

Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

DOCK6- und *ARHGAP31*-Mutationen bei Adams-Oliver-Syndrom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät

der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von Felix Nils Tilsen
aus Hannover
Magdeburg 2017

Bibliographische Beschreibung:

Tilsen, Felix Nils

DOCK6- und *ARHGAP31*-Mutationen bei Adams-Oliver-Syndrom – 2017 – 51 Bl., 20 Abb., 10 Tbl., 3 Anl.

Kurzreferat:

Das Adams-Oliver-Syndrom ist ursprünglich 1945 als autosomal-dominantes Syndrom mit Aplasia cutis congenita und terminalen Extremitätendefekten beschrieben worden. In den weiteren Untersuchungen kamen über die Jahre noch Cutis marmorata telangiectatica congenita, Herz-Gefäß-Anomalien, neurologische und okuläre Anomalien als Pathologien bei beschriebenen Fällen hinzu. Auch wurden vermehrt autosomal-rezessive Fälle beschrieben. Southgate *et al.* berichteten 2011 bei autosomal-dominanten Fällen über Mutationen im *ARHGAP31*-Gen und kurz darauf wurden von Shaheen *et al.* Mutationen im *DOCK6*-Gen für autosomal-rezessive Fälle gefunden. Aufgrund dieser Publikationen wurden im Rahmen dieser Dissertation bei 41 unabhängigen Fällen mit Adams-Oliver-Syndrom diese Gene untersucht. Es konnten bei drei Patienten biallelische Mutationen im *DOCK6*-Gen gefunden werden, davon drei neue Mutationen. Zwei der Patienten, welche jeweils konsanguine Eltern hatten, zeigten homozygote Mutationen und der dritte Patient von nicht verwandten Eltern zwei compound-heterozygote Mutationen. Phänotypisch zeigten sich bei allen drei Patienten zusätzlich zu den pathognomonischen Merkmalen des Adams-Oliver-Syndroms schwere neurologische und okuläre Pathologien wahrscheinlich vaskulärer Genese. Mutationen in *ARHGAP31* konnten in der Patientenkohorte nicht gefunden werden. Die Assoziation von zerebralen und okulären Veränderungen mit dem Adams-Oliver-Syndrom wurde bereits 1995 durch Orstavik *et al.* beschrieben und 2011 durch Snape *et al.* in einer Übersichtsarbeit gehäuft bei autosomal-rezessiven Fällen gefunden. Unsere Ergebnisse, gemeinsam mit weiterer Literatur, deuten nun daraufhin, dass *DOCK6*-Mutationen signifikant mit dem „Orstavik-Typ“ des Adams-Oliver-Syndroms assoziiert sind.

Schlüsselwörter:

Adams-Oliver-Syndrom, AOS, *DOCK6*, *ARHGAP31*

Inhalt

1 Einführung	1
1.1 Adams-Oliver-Syndrom.....	1
1.2 <i>ARHGAP31</i>	4
1.3 <i>DOCK6</i>	6
1.4 Ziele der Arbeit.....	8
2 Material und Methoden.....	9
2.1 Patienten.....	9
2.1.1 Patientenkollektiv.....	9
2.1.2 Auswahl für die Sequenzierung.....	10
2.2 Methoden	12
2.2.1 DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung.....	12
2.2.2 Genomische DNA-Amplifikation	12
2.2.3 PCR	13
2.2.4 Gelelektrophorese	15
2.2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte	16
2.2.6 Sequenzierung.....	17
2.2.7 Aufreinigung und Auswertung der Sequenzierung.....	18
2.2.8 Untersuchungen auf RNA-Ebene.....	19
2.2.9 Validierung der Ergebnisse	19
2.3 Material	21
2.3.1 Reagenzien und Geräte.....	21
2.3.2 Lösungen	23
2.3.3 Software und Datenbanken	23
2.3.4 Primer-Design	24
3 Ergebnisse.....	25
3.1 Etablierung des PCR-Protokolls und der Primer.....	25
3.2 Ergebnisse der Sequenzierungen	27
3.3 Patienten und Mutationen	30
3.3.1 Patient 1	30
3.3.2 Patient 2	34
3.3.3 Patient 3	36
3.4 Vergleich der Symptome bei Patienten mit <i>DOCK6</i> -Mutationen.....	39
4 Diskussion.....	41
4.1 Beurteilung der Ergebnisse für <i>DOCK6</i> und <i>ARHGAP31</i>	41
4.2 Beurteilung der einzelnen Mutationen	44

