nachgewiesen worden, die im Zusammenhang mit dem Joubert-Syndrom stehen (JBTS1-15).

In der vorliegenden Arbeit wurde die DNA von 25 Patienten mir der klinischen Diagnose eines Joubert-Syndroms auf Veränderungen in drei Joubert-Genen *NPHP1* (JBTS4), *CEP290* (JBTS5) und *TMEM67* (JBTS6) untersucht. Dazu wurde eine Multiplex-PCR der Exons 1, 5, 10, 15 und 20 des *NPHP1*-Gens durchgeführt, um homozygote Deletionen dieses Gens nachzuweisen. Zusätzlich wurden alle kodierenden Exons des *CEP290*- und *TMEM67*-Gens mittels PCR amplifiziert und anschließend sequenziert. Die so ermittelten Sequenzen konnten dann mit Referenzsequenzen verglichen werden. Auffälligkeiten wurden beschrieben und in der Literatur wurde nach Vorbeschreibungen gesucht.

Zusammenfassend konnten wir keine homozygoten Deletionen im *NPHP1*-Gen nachweisen. Im *CEP290*-Gen fanden wir bei fünf unserer Patienten Mutationen. Zwei Patienten wiesen dabei dieselbe homozygote Mutation (c.5668G>T, p.G1890*) auf. Bei einem anderen Patienten lagen zwei compound-heterozygote Mutationen vor (c.1665_1666delAA, p.555fs*19 und c.5932C>T, p.R1978*), von denen die erste Mutation in der Literatur bisher nicht beschrieben wurde. Zwei weitere Patienten zeigten jeweils eine einzelne heterozygote Mutation (c.1669C>T, p.R557C bzw. c.1908A>T, p.K636N), sodass bei ihnen die Ursache der Erkrankung nicht sicher nachgewiesen werden konnte. Auch bei diesen beiden Veränderungen handelt es sich um neu entdeckte Mutationen. Zusätzlich zu den Mutationen konnten wir drei bekannte Polymorphismen im *CEP290*-Gen detektieren.

Im *TMEM67*-Gen fanden wir bei 5 Patienten krankheitsverursachende Mutationen. Auch hier konnten wir bei zwei Patienten dieselbe homozygote Mutation (c.1115C>A, p.T372K) nachweisen. Drei weitere Patienten zeigten jeweils zwei compound-heterozygote Mutationen (c.1073C>T, p.P358L und c.2498T>C, p.I833T), (c.226A>G, p.T76A und c.1321C>T, p.R441C) und (c.579delA, p.G195Dfs*27 und c.2498T>C, p.I833T), wobei die Mutation c.226A>G, p.T76A nicht vorbeschrieben war. Neben den gefunden Mutationen, konnten wir vier verschiedene Polymorphismen nachweisen, von denen ebenfalls einer (c.2397T>C) noch nicht in der Literatur beschrieben worden war.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass unterschiedliche Mutationen im *CEP290*- und *TMEM67*-Gen zu den häufigsten Ursachen der Erkrankung bei Joubert-Patienten zählen.

6. Literaturverzeichnis

6.1. Zeitschriftenverzeichnis

Aicardi, J.; Castello-Branco, M. E., and Roy, C. Joubert's syndrome. Apropos of 5 cases. *Arch Fr Pediatr*, 40(8):625–9, 1983.

Andermann, F.; Andermann, E.; Ptito, A.; Fontaine, S., and Joubert, M. History of Joubert syndrome and a 30-year follow-up of the original proband. *J Child Neurol*, 14(9):565–9, 1999.

Arts, H. H.; Doherty, D.; van Beersum, S. E.; Parisi, M. A.; Letteboer, S. J.; Gorden, N. T.; Peters, T. A.; Marker, T.; Voesenek, K.; Kartono, A.; Ozyurek, H.; Farin, F. M.; Kroes, H. Y.; Wolfrum, U.; Brunner, H. G.; Cremers, F. P.; Glass, I. A.; Knoers, N. V., and Roepman, R. Mutations in the gene encoding the basal body protein RPGRIP1L, a nephrocystin-4 interactor, cause Joubert syndrome. *Nat Genet*, 39(7):882–8, 2007.

Baala, L.; Romano, S.; Khaddour, R.; Saunier, S.; Smith, U. M.; Audollent, S.; Ozilou, C.; Faivre, L.; Laurent, N.; Foliguet, B.; Munnich, A.; Lyonnet, S.; Salomon, R.; Encha-Razavi, F.; Gubler, M. C.; Boddaert, N.; de Lonlay, P.; Johnson, C. A.; Vekemans, M.; Antignac, C., and Attie-Bitach, T. The Meckel-Gruber syndrome gene, MKS3, is mutated in Joubert syndrome. *Am J Hum Genet*, 80(1):186–94, 2007.

Benzing, T.; Gerke, P.; Hopker, K.; Hildebrandt, F.; Kim, E., and Walz, G. Nephrocystin interacts with Pyk2, p130(Cas), and tensin and triggers phosphorylation of Pyk2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98(17):9784–9, 2001.

Bielas, S. L.; Silhavy, J. L.; Brancati, F.; Kisseleva, M. V.; Al-Gazali, L.; Sztriha, L.; Bayoumi, R. A.; Zaki, M. S.; Abdel-Aleem, A.; Rosti, R. O.; Kayserili, H.; Swistun, D.; Scott, L. C.; Bertini, E.; Boltshauser, E.; Fazzi, E.; Travaglini, L.; Field, S. J.; Gayral, S.; Jacoby, M.; Schurmans, S.; Dallapiccola, B.; Majerus, P. W.; Valente, E. M., and Gleeson, J. G. Mutations in INPP5E, encoding inositol polyphosphate-5-phosphatase E, link phosphatidyl inositol signaling to the ciliopathies. *Nat Genet*, 41(9):1032–6, 2009.

Boltshauser, E. and Isler, W. Joubert syndrome: episodic hyperpnea, abnormal eye movements, retardation and ataxia, associated with dysplasia of the cerebellar vermis. *Neuropadiatrie*, 8(1):57–66, 1977.

Brancati, F.; Barrano, G.; Silhavy, J. L.; Marsh, S. E.; Travaglini, L.; Bielas, S. L.; Amorini, M.; Zablocka, D.; Kayserili, H.; Al-Gazali, L.; Bertini, E.; Boltshauser, E.; D'Hooghe, M.; Fazzi, E.; Fenerci, E. Y.; Hennekam, R. C.; Kiss, A.; Lees, M. M.; Marco, E.; Phadke, S. R.; Rigoli, L.; Romano, S.; Salpietro, C. D.; Sherr, E. H.; Signorini, S.; Stromme, P.; Stuart, B.; Sztriha, L.; Viskochil, D. H.; Yuksel, A.; Dallapiccola, B.; Valente, E. M., and Gleeson, J. G. CEP290 mutations are frequently identified in the oculo-renal form of Joubert syndrome-related disorders. *Am J Hum Genet*, 81(1):104–13, 2007.

Brancati, F.; Travaglini, L.; Zablocka, D.; Boltshauser, E.; Accorsi, P.; Montagna, G.; Silhavy, J. L.; Barrano, G.; Bertini, E.; Emma, F.; Rigoli, L.; Dallapiccola, B.; Gleeson, J. G., and Valente, E. M. RPGRIP1L mutations are mainly associated with the cerebello-renal phenotype of Joubert syndrome-related disorders. *Clin Genet*, 74(2):164–70, 2008.

Brancati, F.; Iannicelli, M.; Travaglini, L.; Mazzotta, A.; Bertini, E.; Boltshauser, E.; D'Arrigo, S.; Emma, F.; Fazzi, E.; Gallizzi, R.; Gentile, M.; Loncarevic, D.; Mejaski-Bosnjak, V.; Pantaleoni, C.; Rigoli, L.; Salpietro, C. D.; Signorini, S.; Stringini, G. R.; Verloes, A.; Zabloka, D.; Dallapiccola, B.; Gleeson, J. G., and Valente, E. M. MKS3/TMEM67 mutations are a major cause of COACH Syndrome, a Joubert Syndrome related disorder with liver involvement. *Hum Mutat*, 30(2):E432–42, 2009.