4.3 Beurteilung des mit <i>DOCK6</i> -Mutationen assoziierten Phänotyps und Auswirkungen auf die Diagnostik.....	46
4.4 Schädigungsmuster und pathophysiologische Überlegungen zum <i>DOCK6</i> -assoziierten AOS	49
5 Zusammenfassung	50
6 Literaturverzeichnis.....	52
7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	55
8 Ehrenerklärung	56
9 Darstellung des Bildungsweges.....	57
10 Anhang	58
10.1 Primertabellen.....	58

Abkürzungsverzeichnis

ACC	Aplasia cutis congenita
<i>AHRGAP31</i>	Gen: Rho GTPase-activating protein 31
AOS	Adams-Oliver-Syndrom
bp	Basenpaare
°C	Grad Celsius
cCT	craniale Computertomographie
CDC42	Protein: cell division cycle 42
cDNA	komplementäre DNA, engl.: complementary
cm	Zentimeter (centi, 10^{-2})
CMTC	Cutis marmorata telangiectatica congenita
ddH ₂ O	hochaufgereinigtes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure, engl.: deoxyribonucleic acid
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphate
<i>DOCK6</i>	Gen: dedicator of cytokinesis 6
EEG	Elektroenzephalografie
engl.	Englisch
<i>EOGT</i>	Gen: EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase
FP	engl.: Forward Primer
g	Gramm
GDP	Guanosindiphosphat
GEF	guanidine exchange factors

GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde, engl.: hour
kb	Kilo-Basenpaare (Kilo, 10^3)
l	Liter
M	Molar
m	milli, 10^{-3}
Mb	Mega-Basenpaare (Mega, 10^6)
min	Minute
mol	Mol
MRT	Magnetresonanztomographie
mRNA	Boten-RNA, engl.: messenger RNA
n	nano, 10^{-9}
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay
nt	Nukleotid
p	piko, 10^{-12}
PCR	Polymerase Kettenreaktion, engl.: polymerase chain reaction
RAC1	Protein: RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1
<i>RBPJ</i>	Gen: recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J
RNA	Ribonukleinsäure, engl.: ribonucleic acid
RP	engl.: Reverse Primer
rpm	Umdrehungen pro Minute, engl.: revolutions per minute
sec	Sekunde, engl.: second
TTLD	Terminale Extremitätendefekte, engl.: terminal transverse limb defects

U	Unit
WISH	engl.: Whole-Mount in Situ Hybridization
μ	mikro, 10^{-6}

1 Einführung

1.1 Adams-Oliver-Syndrom

Das Adams-Oliver-Syndrom (AOS) wurde erstmals im Jahre 1945 durch den Pädiater Forrest H. Adams und den Genetiker Clarence P. Oliver beschrieben, die über mehrere Patienten mit einer Symptomkombination von terminalen transversalen Extremitätendefekten (engl.: terminal transverse limb defects – TTLD) sowie Skalpdefekten im Sinne einer Aplasia cutis congenita (ACC) berichteten (Adams & Oliver 1945).

In zuvor publizierten Fällen mit ähnlichen Extremitätendefekten wurden als mögliche Ursachen eine Einschnürung durch die Nabelschnur oder amniotische Bänder, sowie eine Mangelernährung der Mutter während der Schwangerschaft diskutiert. Anders als bei diesen Fällen waren in dem von Adams und Oliver beschriebenen Fall zusätzlich ein Skalpdefekt und eine familiäre Häufung auffällig. Sechs weitere Familienmitglieder waren von ähnlichen Symptomen in unterschiedlicher Schwere betroffen. Die Vererbung konnte über drei Generationen verfolgt werden und stellte sich als autosomal-dominant dar (Adams & Oliver 1945).

Durch die Betrachtung weiterer Fälle bestätigte sich, dass die ACC beim AOS typischerweise in der Mittellinie parietal und okzipital am Haarwirbel als Skalpdefekt auftraten und teilweise auch Defekte des darunterliegenden Schädelknochens aufwiesen. Auch knöcherne Defekte an der anterioren Fontanelle wurden beschrieben, die leicht als erweiterte Fontanelle fehlinterpretiert werden konnten (Snape et al. 2009). Blutungen und Infektionen bei ACC sind laut Bajpai und Pal mit einer Mortalität von 20-55 % assoziiert (Bajpai & Pal 2003).

Die TTLD zeigten sich üblicherweise beidseitig, aber nicht symmetrisch. Es handelte sich zumeist um terminale Verkürzungen der Finger und Zehen, teilweise jedoch bis hin zum Fehlen von ganzen Extremitäten. Proximalere transversale Extremitätendefekte zeigten sich deutlich seltener. Kutane und knöcherne Syndaktylien wurden ebenfalls beobachtet. Als Minimalvariante wurden hypoplastische Finger- und Zehennägel beschrieben.

Über die Jahre wurden weitere Familien mit autosomal-dominant vererbten TTLD und ACC beschrieben. Vermehrt zeigten sich jedoch auch autosomal-rezessive Erbgänge mit den Symptomen von AOS. Hier beschrieben zum Beispiel Klinger und Merlob eine Familie mit zwei betroffenen Kindern gesunder Eltern und ohne weitere Fällen im Stammbaum (Klinger & Merlob 1998). Auch Amor *et al.* berichteten über zwei Geschwister mit ACC und TTLD,

die von gesunden konsanguinen Eltern stammten (Amor et al. 2000). Weiter publizierten Temtamy *et al.* drei konsanguine Familien mit Kindern, welche die typischen AOS-Symptome aufwiesen (Temtamy et al. 2007).

Nach und nach wurde das klinische Spektrum des AOS durch verschiedene Publikationen erweitert. So beschrieben Burton, Hauser und Nadler beispielsweise eine Familie, in der die Betroffenen zusätzlich eine Cutis marmorata telangiectatica congenita (CMTC) aufwiesen (Burton et al. 1976). Weiterhin wurden in verschiedenen Publikationen Gefäß- und Herzanomalien, sowie neurologische Auffälligkeiten beschrieben (Kuster et al. 1991, Fryns et al. 1996).

Snape *et al.* veröffentlichten hierzu eine umfangreiche Übersicht, die aufzeigte, dass 20 % der Betroffenen CMTC und ebenfalls 20 % angeborene Herz- und Gefäßmalformationen haben. Zu diesen Anomalien zählen Fallot-Tetralogie, Atriumseptumdefekte, Ventrikelseptumdefekte, Aortenisthmusstenosen, Klappenvitien, hypoplastische Ventrikel und der persistierende Ductus arteriosus. Die Gefäßanomalien reichten von hypoplastischen Arteriae cerebri mediae, fehlenden Portalvenen, Gefäßanomalien in den unteren Extremitäten bis hin zu pulmonaler Hypertension (Snape et al. 2009).

Neurologische Auffälligkeiten wurden in den autosomal-dominanten Fällen seltener beobachtet als bei autosomal-rezessiver Vererbung. Sie umfassten vor allem Entwicklungsverzögerungen und mentale Retardierung. Anatomisch fielen hierbei oft eine Mikrozephalie sowie verschiedene intrakranielle Anomalien (z.B. Verkalkungen, Substanzdefekte, Hydrozephalus) auf. Zusätzlich zeigten manche Patienten (ebenfalls überwiegend aus autosomal-rezessiven Familien) Veränderungen der Augen, wie Mikrophthalmie, retinale Falten und Zapfen-Stäbchen-Dystrophien, welche teilweise eine komplette Blindheit zur Folge hatten. Die Kombination der typischen AOS-Merkmale mit neurologischen und okulären Symptomen bei zwei Geschwistern wurde von Orstavik *et al.* erstmals als möglicher Subtyp des AOS diskutiert (Orstavik et al. 1995). In einer Übersichtsarbeit wurde vom „Orstavik-Typ“ des AOS gesprochen (Snape et al. 2009).

Die Beobachtung, dass die neurologischen Auffälligkeiten vermehrt bei autosomal-rezessiven Erbgängen auftreten deckte sich mit den Beschreibungen von Amor *et al.* und Temtamy *et al.*, deren Patienten auch solche Symptome aufwiesen (Amor et al. 2000, Temtamy et al. 2007).