Cantagrel, V.; Silhavy, J. L.; Bielas, S. L.; Swistun, D.; Marsh, S. E.; Bertrand, J. Y.; Audollent, S.; Attie-Bitach, T.; Holden, K. R.; Dobyns, W. B.; Traver, D.; Al-Gazali, L.; Ali, B. R.; Lindner, T. H.; Caspary, T.; Otto, E. A.; Hildebrandt, F.; Glass, I. A.; Logan, C. V.; Johnson, C. A.; Bennett, C.; Brancati, F.; Valente, E. M.; Woods, C. G., and Gleeson, J. G. Mutations in the cilia gene ARL13B lead to the classical form of Joubert syndrome. *Am J Hum Genet*, 83(2):170–9, 2008.

Coene, K. L.; Roepman, R.; Doherty, D.; Afroze, B.; Kroes, H. Y.; Letteboer, S. J.; Ngu, L. H.; Budny, B.; van Wijk, E.; Gorden, N. T.; Azhimi, M.; Thauvin-Robinet, C.; Veltman, J. A.; Boink, M.; Kleefstra, T.; Cremers, F. P.; van Bokhoven, H., and de Brouwer, A. P. OFD1 is mutated in X-linked Joubert syndrome and interacts with LCA5-encoded lebercilin. *Am J Hum Genet*, 85(4):465–81, 2009.

Consugar, M. B.; Kubly, V. J.; Lager, D. J.; Hommerding, C. J.; Wong, W. C.; Bakker, E.; V. H.Gattone, 2nd; Torres, V. E.; Breuning, M. H., and Harris, P. C. Molecular diagnostics

of Meckel-Gruber syndrome highlights phenotypic differences between MKS1 and MKS3. *Hum Genet*, 121(5):591–9, 2007.

Dafinger, C.; Liebau, M. C.; Elsayed, S. M.; Hellenbroich, Y.; Boltshauser, E.; Korenke, G. C.; Fabretti, F.; Janecke, A. R.; Ebermann, I.; Nurnberg, G.; Nurnberg, P.; Zentgraf, H.; Koerber, F.; Addicks, K.; Elsobky, E.; Benzing, T.; Schermer, B., and Bolz, H. J. Mutations in KIF7 link Joubert syndrome with Sonic Hedgehog signaling and microtubule dynamics. *J Clin Invest*, 121(7), 2011.

Davis, E. E.; Zhang, Q.; Liu, Q.; Diplas, B. H.; Davey, L. M.; Hartley, J.; Stoetzel, C.; Szymanska, K.; Ramaswami, G.; Logan, C. V.; Muzny, D. M.; Young, A. C.; Wheeler, D. A.; Cruz, P.; Morgan, M.; Lewis, L. R.; Cherukuri, P.; Maskeri, B.; Hansen, N. F.; Mullikin, J. C.; Blakesley, R. W.; Bouffard, G. G.; Gyapay, G.; Rieger, S.; Tonshoff, B.; Kern, I.; Soliman, N. A.; Neuhaus, T. J.; Swoboda, K. J.; Kayserili, H.; Gallagher, T. E.; Lewis, R. A.; Bergmann, C.; Otto, E. A.; Saunier, S.; Scambler, P. J.; Beales, P. L.; Gleeson, J. G.; Maher, E. R.; Attie-Bitach, T.; Dollfus, H.; Johnson, C. A.; Green, E. D.; Gibbs, R. A.; Hildebrandt, F.; Pierce, E. A., and Katsanis, N. TTC21B contributes both causal and modifying alleles across the ciliopathy spectrum. *Nat Genet*, 43(3):189–96, 2011.

Dawe, H. R.; Smith, U. M.; Cullinane, A. R.; Gerrelli, D.; Cox, P.; Badano, J. L.; Blair-Reid, S.; Sriram, N.; Katsanis, N.; Attie-Bitach, T.; Afford, S. C.; Copp, A. J.; Kelly, D. A.; Gull, K., and Johnson, C. A. The Meckel-Gruber Syndrome proteins MKS1 and meckelin interact and are required for primary cilium formation. *Hum Mol Genet*, 16(2):173–86, 2007.

Delous, M.; Baala, L.; Salomon, R.; Laclef, C.; Vierkotten, J.; Tory, K.; Golzio, C.; Lacoste, T.; Besse, L.; Ozilou, C.; Moutkine, I.; Hellman, N. E.; Anselme, I.; Silbermann, F.; Vesque, C.; Gerhardt, C.; Rattenberry, E.; Wolf, M. T.; Gubler, M. C.; Martinovic, J.; Encha-Razavi, F.; Boddaert, N.; Gonzales, M.; Macher, M. A.; Nivet, H.; Champion, G.; Bertheleme, J. P.; Niaudet, P.; McDonald, F.; Hildebrandt, F.; Johnson, C. A.; Vekemans, M.; Antignac, C.; Ruther, U.; Schneider-Maunoury, S.; Attie-Bitach, T., and Saunier, S. The ciliary gene RPGRIP1L is mutated in cerebello-oculo-renal syndrome (Joubert syndrome type B) and Meckel syndrome. *Nat Genet*, 39(7):875–81, 2007.

den Hollander, A. I.; Koenekoop, R. K.; Yzer, S.; Lopez, I.; Arends, M. L.; Voesenek, K. E.; Zonneveld, M. N.; Strom, T. M.; Meitinger, T.; Brunner, H. G.; Hoyng, C. B.; van den Born, L. I.; Rohrschneider, K., and Cremers, F. P. Mutations in the CEP290 (NPHP6) gene are a frequent cause of Leber congenital amaurosis. *Am J Hum Genet*, 79(3):556–61, 2006.

Dixon-Salazar, T.; Silhavy, J. L.; Marsh, S. E.; Louie, C. M.; Scott, L. C.; Gururaj, A.; Al-Gazali, L.; Al-Tawari, A. A.; Kayserili, H.; Sztriha, L., and Gleeson, J. G. Mutations in the AHI1 gene, encoding jouberin, cause Joubert syndrome with cortical polymicrogyria. *Am J Hum Genet*, 75(6):979–87, 2004.

Doherty, D.; Parisi, M. A.; Finn, L. S.; Gunay-Aygun, M.; Al-Mateen, M.; Bates, D.; Clericuzio, C.; Demir, H.; Dorschner, M.; van Essen, A. J.; Gahl, W. A.; Gentile, M.; Gorden, N. T.; Hikida, A.; Knutzen, D.; Ozyurek, H.; Phelps, I.; Rosenthal, P.; Verloes, A.; Weigand, H.; Chance, P. F.; Dobyns, W. B., and Glass, I. A. Mutations in 3 genes (MKS3, CC2D2A and RPGRIP1L) cause COACH syndrome (Joubert syndrome with congenital hepatic fibrosis). *J Med Genet*, 47(1):8–21, 2009.

Donaldson, J. C.; Dempsey, P. J.; Reddy, S.; Bouton, A. H.; Coffey, R. J., and Hanks, S. K. Crk-associated substrate p130(Cas) interacts with nephrocystin and both proteins localize to cell-cell contacts of polarized epithelial cells. *Exp Cell Res*, 256(1):168–78, 2000.

Edvardson, S.; Shaag, A.; Zenvirt, S.; Erlich, Y.; Hannon, G. J.; Shanske, A. L.; Gomori, J. M.; Ekstein, J., and Elpeleg, O. Joubert syndrome 2 (JBTS2) in Ashkenazi Jews is associated with a TMEM216 mutation. *Am J Hum Genet*, 86(1):93–7, 2010.