Die Art der Kopfhaut- und Extremitätendefekte, die Assoziation mit Gefäß- und Herzanomalien sowie die Tatsache, dass in den Fällen mit neurologischer Beteiligung bei

Magnetresonanztomographie-Untersuchungen (MRT) des Gehirns periventrikuläre Kalzifikationen und Leukomalazien ähnlich den frühkindlichen ischämischen Veränderungen beobachtet wurden, bestärkte die Annahme, dass das AOS eine Störung der Vaskulogenese zur Grundlage hat (Der Kaloustian et al. 1991, Toriello et al. 1988, Snape et al. 2009).

Zu Beginn dieser Arbeit waren durch die Publikationen von Southgate *et al.* und Shaheen *et al.* zwei Gene für AOS bekannt. Zum einen *ARHGAP31* (Rho GTPase activating protein 31) für ein autosomal-dominant vererbtes AOS (AOS1, MIM: #100300) und zum anderen *DOCK6* (dedicator of cytokinesis 6) für eine autosomal-rezessive Form (AOS2, MIM: #614219) (Southgate et al. 2011, Shaheen et al. 2011). Für beide Gene waren jeweils nur zwei Familien mit Mutationen beschrieben. Im Verlauf der Arbeiten für die vorliegende Dissertation wurden noch die Gene *RBPJ* (recombination signal binding protein for immunoglobulin kappa J) durch Hased *et al.*, *NOTCH1* durch Stittrich *et al.* und *DLL4* durch Meester *et al.* für das autosomal-dominant vererbte AOS sowie *EOGT* (EGF domain-specific O-linked N-acetylglucosamine transferase) für eine zweite autosomal-rezessive Form durch Shaheen *et al.* publiziert (Hased et al. 2012, Stittrich et al. 2014, Shaheen et al. 2013, Meester et al. 2015). Diese neueren Gene spielten für die molekulargenetischen Analyse im Rahmen der vorliegenden Arbeit keine Rolle.

1.2 ARHGAP31

Das *ARHGAP31*-Gen (MIM: *610911) liegt beim Menschen auf dem Chromosom 3q13.33 und hat bei 4335 kodierenden Basen 12 Exons (Kent et al. 2002, Yates et al. 2016).



Abbildung 1: Exon-Intron-Struktur des *ARHGAP31*-Gens (Transkript *ARHGAP31-001*; ENSEMBL 86)

Verteilung der Introns und Exons von *ARHGAP31* (Yates et al. 2016)

ARHGAP31 gehört zu der Familie der RhoGAP, der Rho GTPase-aktivierenden Proteine. Rho GTPasen, zu denen unter anderem die Proteine cell division cycle 42 (CDC42) und RAS-related C3 botulinum toxin substrate 1 (RAC1) zählen, fungieren als molekulare „Schalter“ in verschiedenen Signalkaskaden, indem sie zwischen einer aktiven GTP-gebundenen und einer inaktiven GDP-gebundenen Form wechseln. Sie sind wichtige Regulatoren bei der Zellteilung, dem Überleben der Zellen und der Zellmigration (Vega & Ridley 2008). Weiter spielen sie eine wichtige Rolle bei der Regulation des Zytoskeletts, der Zellproliferation, der Polarisierung, der Adhäsion sowie bei der Apoptose und Phagozytose (Ridley et al. 1992, Tapon & Hall 1997).

ARHGAP31 als GTPase-aktivierendes Protein für Rho GTPasen bewirkt die Rückkehr dieser Signalmoleküle in den inaktiven Zustand, indem es deren schwache intrinsische GTPase-Aktivität steigert und so die Umwandlung des gebundenen GTP in GDP bewirkt. *ARHGAP31* sorgt somit für eine Hemmung der Aktivität von CDC42 und RAC1. Southgate *et al.* zeigten in ihrer Arbeit mit Whole-Mount in Situ Hybridization (WISH) an Mäusen, dass die stärkste Expression des Gens im entwickelnden Herzen stattfindet, was in Abbildung 2 zu erkennen ist (Southgate et al. 2011). Auch die apikalen Regionen des Kopfes und die Hände und Füße wiesen bei den Embryonen eine hohe Expression auf (Southgate et al. 2011). Dieses Expressionsmuster passt zur Lokalisation der klinischen Manifestationen beim AOS.

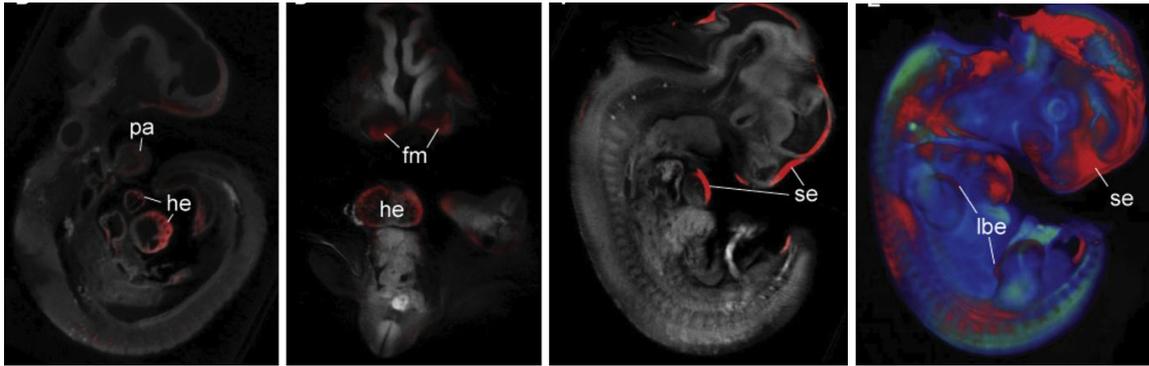


Abbildung 2: Expression von *ARHGAP31* mRNA in Mausembryonen.

Kiembogen (pa), entwickelndes Herz (he), Gesichtsmesenchym (fm), oberflächliches Ektoderm (se), obere und untere Extremitätenansätze (lbe) entnommen aus der Publikation von Southgate *et al.* mit freundlicher Genehmigung des Verlags (Southgate *et al.* 2011)

Southgate *et al.* untersuchten Familien mit autosomal-dominanter Vererbung von ACC und Extremitätendefekten. Über eine genomweite Kopplungsanalyse und nachfolgende Sequenzierung positioneller Kandidatengene wurden in zwei Familien *ARHGAP31*-Mutationen gefunden (c.2047C>T und c.3260delA), welche zu vorzeitigen translationalen Stopp-Codons führten (p.(Gln683*) und p.(Lys1087Serfs*4)). Weiterführende Untersuchungen zeigten, dass die mutierte mRNA nicht durch den Nonsense-mediated decay (NMD) entfernt wird. Es wurden dominante gain-of-function-Effekte postuliert. Funktionelle Analysen belegten diese verstärkte Hemmung von CDC42 und RAC1. Fibroblasten, die diese Mutationen trugen, zeigten eine stark verminderte Zellproliferationsrate. Auch Heilungsstörungen von Gewebe wurden bei den mutierten Fibroblasten in Zellmigrations-Assays beobachtet und konnten durch die veränderte Zellmigration erklärt werden (Southgate *et al.* 2011).

Weiter führte ein Knockout von RAC1 in Mausembryonen zu schweren Extremitätendefekten und andere Experimente zeigten, dass die permanente Inaktivierung von CDC42 den negativen Feedback-Effekt auf das mutierte *ARHGAP31* beeinträchtigte und es so verstärkt hochregulierte (Southgate *et al.* 2011).

Diese Ergebnisse legen nahe, dass die gefundenen Mutationen tatsächlich Entwicklungsstörungen bewirken, die sich mit dem klinischen Bild von AOS decken und autosomal-dominant vererbt werden (Southgate *et al.* 2011).

1.3 DOCK6

Das Gen *DOCK6* (MIM: *614194) befindet sich beim Menschen auf dem Chromosom 19p13.2 und enthält 48 kodierende Exons mit 6144 Basen (Kent et al. 2002, Yates et al. 2016).

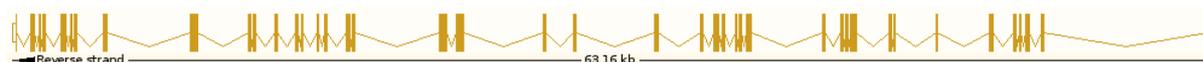


Abbildung 3: Exon-Intron-Struktur des *DOCK6*-Gens (Transkript *DOCK6-001*; ENSEMBL 86)

Verteilung der Introns und Exons von *DOCK6* (Yates et al. 2016)

DOCK6 gehört zur Familie der *DOCK*-Gene, welche für atypische „guanidine exchange factors“ (GEF) kodieren. Ähnlich wie ARHGAP31 hat das assoziierte Protein einen Einfluss auf CDC42 und RAC1, aktiviert diese im Gegensatz zu ARHGAP31 jedoch (Shaheen et al. 2011). GEFs beschleunigen den Austausch von GDP in der Bindung an GTPasen durch GTP.