Eley, L.; Gabrielides, C.; Adams, M.; Johnson, C. A.; Hildebrandt, F., and Sayer, J. A. Jouberin localizes to collecting ducts and interacts with nephrocystin-1. *Kidney Int*, 74(9):1139–49, 2008.

Ferland, R. J.; Eyaid, W.; Collura, R. V.; Tully, L. D.; Hill, R. S.; Al-Nouri, D.; Al-Rumayyan, A.; Topcu, M.; Gascon, G.; Bodell, A.; Shugart, Y. Y.; Ruvolo, M., and Walsh, C. A. Abnormal cerebellar development and axonal decussation due to mutations in AHI1 in Joubert syndrome. *Nat Genet*, 36(9):1008–13, 2004.

Ferrante, M. I.; Giorgio, G.; Feather, S. A.; Bulfone, A.; Wright, V.; Ghiani, M.; Selicorni, A.; Gammaro, L.; Scolari, F.; Woolf, A. S.; Sylvie, O.; Bernard, L.; Malcolm, S.; Winter, R.; Ballabio, A., and Franco, B. Identification of the gene for oral-facial-digital type i syndrome. *Am J Hum Genet*, 68(3):569–76, 2001.

Frazer, K. A.; Murray, S. S.; Schork, N. J., and Topol, E. J. Human genetic variation and its contribution to complex traits. *Nat Rev Genet*, 10(4):241–51, 2009.

Garcia-Gonzalo, F. R.; Corbit, K. C.; Sirerol-Piquer, M. S.; Ramaswami, G.; Otto, E. A.; Noriega, T. R.; Seol, A. D.; Robinson, J. F.; Bennett, C. L.; Josifova, D. J.; Garcia-Verdugo, J. M.; Katsanis, N.; Hildebrandt, F., and Reiter, J. F. A transition zone complex regulates

mammalian ciliogenesis and ciliary membrane composition. *Nat Genet*, 43(8):776–84, 2011.

Gorden, N. T.; Arts, H. H.; Parisi, M. A.; Coene, K. L.; Letteboer, S. J.; van Beersum, S. E.; Mans, D. A.; Hikida, A.; Eckert, M.; Knutzen, D.; Alswaid, A. F.; Ozyurek, H.; Dibooglu, S.; Otto, E. A.; Liu, Y.; Davis, E. E.; Hutter, C. M.; Bammler, T. K.; Farin, F. M.; Dorschner, M.; Topcu, M.; Zackai, E. H.; Rosenthal, P.; Owens, K. N.; Katsanis, N.; Vincent, J. B.; Hildebrandt, F.; Rubel, E. W.; Raible, D. W.; Knoers, N. V.; Chance, P. F.; Roepman, R.; Moens, C. B.; Glass, I. A., and Doherty, D. CC2D2A is mutated in Joubert syndrome and interacts with the ciliopathy-associated basal body protein CEP290. *Am J Hum Genet*, 83 (5):559–71, 2008.

Green, J. A. and Mykytyn, K. Neuronal ciliary signaling in homeostasis and disease. *Cell Mol Life Sci*, 2010.

Harris, P. C. Genetic complexity in Joubert syndrome and related disorders. *Kidney Int*, 72 (12):1421–3, 2007.

Harris, P. C. and Czarnecki, P. G. Ziliopathien. *Med. Genet. Medizinische Genetik*, 21(1):14–20, 2009.

Hellenbroich, Y.; Frost, S.-K., and Gillessen-Kaesbach, G. Klinik und Genetik des Joubert-Syndroms. *medgen*, 22(3):345–350, 2010.

Helou, J.; Otto, E. A.; Attanasio, M.; Allen, S. J.; Parisi, M. A.; Glass, I.; Utsch, B.; Hashmi, S.; Fazzi, E.; Omran, H.; O'Toole, J. F.; Sayer, J. A., and Hildebrandt, F. Mutation analysis of NPHP6/CEP290 in patients with Joubert syndrome and Senior-Loken syndrome. *J Med Genet*, 44(10):657–63, 2007.

Hildebrandt, F.; Otto, E., and Omran, H. Nephronophthise und verwandte Krankheiten. *medgen*, 12:225–231, 2000.

Huang, L.; Szymanska, K.; Jensen, V. L.; Janecke, A. R.; Innes, A. M.; Davis, E. E.; Frosk, P.; Li, C.; Willer, J. R.; Chodirker, B. N.; Greenberg, C. R.; McLeod, D. R.; Bernier, F. P.; Chudley, A. E.; Muller, T.; Shboul, M.; Logan, C. V.; Loucks, C. M.; Beaulieu, C. L.; Bowie, R. V.; Bell, S. M.; Adkins, J.; Zuniga, F. I.; Ross, K. D.; Wang, J.; Ban, M. R.; Becker, C.; Nurnberg, P.; Douglas, S.; Craft, C. M.; Akimenko, M. A.; Hegele, R. A.; Ober, C.; Utermann, G.; Bolz, H. J.; Bulman, D. E.; Katsanis, N.; Blacque, O. E.; Doherty, D.; Parboosingh, J. S.; Leroux, M. R.; Johnson, C. A., and Boycott, K. M. TMEM237 is mutated in individuals

with a Joubert syndrome related disorder and expands the role of the TMEM family at the ciliary transition zone. *Am J Hum Genet*, 89(6):713–30, 2011.

Iannicelli, M.; Brancati, F.; Mougou-Zerelli, S.; Mazzotta, A.; Thomas, S.; Elkhartoufi, N.; Travaglini, L.; Gomes, C.; Ardissino, G. L.; Bertini, E.; Boltshauser, E.; Castorina, P.; D'Arrigo, S.; Fischetto, R.; Leroy, B.; Loget, P.; Bonniere, M.; Starck, L.; Tantau, J.; Gentilin, B.; Majore, S.; Swistun, D.; Flori, E.; Lalatta, F.; Pantaleoni, C.; Penzien, J.; Grammatico, P.; Dallapiccola, B.; Gleeson, J. G.; Attie-Bitach, T., and Valente, E. M. Novel TMEM67 mutations and genotype-phenotype correlates in meckelin-related ciliopathies. *Hum Mutat*, 31(5):E1319–31, 2010.

Jacoby, M.; Cox, J. J.; Gayral, S.; Hampshire, D. J.; Ayub, M.; Blockmans, M.; Pernot, E.; Kisseleva, M. V.; Compere, P.; Schiffmann, S. N.; Gergely, F.; Riley, J. H.; Perez-Morga, D.; Woods, C. G., and Schurmans, S. INPP5E mutations cause primary cilium signaling defects, ciliary instability and ciliopathies in human and mouse. *Nat Genet*, 41(9):1027–31, 2009.

Joubert, M.; Eisenring, J. J.; Robb, J. P., and Andermann, F. Familial agenesis of the cerebellar vermis. A syndrome of episodic hyperpnea, abnormal eye movements, ataxia, and retardation. *Neurology*, 19(9):813–25, 1969.

Katsanis, N.; Ansley, S. J.; Badano, J. L.; Eichers, E. R.; Lewis, R. A.; Hoskins, B. E.; Scambler, P. J.; Davidson, W. S.; Beales, P. L., and Lupski, J. R. Triallelic inheritance in Bardet-Biedl syndrome, a Mendelian recessive disorder. *Science*, 293(5538):2256–9, 2001.

Keeler, L. C.; Marsh, S. E.; Leeflang, E. P.; Woods, C. G.; Sztriha, L.; Al-Gazali, L.; Gururaj, A., and Gleeson, J. G. Linkage analysis in families with Joubert syndrome plus oculo-renal involvement identifies the CORS2 locus on chromosome 11p12-q13.3. *Am J Hum Genet*, 73(3):656–62, 2003.

King, M. D.; Dudgeon, J., and Stephenson, J. B. Joubert's syndrome with retinal dysplasia: neonatal tachypnoea as the clue to a genetic brain-eye malformation. *Arch Dis Child*, 59 (8):709–18, 1984.

Lagier-Tourenne, C.; Boltshauser, E.; Breivik, N.; Gribaa, M.; Betard, C.; Barbot, C., and Koenig, M. Homozygosity mapping of a third Joubert syndrome locus to 6q23. *J Med Genet*, 41(4):273–7, 2004.

Lee, J. E.; Silhavy, J. L.; Zaki, M. S.; Schroth, J.; Bielas, S. L.; Marsh, S. E.; Olvera, J.; Brancati, F.; Iannicelli, M.; Ikegami, K.; Schlossman, A. M.; Merriman, B.; Attie-Bitach, T.; Logan,

C. V.; Glass, I. A.; Cluckey, A.; Louie, C. M.; Lee, J. H.; Raynes, H. R.; Rapin, I.; Castroviejo, I. P.; Setou, M.; Barbot, C.; Boltshauser, E.; Nelson, S. F.; Hildebrandt, F.; Johnson, C. A.; Doherty, D. A.; Valente, E. M., and Gleeson, J. G. CEP41 is mutated in Joubert syndrome and is required for tubulin glutamylation at the cilium. *Nat Genet*, 44(2):193–9, 2012.

Lewis, S. M.; Roberts, E. A.; Marcon, M. A.; Harvey, E.; Phillips, M. J.; Chuang, S. A.; Buncic, J. R., and Clarke, J. T. Joubert syndrome with congenital hepatic fibrosis: an entity in the spectrum of oculo-encephalo-hepato-renal disorders. *Am J Med Genet*, 52(4):419–26, 1994.

Lindhout, D.; Barth, P. G.; Valk, J., and Boen-Tan, T. N. The Joubert syndrome associated with bilateral chorioretinal coloboma. *Eur J Pediatr*, 134(2):173–6, 1980.

Maria, B. L.; Hoang, K. B.; Tusa, R. J.; Mancuso, A. A.; Hamed, L. M.; Quisling, R. G.; Hove, M. T.; Fennell, E. B.; Booth-Jones, M.; Ringdahl, D. M.; Yachnis, A. T.; Creel, G., and Frerking, B. "joubert syndrome"revisited: key ocular motor signs with magnetic resonance imaging correlation. *J Child Neurol*, 12(7):423–30, 1997.

McEwen, D. P.; Koenekoop, R. K.; Khanna, H.; Jenkins, P. M.; Lopez, I.; Swaroop, A., and Martens, J. R. Hypomorphic CEP290/NPHP6 mutations result in anosmia caused by the selective loss of G proteins in cilia of olfactory sensory neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(40):15917–22, 2007.

Noor, A.; Windpassinger, C.; Patel, M.; Stachowiak, B.; Mikhailov, A.; Azam, M.; Irfan, M.; Siddiqui, Z. K.; Naeem, F.; Paterson, A. D.; Lutfullah, M.; Vincent, J. B., and Ayub, M. CC2D2A, encoding a coiled-coil and C2 domain protein, causes autosomal-recessive mental retardation with retinitis pigmentosa. *Am J Hum Genet*, 82(4):1011–8, 2008.

Omran, H. and Olbrich, H. Zilienkrankheiten unter besonderer Berücksichtigung der primären ziliären Dyskinesie. *medgen*, 22(3):315–321, 2010.

Parisi, M. A. Clinical and molecular features of joubert syndrome and related disorders. *Am J Med Genet C Semin Med Genet*, 151C(4):326–40, 2009.

Parisi, M. A.; Bennett, C. L.; Eckert, M. L.; Dobyns, W. B.; Gleeson, J. G.; Shaw, D. W.; McDonald, R.; Eddy, A.; Chance, P. F., and Glass, I. A. The NPHP1 gene deletion associated with juvenile nephronophthisis is present in a subset of individuals with Joubert syndrome. *Am J Hum Genet*, 75(1):82–91, 2004.

Parisi, M. A.; Doherty, D.; Eckert, M. L.; Shaw, D. W.; Ozyurek, H.; Aysun, S.; Giray, O.; Al Swaid, A.; Al Shahwan, S.; Dohayan, N.; Bakhsh, E.; Indridason, O. S.; Dobyns, W. B.;

Bennett, C. L.; Chance, P. F., and Glass, I. A. AHI1 mutations cause both retinal dystrophy and renal cystic disease in Joubert syndrome. *J Med Genet*, 43(4):334–9, 2006.

Putoux, A.; Thomas, S.; Coene, K. L.; Davis, E. E.; Alanay, Y.; Ogur, G.; Uz, E.; Buzas, D.; Gomes, C.; Patrier, S.; Bennett, C. L.; Elkhartoufi, N.; Frison, M. H.; Rigonnot, L.; Joye, N.; Pruvost, S.; Utine, G. E.; Boduroglu, K.; Nitschke, P.; Fertitta, L.; Thauvin-Robinet, C.; Munnich, A.; Cormier-Daire, V.; Hennekam, R.; Colin, E.; Akarsu, N. A.; Bole-Feysot, C.; Cagnard, N.; Schmitt, A.; Goudin, N.; Lyonnet, S.; Encha-Razavi, F.; Siffroi, J. P.; Winey, M.; Katsanis, N.; Gonzales, M.; Vekemans, M.; Beales, P. L., and Attie-Bitach, T. KIF7 mutations cause fetal hydrolethalus and acrocallosal syndromes. *Nat Genet*, 43(6):601–6, 2011.

Reiter, J. F. and Skarnes, W. C. Tectonic, a novel regulator of the Hedgehog pathway required for both activation and inhibition. *Genes Dev*, 20(1):22–7, 2006.

Saar, K.; Al-Gazali, L.; Sztriha, L.; Rueschendorf, F.; Nur, E. Kamal M.; Reis, A., and Bayoumi, R. Homozygosity mapping in families with Joubert syndrome identifies a locus on chromosome 9q34.3 and evidence for genetic heterogeneity. *Am J Hum Genet*, 65(6): 1666–71, 1999.

Sanger, F.; Nicklen, S., and Coulson, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74(12):5463–7, 1977.

Saunier, S.; Calado, J.; Heilig, R.; Silbermann, F.; Benessy, F.; Morin, G.; Konrad, M.; Broyer, M.; Gubler, M. C.; Weissenbach, J., and Antignac, C. A novel gene that encodes a protein with a putative src homology 3 domain is a candidate gene for familial juvenile nephronophthisis. *Hum Mol Genet*, 6(13):2317–23, 1997.

Sayer, J. A.; Otto, E. A.; O'Toole, J. F.; Nurnberg, G.; Kennedy, M. A.; Becker, C.; Hennies, H. C.; Helou, J.; Attanasio, M.; Fausett, B. V.; Utsch, B.; Khanna, H.; Liu, Y.; Drummond, I.; Kawakami, I.; Kusakabe, T.; Tsuda, M.; Ma, L.; Lee, H.; Larson, R. G.; Allen, S. J.; Wilkinson, C. J.; Nigg, E. A.; Shou, C.; Lillo, C.; Williams, D. S.; Hoppe, B.; Kemper, M. J.; Neuhaus, T.; Parisi, M. A.; Glass, I. A.; Petry, M.; Kispert, A.; Gloy, J.; Ganner, A.; Walz, G.; Zhu, X.; Goldman, D.; Nurnberg, P.; Swaroop, A.; Leroux, M. R., and Hildebrandt, F. The centrosomal protein nephrocystin-6 is mutated in Joubert syndrome and activates transcription factor ATF4. *Nat Genet*, 38(6):674–81, 2006.

Smith, U. M.; Consugar, M.; Tee, L. J.; McKee, B. M.; Maina, E. N.; Whelan, S.; Morgan, N. V.; Goranson, E.; Gissen, P.; Lilliquist, S.; Aligianis, I. A.; Ward, C. J.; Pasha, S.; Punyashthiti, R.; Malik Sharif, S.; Batman, P. A.; Bennett, C. P.; Woods, C. G.; McKeown, C.; Bucourt,

M.; Miller, C. A.; Cox, P.; Algazali, L.; Trembath, R. C.; Torres, V. E.; Attie-Bitach, T.; Kelly, D. A.; Maher, E. R.; V. H.Gattone, 2nd; Harris, P. C., and Johnson, C. A. The transmembrane protein meckelin (MKS3) is mutated in Meckel-Gruber syndrome and the wpk rat. *Nat Genet*, 38(2):191–6, 2006.