Shaheen *et al.* publizierten im August 2011 zwei Fälle nicht miteinander verwandter Patienten mit klinisch eindeutigem AOS. Der erste Patient hatte bei der Geburt Hand- und Fußdefekte sowie eine große ACC. Später zeigten sich eine mentale Entwicklungsverzögerung, eine Optikusatrophie, eine Mikrozephalie sowie Ventrikelerweiterungen im MRT. Der zweite Patient hatte ebenfalls ACC und TTLD sowie eine Mikrozephalie und fiel durch eine verzögerte Sprachentwicklung auf. Beide Kinder hatten konsanguine gesunde Eltern und gesunde Geschwister. Die Vererbung stellt sich daher als autosomal-rezessiv dar (Shaheen et al. 2011).

Durch Homozygotie-Kartierung und nachfolgende Kandidatengen-Sequenzierung wurden bei den Indexpatienten beider Familien homozygote „trunkierende“ *DOCK6*-Varianten gefunden (c.1362_1365delAACT, p.(Thr455Serfs*24) bzw. c.1245dupT, p.(Asp416*)). Die Art der Veränderungen legte nahe, dass es sich dabei um loss-of-function Mutationen handelte. Dieses passt zu dem in der Publikation von Southgate *et al.* Postulierten pathogenetischen Konzept, da der Funktionsverlust von *DOCK6* als Aktivator von CDC42 und RAC1 somit auch zu einer geringeren Aktivierung dieser Rho GTPasen führt (Shaheen et al. 2011).

Die Expression von DOCK6 wurde auch in dieser Arbeit per WISH an Mausembryonen untersucht und es zeigte sich eine verstärkte Ausprägung in den Extremitätenknospen, dem sich entwickelnden Herzen sowie dem ersten Kiemenbogen (Shaheen et al. 2011). Dieses ist in Abbildung 4 erkennbar (Shaheen et al. 2011).

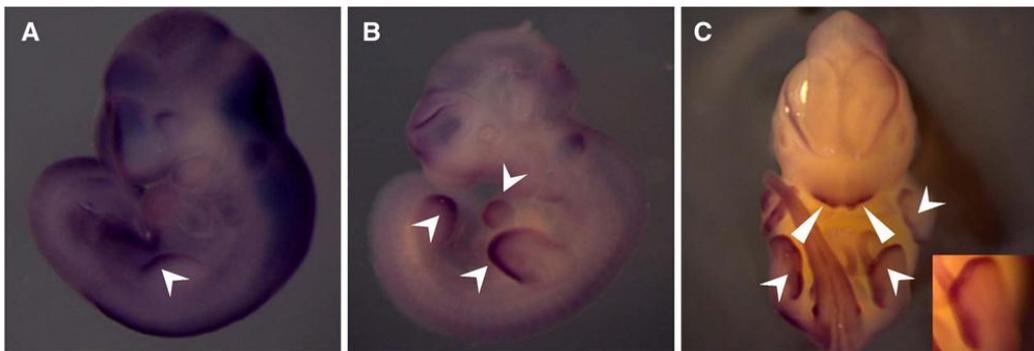


Abbildung 4: Expression von DOCK6 in Mausembryonen.

(A) Mausembryo mit Expression von an den wachsenden Enden der oberen Extremitätenansätze; (B) Zusätzlich Expression am entwickelnden Herzen und unteren Extremitätenansätze; (C) Expression nun auch an dem ersten Kiemenbogen. Entnommen aus der Publikation von Shaheen *et al.* mit freundlicher Genehmigung des Verlags (Shaheen et al. 2011)

Auch in diesem Fall liegt es nahe, dass die gefunden Mutationen für die in diesem Fall autosomal-rezessiv vererbte Form des AOS bei den betroffenen Kindern verantwortlich ist.