Tallila, J.; Jakkula, E.; Peltonen, L.; Salonen, R., and Kestila, M. Identification of CC2D2A as a Meckel syndrome gene adds an important piece to the ciliopathy puzzle. *Am J Hum Genet*, 82(6):1361–7, 2008.

Tory, K.; Lacoste, T.; Burglen, L.; Moriniere, V.; Boddaert, N.; Macher, M. A.; Llanas, B.; Nivet, H.; Bensman, A.; Niaudet, P.; Antignac, C.; Salomon, R., and Saunier, S. High NPHP1 and NPHP6 mutation rate in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis: potential epistatic effect of NPHP6 and AHI1 mutations in patients with NPHP1 mutations. *J Am Soc Nephrol*, 18(5):1566–75, 2007.

Tran, P. V.; Haycraft, C. J.; Besschetnova, T. Y.; Turbe-Doan, A.; Stottmann, R. W.; Herron, B. J.; Chesebro, A. L.; Qiu, H.; Scherz, P. J.; Shah, J. V.; Yoder, B. K., and Beier, D. R. THM1 negatively modulates mouse sonic hedgehog signal transduction and affects retrograde intraflagellar transport in cilia. *Nat Genet*, 40(4):403–10, 2008.

Valente, E. M.; Marsh, S. E.; Castori, M.; Dixon-Salazar, T.; Bertini, E.; Al-Gazali, L.; Messer, J.; Barbot, C.; Woods, C. G.; Boltshauser, E.; Al-Tawari, A. A.; Salpietro, C. D.; Kayserili, H.; Sztriha, L.; Gribaa, M.; Koenig, M.; Dallapiccola, B., and Gleeson, J. G. Distinguishing the four genetic causes of Jouberts syndrome-related disorders. *Ann Neurol*, 57(4):513–9, 2005.

Valente, E. M.; Silhavy, J. L.; Brancati, F.; Barrano, G.; Krishnaswami, S. R.; Castori, M.; Lancaster, M. A.; Boltshauser, E.; Boccone, L.; Al-Gazali, L.; Fazzi, E.; Signorini, S.; Louie, C. M.; Bellacchio, E.; Bertini, E.; Dallapiccola, B., and Gleeson, J. G. Mutations in CEP290, which encodes a centrosomal protein, cause pleiotropic forms of Joubert syndrome. *Nat Genet*, 38(6):623–5, 2006.

Valente, E. M.; Brancati, F., and Dallapiccola, B. Genotypes and phenotypes of Joubert syndrome and related disorders. *Eur J Med Genet*, 51(1):1–23, 2008.

Wolf, M. T.; Lee, J.; Panther, F.; Otto, E. A.; Guan, K. L., and Hildebrandt, F. Expression and phenotype analysis of the nephrocystin-1 and nephrocystin-4 homologs in Caenorhabditis elegans. *J Am Soc Nephrol*, 16(3):676–87, 2005.

Wolf, M. T.; Saunier, S.; O'Toole, J. F.; Wanner, N.; Groshong, T.; Attanasio, M.; Salomon, R.; Stallmach, T.; Sayer, J. A.; Waldherr, R.; Griebel, M.; Oh, J.; Neuhaus, T. J.; Josefiak, U.; Antignac, C.; Otto, E. A., and Hildebrandt, F. Mutational analysis of the RPGRIP1L gene in patients with Joubert syndrome and nephronophthisis. *Kidney Int*, 72(12):1520–6, 2007.

6.2. Bücherverzeichnis

Löffler, Georg and Petrides, Petro E. *Biochemie & Pathobiochemie*, volume 7. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2003.

Schaaf, Christian and Zschocke, Johannes. *Basiswissen Humangenetik*. Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2008.

6.3. Elektronische Datenbanken

National Center for Biotechnology Information (NCBI). `http://www.ncbi.nlm.nih.gov`.

Ensembl Genome Browser, . The Wellcome Trust Sanger Institute. `http://www.ensembl.org`.

Mutation Taster, . Neuropädiatrie, Charité, Berlin. `http://www.mutationtaster.org`.

Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), . Johns Hopkins University, Baltimore. `http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim`.

PolyPhen: prediction of functional effect of human nsSNPs, . Divison of Genetics, Havard Medical School; Bork Group, European Molecular Biology Laboratory. `http://genetics.bwh.harvard.edu/pph/`.

7. Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Frau Prof. Dr. G. Gillessen-Kaesbach für die Möglichkeit der Durchführung einer Dissertation am Institut für Humangenetik und die Bereitstellung eines Arbeitsplatzes im Labor sowie die kritische Durchsicht der Dissertation.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Doktorvater PD Dr. med. Y. Hellenbroich für die Überlassung des Themas und die hervorragende Betreuung bedanken. Er hat mir sowohl während des experimentellen Teils der Dissertation als auch besonders beim Verfassen der Arbeit immer mit wertvollen Ratschlägen zur Seite gestanden. Auch für die schnellen und sorgfältigen Korrekturen möchte ich mich herzlich bedanken. Sie haben mir bei der Erstellung der schriftlichen Arbeit sehr geholfen.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Heike Böttger bedanken. Sie hat mich mit außergewöhnlichem Engagement in die experimentellen Methoden der Arbeit eingeführt. Während der gesamten Laborphase wurde ich intensiv und gewissenhaft betreut und konnte mit allen Fragen und Problemen immer zu ihr kommen.

Mein weiterer Dank gilt allen Mitarbeiten des Instituts für Humangenetik für die Hilfsbereitschaft und das nette Arbeitsklima.

Meinem Verlobten Jan Hartmann danke ich für seine wahnsinnige Geduld bei all meinen Computer-Problemen, für die Hilfe bei der Erstellung der Grafiken und der Formatierung sowie für seine Liebe und Unterstützung in allen Lebenslagen.

Ein weiterer Dank geht an meine langjährige Freundin Sabrina Heusler. Ihre gründliche Korrektur konnte so einige Rechtschreib- und Kommafehler verhindern, die ich sonst wohl nicht mehr entdeckt hätte.

Zuletzt möchte ich meinen Eltern, meiner Schwester und meinen Großeltern danken. Sie haben mir dieses Studium und damit verbunden diese Dissertation erst ermöglicht. Vielen Dank für eure liebevolle Unterstützung und eure Motivation!

8. Lebenslauf

Persönliche Daten

Name:	Sarah-Kathrine Frost
Geburtstag:	23.07.1985

Schullaufbahn

1992-1996	Grundschule Bonifatiusschule, Hannover
1996-1998	Orientierungsstufe Ludwig-Windthorst-Schule, Hannover
1998-2001	Gymnasium Herschelschule, Hannover
2001-2005	Gymnasium Ricarda-Huch-Schule, Hannover
2005	Abitur

Studium

seit 2005	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
03/2008	Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
07-12/2009	Experimenteller Teil der Dissertation am Institut für Humangenetik
02/2011-01/2012	Praktisches Jahr
05/2012	Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung

Studiumbegleitende Tätigkeit

2007-2011	Studentische Hilfskraft am Institut für Medizingeschichte und Wissenschaftsforschung

Lübeck, den 10. August 2012

8.1. Eigene Veröffentlichungen

Frost, S.-K.; Korenke, G. C.; Marquardt, I.; Kläs, R.; Janecke, A.; Kohlhase, J.; Goecke, T.; Uyanik, G.; Güzünler, M.; Rudnik-Schöneborn, S.; Gillessen-Kaesbach, G., and Hellenbroich, Y. Mutation analysis of the genes AHI1, CEP290 and TMEM67/MKS3 in patients with Joubert syndrome and related disorders. *medgen*, 22(1):111, 2010a.

Frost, S.-K.; Korenke, G. C.; Marquardt, I.; Kläs, R.; Janecke, A.; Kohlhase, J.; Goecke, T.; Uyanik, G.; Güzünler, M.; Rudnik-Schöneborn, S.; Gillessen-Kaesbach, G., and Hellenbroich, Y. „Das liegt in den Genen...“ - Mutationssuche bei Patienten mit Kleinhirnfehlbildungen. Poster, 2010b.

Hellenbroich, Y.; Frost, S.-K., and Gillessen-Kaesbach, G. Klinik und Genetik des Joubert-Syndroms. *medgen*, 22(3):345–350, 2010.

A. Anhang

A.1. Glossar

Acrocallosales Syndrom

- OMIM 200990
- Autosomal-rezessive Vererbung
- Typische klinische Zeichen:
  - Agenesie des Corpus callosum
  - präaxiale Polydaktylie
  - Verschiedene Dysmorphien

Bardet-Biedel-Syndrom

- OMIM 209900
- Autosomal-rezessive Vererbung, teilweise polygen
- Häufigkeit ca. 1:150.000
- Typische klinische Zeichen:
  - Adipositas
  - Retinopathia Pigmentosa
  - postaxiale Polydaktylie
  - polyzystische Nieren
  - Hypogenitalismus

COACH-Syndrom

- OMIM 216360
- Autosomal-rezessive Vererbung
- Häufigkeit: <1:100.000

- Akronym für eine Assoziation von Anomalien: ***c**erebellar vermis hypoplasia, **o**ligophrenia, **a**taxia, **c**oloboma and **h**epatic fibrosis*

Dekaban-Arima-Syndrom

- OMIM243910
- Autosomal-rezessive Vererbung
- Typische klinische Zeichen:
  - Vermisagenesie
  - Lebersche kongenitale Amaurose
  - Zystennieren
  - Leberfibrose

Hydrolethalus-Syndrom

- OMIM 236680
- Autosomal-rezessive Vererbung
- Verwandt mit dem Meckel-Syndrom
- Letalität meist in utero oder postnatal
- Typische klinische Zeichen:
  - Hydrozephalus
  - Postaxiale Polydaktylie der Hände
  - Präaxiale Polydaktylie der Füße
  - Mikrogenie

Jeune-Syndrom (Asphyxiierende Thoraxdystrophie)

- OMIM 613819 (Typ 4, ausgelöst durch Mutationen im *TTC21B*-Gen)
- Autosomal-rezessive Vererbung
- Typische klinische Zeichen:
  - Dysplasie der Rippen mit Lungenhypoplasie
  - kurze Extremitäten
  - Nephronophthise
  - fibrotische oder zystische Veränderungen an Leber und Pankreas
  - Retinopathie

Lebersche kongenitale Amaurose

- OMIM 204000
- Autosomal-rezessive Vererbung, zum Teil auch autosomal-dominant
- Typische klinische Zeichen:
  - Retinale Dystrophie

Meckel-(Gruber)-Syndrom

- OMIM 249000
- Ausomal-rezessive Vererbung
- Häufigkeit: 0,7-7,5:100.000
- Letalität meist in utero oder postnatal
- Typische klinische Zeichen:
  - Polyzystische Nieren
  - okzipitale Enzephalozele
  - Gallengangsdysplasien
  - Leberzysten/Leberfibrose
  - Polydaktylie
  - Lippen-Kiefer-Gaumenspalte

MORM-Syndrom

- OMIM 610156
- Autosomal-rezessive Vererbung
- Akronym für eine Assoziation von Anomalien: ***m**ental retardation, truncal **o**besity, **r**etinal dystrophy, **m**icropenis*

Oro-facio-digitales Syndrom Typ 1

- OMIM 311200
- Häufigkeit ca. 1:250.000
- X-chromosomal-dominante Vererbung
- Typische klinische Zeichen:
  - faziale Dysmorphien (Balkonstirn, Gesichtsasymmetrie, Hypertelorismus, verbreiterte Nasenwurzel)

  - Fehlbildungen der Mundhöhle (Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, gespaltene Zunge, Zahnanomalien)
  - Fehlbildungen der Finger (Polydaktylie, Syndaktylie, Brachydaktylie, Klinodaktylie)
  - Fehlbildungen des zentralen Nervensystems
  - Polyzystische Nieren

Senior-Løken-Syndrom

- OMIM 266900
- Autosomal-rezessive Vererbung
- Typische klinische Zeichen:
  - Juvenile Nephronophthise
  - Retinopathia pigmentosa

A.2. Abkürzungsverzeichnis

(w/v)	Verhältnis Gewicht zu Volumen
°C	Temperatur in Grad Celsius
μ	Mikro
A	Adenin
AHI1	*Abelson helper inegration site 1*
aq. dest.	aqua destillata
ARL13B	*ADP-Ribosylation factor-like 13B*
ATF4	*Activating transcription factor 4*
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
cAMP	Cyclisches Adenosinmonophosphat
CC2D2A	*Coiled-coil and C2 domain-containing protein 2A*
cDNA	*complementary*Desoxyribonukleinsäure (komplementärer DNA-Strang)
CENPF	*Centromere protein F*
CEP290	*Centrosomal protein 290kD*
CEP41	*Centrosomal protein 41kD*
cMRT	craniales MRT
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphoshat
ddNTP	Didesoxynukleotidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
et al.	et alii
ExoSap	Exonuklease I und Shrimp Alkaline Phosphatase
f	*forward* (vorwärts)
G	Guanin
g	Gramm
GTP	Guanosintriphosphat
HPLC	*High Performance/Pressure Liquid Chromatography*
INPP5E	*Inositol polyphosphate-5-phosphatases*
JBTS 1-15	Joubert Syndrom Typ 1-15

JSRD	*Joubert Syndrome and Related Disorders*
kb	Kilo-Basenpaaren (1000 Basenpaaren)
kD	Kilodalton
KIF7	*Kinesin Family Member 7*
l	Liter
LCA5	*Leber congenital amaurosis type 5*
M	Molarität (mol/l)
MKS1	*Meckel syndrome type 1*
MKS3	*Meckel syndrome type 3*
ml	Milliliter
mRNA	*messenger*-Ribonukleinsäure
MRT	Magnetresonanztomographie
MTS	*Molar Tooth Sign*
n	Nano
NCBI	*National Center for Biotechnology Information*
NPHP1	*Nephrocystin-1*
OFD1	*Oro-facio-digital syndrome type 1*
PCR	*polymerase chain reaction*
RPGRIP1L	*Retinitis pigmentosa GTPase regulator interacting protein 1 like*
R	Purine (A oder G)
r	*reverse* (rückwärts)
rs	*reference* SNP
S	Nukleinsäure C oder G
S.	Seite
s.	Siehe
Seq.	Sequenzierung
SH3	*src homology 3*
SMC	*Structural Maintenance of Chromosomes*
SNP	*single nucleotide polymorphism*
snRNA	*small nuclear ribonucleic acid*
SSW	Schwangerschaftswoche
T	Thymin
Taq	Thermus aquaticus
TBE-Puffer	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TCTN1	*Tectonic 1*
TMEM216	*Transmembrane protein 216*
TMEM237	*Transmembrane protein 237*

TMEM67	*Transmembrane protein 67*
TTC21B	*Tetratricopeptide Repeat Domain 21B*
TTLL6	*Tubulin tyrosine ligase-like family, member 6*
U	Uracil
vgl.	Vergleiche
Y	Pyrimidine (C, T oder U)
z.B.	zum Beispiel
ZNS	Zentralnervensystem

A.3. Buchstabencode für Aminosäuren

Aminosäure	Einbuchstabencode	Dreibuchstabencode
Alanin	A	Ala
Arginin	R	Arg
Asparagin	N	Asn
Asparaginsäure	D	Asp
Cystein	C	Cys
Glutamin	Q	Gln
Glutaminsäure	E	Glu
Glycin	G	Gly
Histidin	H	His
Isoleucin	I	Ile
Leucin	L	Leu
Lysin	K	Lys
Methionin	M	Met
Phenylalanin	F	Phe
Prolin	P	Pro
Serin	S	Ser
Threonin	T	Thr
Tryptophan	W	Trp
Tyrosin	Y	Tyr
Valin	V	Val

A.4. Primer für *NPHP1*-PCR

Exon	PCR-Primer	Primersequenz 5′ nach 3′	bp
1	NPHP1-E1-f	gac gtt tcc cct atc ctt agg a	428
	NPHP1-E1-r	gcg tta caa cct ggg aag gta	
5	NPHP1-E5-f	gca cac ggt ctt agc tag atg	449
	NPHP1-E5-r	gta ata cag gtg tac agg cag	
10	NPHP1-E10-f	gtg gca ttt tgg aag tgc ctg	371
	NPHP1-E10-r	gca agt cca aat tct gcc tta g	
15	NPHP1-E15-f	tgc cca gat ag tacc tca tgg	318
	NPHP1-E15-r	atg tag cta cct ctc aga tgc	
20	NPHP1-E20-f	ctc tgc tca ctt cca ctt ctg	496
	NPHP1-E20-r	atc tga ttc cgt ggg aag ctg	

A.5. Primer für *CEP290*-PCR

Exon	PCR-Primer	Primersequenz 5′ nach 3′	bp
1 - 2	CEP290-E1-f	acc aat aat act gtg tac ctt g	544
	CEP290-E2-IR	gtg gtg atg tag ata tta cca ggt	
3	CEP290-E3-f	gtg ctt aca ttc cag tat aaa g	186
	CEP290-E3-r	gtt taa tga aca aat gga att ca	
4	CEP290-E4-f	acc tta taa tca tga tgg act c	285
	CEP290-E4-r	aat aac cat gat tac aat cat cc	
5	CEP290-E5-f-neu	ctg cac tga agt ata atg c	417
	CEP290-E5-r-neu	ggt gat gac aaa atg aac agt g	
6	CEP290-E6-f-neu	aga tcg cac cac tgt act cca	272
	CEP290-E6-r-neu	act tag aag act cca gtc ctg	
7	CEP290-E7-f-neu	tgg ttc tac tga gcc aaa taa tg	385
	CEP290-E7-r-neu	ctg aag gta acc aaa cac aac	
8	CEP290-E8-f-neu	ggt gag gct tta agt gtg gtg	390
	CEP290-E8-r-neu	gtg aca gat tta tac cag gga	
9	CEP290-E9-f	aga gga cac tta tgg ctg cg	332
	CEP290-E9-r	gta atg aga taa tat gaa gtc tg	
10	CEP290-E10f-neu	tgt cac cta taa ttc cag gat gac	459
	CEP290-E10r-neu	agg aca gtt cta gag ctt ttc	
11	CEP290-11-f	gta tca taa atc tac taa cgg tg	284
	CEP290-11-r	atc gtt cag agt tcc aac tg	
12	CEP290-E12-f	ctt gta ccc aca aga aaa tat g	341
	CEP290-E12-r	aga aaa ctc att gac ttg ac	
13	CEP290-E13-f	tga ttt gaa gga ata agt agt c	282
	CEP290-E13-r	ctg tga atg gca aga ata att c	
14	CEP290-E14f-neu	cag agt cac ttt gcc ttt agg a	586
	CEP290-E14r-neu	cac tcc aac ccc ata aaa tct ga	
15-16	CEP290-E15-16f-neu	ctc att ctt cag tga tac tgg ct	486
	CEP290-E15-16r-neu	gca gat cca caa tag aac agc a	
17	CEP290-E17f-neu	gag aag ctt gta ttg gct atg tag	519
	CEP290-E17-neu2-r	taa aac ggt gaa acc ccg tct	
18	CEP290-E18-f	att gat caa act ttt ctt aac ttg	293
	CEP290-E18-r	aca gag gta att agg agt aaa g	
19	CEP290-E19-f	cca atg atg tct ttg gat tat g	340
	CEP290-E19-r	aaa tat ctc atc aga aac tat gg	

Exon	PCR-Primer	Primersequenz 5′ nach 3′	bp
20	CEP290-E20f-neu	tgg tca tct tat tcc cgt ctg	679
	CEP290-E20r-neu	ctg ctt aga aat gcc tag gta tg	
21	CEP290-E21-f	tat ggt tga ggt aaa att cct g	390
	CEP290-E21-r	agt act atc tgc atg ctt tgg	
22	CEP290-E22-f	taa ctt tcc tat aat gtt gtc ag	372
	CEP290-E22-r	taa gtt cct aac agt agt tac c	
23	CEP290-E23-f	ata cct ctt gtg ttg aga aaa c	300
	CEP290-E23-r	cac aaa gac aca tcc ata tta c	
24	CEP290-E24-f	tat gca ata ttg tac aaa gta gg	368
	CEP290-E24-r	tga tac cat cct atc ttc tgc	
25	CEP290-E25-f	aaa gtg gct agt gct tga cc	358
	CEP290-E25-r	tgt taa att tat ata aat gca ggc	
26	CEP290-E26-f	aac tgg att gtg agt ttt aag g	383
	CEP290-E26-r	agg att att cat ctg cct aag	
27	CEP290-E27-f	aca gca tct aaa ata tct gag g	369
	CEP290-E27-r	aga tcc aga caa acc act taa c	
28	CEP290-E28-f	aag gcc aag taa aga gga ttg	349
	CEP290-E28-r	tac tac taa gaa ttg tat acc tg	
29	CEP290-E29-f	tag aaa gtg tac tta att gtt cc	231
	CEP290-E29-r	ccc act ccc aac atc taa tg	
30	CEP290-E30f-neu	tgt aga tct cat gtg cca ctg	698
	CEP290-E30r-neu	tga ggc tag aga gtc cct tga	
31	CEP290-E31-f	gac ctg ctt ata gtc agt gtt c	612
	CEP290-E31-r	agg cag gag aat ggc atg aac	
32	CEP290-E32-f	cct gtt atg tgc ctg atg tc	222
	CEP290-E32-r	tga gtt aac act cta gac tat g	
33	CEP290-E33-f	atc tat gtt tta tca tac agc tg	321
	CEP290-E33-r	atc att cta tgc att gcc ctc	
34	CEP290-E34-f	gca ttt taa agg gaa aaa gat ac	402
	CEP290-E34-r	cac ttt agg gta aaa taa tat tta g	
35	CEP290-E35f-neu	gct ggg ctt gtc aac ttg aac	468
	CEP290-E35r-neu	tga aca gcg gtg agc tac ag	
36	CEP290-E36-f	aat atg gaa taa gta tgg cat tg	337
	CEP290-E36-r	agc aaa cac tta tgt tta tct tc	
37	CEP290-E37-f	gtg aca gag tga gac tgg g	397
	CEP290-E37-r	aca aca cgg aga ttt ata cta c	

Exon	PCR-Primer	Primersequenz 5′ nach 3′	bp
38	CEP290-E38f-neu	gct tga ttt aat gct gag ttc tc	523
	CEP290-E38r-neu	gtc tag cca cca aca gtg cat	
39	CEP290-E39-f	gtt cct ttt atc att gat act tc	352
	CEP290-E39-r	aag tag aaa taa act act acc tc	
40	CEP290-E40-f	gtg ata gct tca gaa agt tgc	342
	CEP290-E40-r	cag aat taa tac agc cag gtc	
41	CEP290-E41-f	aac ata ttt aca tat tct cta gg	479
	CEP290-E41-neu-r	cag gat cac agg aaa atc cat c	
42	CEP290-E42-f	ttt ggt ttg gta atg agt atg c	301
	CEP290-E42-r	ttc aat ttc tag ggg tca acc	
43	CEP290-E43-f	aca ctg aac ttt tct ttt ttt atc	320
	CEP290-E43-r	aga tgt aat gct ttt ggc cag	
44	CEP290-E44-f	tat cca gta tgt ctt tta tgg c	329
	CEP290-E44-r	acc atc acc atg ata tat tag g	
45	CEP290-E45-f	ttt gcc ttt tct ttt caa tgg c	223
	CEP290-E45-r	tat cta aac ttt tca ttt ctg gc	
46	CEP290-E46-f	tgt tgt att gtt ggt act tcg	394
	CEP290-E46-r	tta gcc ttg cct ctc ata ag	
47	CEP290-E47-f	tgg ttt cta aaa cta ctt tga ag	296
	CEP290-E47-r	act tcc agt ttt tcc aag agg	
48	CEP290-E48-f	tag agc ccc agg tta ttt ttg	293
	CEP290-E48-r	tgt tca tca gga aga aac cag	
49	CEP290-E49-f	tta gta cag tta ttt gaa ctg ac	293
	CEP290-E49-r	aca atg caa gga aca tct tgc	
50	CEP290-E50-f	acg ctt tgt taa aaa tgt gta tc	255
	CEP290-E50-r	atg att gtc tct agt tgt agc	
51	CEP290-E51f-neu	tgc aaa tgc cat cag gtc aga	523
	CEP290-E51r-neu	cag gga gac aat gat cag aaa tc	
52	CEP290-E52-f	cca tta cct tga act cat tcg	230
	CEP290-E52-r	tag gat acg tag tta aag atg g	
53	CEP290-E53-f	att cag gaa tac ttt ggc ttt c	418
	CEP290-E53-r	ttc gga gaa ctg ctt att tcc	

A.6. Primer für *CEP290*-Sequenzierung

Die meisten Sequenzprimer entprachen den PCR-Primern. Die folgende Tabelle zeigt die Primer, die für die Sequenzreaktion verwendet wurden, und nicht den PCR-Primern entsprechen.

Exon	Sequenz-Primer	Primersequenz 5′ nach 3′
1 - 2	CEP290-E1-f	acc aat aat act gtg tac ctt g
	CEP290-E2-IR	gtg gtg atg tag ata tta cca ggt
6	kein f-Primer	Sequenz bricht am Poly-T ab
31	kein r-Primer	Sequenz bricht am Poly-T ab
51	CEP290-E51r-seq	act tgg ggg tag cta aca tg

A.7. Primer für *TMEM67*-PCR

Exon	PCR-Primer	Primersequenz 5′ nach 3′	bp
1	TMEM67-e1-f	cagggttggtaacctagcaac	472
	TMEM67-e1-r	cagaagttcgagactagcctg	
2	TMEM67-e2-f	agtactgcctccagaatcctg	389
	TMEM67-e2-r	cgctgatctcccaaaacttac	
3	TMEM67-e3-f	gaagagagaactattatccggag	469
	TMEM67-e3-r	gagaattgcttgagccactgc	
4	TMEM67-e4-f	ggtacgaagggatcacttctc	445
	TMEM67-e4-r	tctgggcctcagcttctgtat	
5+6	TMEM67-e5+6-f	ctttgtaacacagaatggcct	610
	TMEM67-e5+6r	ggtacagactgagtactgtac	
7	TMEM67-e7-f	gtgattattttgtaatgcggtcc	404
	TMEM67-e7-r	gtattctctttcagcccacaag	
8+9	TMEM67-e8+9-f	tgttcctactcggccatcttg	609
	TMEM67-e8+9-r	ctgagtttgtaccaacaacct	
10	TMEM67-e10-f	ggaggctatctgtcactagtg	437
	TMEM67-e10-r	caactgtagtatgtaactgatgc	
11	TMEM67-e11-f3	attgcaggcatgagccacca	459
	TMEM67-e11-r3	tgagattgcaccactgcactc	
12	TMEM67-e12-f	ctttactgttagtggttttggtcc	529
	TMEM67-e12-r	tggcacactgtatagaaccac	

Exon	PCR-Primer	Primersequenz 5′ nach 3′	bp
13	TMEM67-e13-f	agagaacgccattgtcaggtg	354
	TMEM67-e13-r	cccgaccaactgttccaattc	
14	TMEM67-e14-f	gtgtaaccttccttagtccttg	438
	TMEM67-e14-r	ctcaggatccataagaactcac	
15	TMEM67-e15-f	acgtgtaagttaaaggtcaactc	321
	TMEM67-e15-r	ggagtctggggaaagaatagc	
16	TMEM67-e16-f	tgctgggattacaggtgtgag	403
	TMEM67-e16-r	gacccagcaatacttacccta	
17	TMEM67-e17-f	gcaggtggtctttatagctgg	402
	TMEM67-e17-r	gctcagcacactcaaggaatg	
18	TMEM67-e18-f	gagtccagaatcaagtcctgc	412
	TMEM67-e18-r	ggcagagtttcagactgagca	
19+20	TMEM67-e19+20-f	ccaggttatctgatgagcttc	616
	TMEM67-e19+20-r	gagaaatcttccactgtcatg	
21	TMEM67-e21-f	gagaagaatgccaaatgagctaac	480
	TMEM67-e21-r	gtcaccttctttctgctacag	
22	TMEM67-e22-f	aggctccctcaatgactcaac	416
	TMEM67-e22-r	aaccagtggaaaattggccca	
23	TMEM67-e23-f	tcccaagaatacaatcttc	369
	TMEM67-e23-r	gtgacagagggagactccat	
24+25	TMEM67-e24+25-f	gcacctgaatcttgtaatatgtg	594
	TMEM67-e24+25-r	cctaagtattgaatgtgacagac	
26	TMEM67-e26-f	aggtttcaatgtagtaacttcagtc	411
	TMEM67-e26-r	taagctgagatcgtgccactg	
27	TMEM67-e27-f	gtaagccatgaagtattgtatacag	504
	TMEM67-e27-r	gcaacttatgccctccactag	
28	TMEM67-e28-f	gggattcagatacctgatacatg	411
	TMEM67-e28-r	actacacacaatgggaaaacagta	

A.8. PCR-Zyklen der einzelnen *CEP290*-Exons

Exon: 3, 4, 9, 11-13, 18, 19, 21-29, 31-33, 36, 37, 39, 40, 42-50, 52, 53 je f und r

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	× 35
Annealing	58°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	45 Sekunden	
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

Exon: 1f + 2-IR, 5f-neu, 17f-neu + 17-neu2-r, 34 f + r, 41f + 41r-neu

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	× 35
Annealing	56°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	45 Sekunden	
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

Exon: 6, 7, 8, 10, 14, 20, 38, 51 je f-neu und r-neu

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	× 35
Annealing	62°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	45 Sekunden	
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

Exon: 15-16, 30, 35 je f-neu und r-neu

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	× 35
Annealing	64°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	45 Sekunden	
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

A.9. PCR-Zyklen der einzelnen *TMEM67*-Exons

Exon: 2-4, 7-10, 12-15, 17-20, 22, 24-26

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	× 30
Annealing	55°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	30 Sekunden	
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

Exon:1,11,16, 21

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	× 30
Annealing	60°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	45 Sekunden	
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

Exon: 5-6, 23

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	× 35
Annealing	52°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	45 Sekunden	
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

Exon:27, 28

Prädenaturierung	95°C	5 Minuten	
Denaturierung	95°C	30 Sekunden	× 35
Annealing	50°C	30 Sekunden	
Elongation	72°C	30 Sekunden	
Elongation (Abschluss)	72°C	7 Minuten	
Kühlung	4°C	∞	

A.10. Erklärung zum Ethikantrag

Für die Doktorarbeit wurde ein Ethikantrag gestellt, der am 21.09.2006 genehmigt wurde. Er ist unter dem Aktenzeichen 06-122 zu finden und trägt den Titel „Genetische Ursachen von Kleinhirnfehlbildungen“.