1.4 Ziele der Arbeit

Ziel der Arbeit war es, in einer eigenen Kohorte von 41 AOS-Patienten in den beiden damals bekannten Genen *ARHGAP31* und *DOCK6* weitere Mutationen zu finden und die Bedeutung dieser Gene als Ursache eines AOS in einer größeren Patientenkohorte zu ermitteln. Die Ergebnisse dieser größeren Gruppe sollten die Aussagen der beiden Publikationen von Southgate *et al.* und Shaheen *et al.* untermauern und die Vermutung, dass AOS durch Mutationen in diesen beiden Genen, deren Proteine beide auf CDC42 und RAC1 wirken, entsteht, festigen. Das Mutationsspektrum in diesen Genen sollte durch das Auffinden neuer Mutationen erweitert und analysiert werden. Des Weiteren sollte die klinische Symptomatik bei eventuellen Mutations-positiven Patienten mit den publizierten Fällen verglichen werden, um mögliche Genotyp-Phänotyp-Korrelationen zu analysieren.

2 Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patientenkollektiv

Das Patientenkollektiv umfasste insgesamt 41 nicht miteinander verwandte Patienten, die als Einschlusskriterien mindestens eine ACC und TTLD aufweisen mussten. Blut oder bereits extrahierte DNA-Proben der Indexpatienten und in vielen Fällen auch der Eltern und ggf. Geschwister waren von Professor Zenker am Humangenetischen Institut des Universitätsklinikums Erlangen bzw. am Institut für Humangenetik des Universitätsklinikums Magdeburg über mehrere Jahre gesammelt worden. Sie wurden von Klinikern und kooperierenden humangenetischen Einrichtungen für die Erforschung der genetischen Grundlagen des AOS zur Verfügung gestellt. Am Humangenetischen Institut des Universitätsklinikums Erlangen waren bereits vorab in mehreren Familien Untersuchungen mit SNP-Arrays zur Homozygotie-Kartierungen vorgenommen worden. Beschreibungen des Stammbaums und der klinischen Symptomatik bei den Betroffenen lagen von allen Studienpatienten vor, von einigen auch Fotos und weitere Hintergrundinformationen.

Weiter ist zu erwähnen, dass für dieses Patientenkollektiv verstärkt Fälle mit vermutlich rezessiver Vererbung gesammelt worden waren, was bei der statistischen Betrachtung zu berücksichtigen ist.

Alle Patienten, beziehungsweise deren Eltern oder Sorgeberechtigte, hatten die Einwilligung zu wissenschaftlichen Experimenten an ihrem Material, sowie der Publikation der Ergebnisse zugestimmt. Die Untersuchungen waren durch die Ethikkommissionen des Universitätsklinikums Erlangen und ggf. die der kooperierenden Einrichtungen genehmigt worden.

2.1.2 Auswahl für die Sequenzierung

Das Patientenkollektiv wurde aufgrund der möglichen Vererbungsmusters eingeteilt, um zu entscheiden, welches der beiden Gene bei welchem Patienten sequenziert werden soll (siehe Abbildung 5).

Patienten aus Familien mit eindeutig rezessiver Vererbung (ein oder mehrere betroffene Kinder gesunder Eltern mit oder ohne elterliche Konsanguinität, n = 16), wurden nur hinsichtlich möglicher Mutationen des *DOCK6*-Gens untersucht. Bei Einzelfällen aus konsanguinen Familien, bei denen vermutlich eine rezessive Vererbung vorlag, wurde das *DOCK6*-Gen analysiert.

Sporadische AOS-Fälle ohne elterliche Konsanguinität wurden sowohl hinsichtlich möglicher Veränderungen in *DOCK6* als auch in *ARHGAP31* untersucht.

Bei Patienten aus Familien mit autosomal-dominanter Vererbung (Transmission von einem Elternteil zu einem oder mehreren Kindern, n = 2) wurde nur das *ARHGAP31*-Gen untersucht.

Diese Aufteilung deckte sich mit den klinischen Beobachtungen hinsichtlich der Vererbung von *DOCK6*- und *ARHGAP31*-Mutationen. Es ergaben sich 25 Patienten zur Sequenzierung von *DOCK6* und 22 für die Untersuchung von *ARHGAP31*. Ein Patient aus der Gruppe der sporadischen Fälle ohne elterliche Konsanguinität, zeigte bei der Untersuchung eindeutig pathogene Mutationen in *DOCK6* und wurde daher nicht weiter für *ARHGAP31* sequenziert.

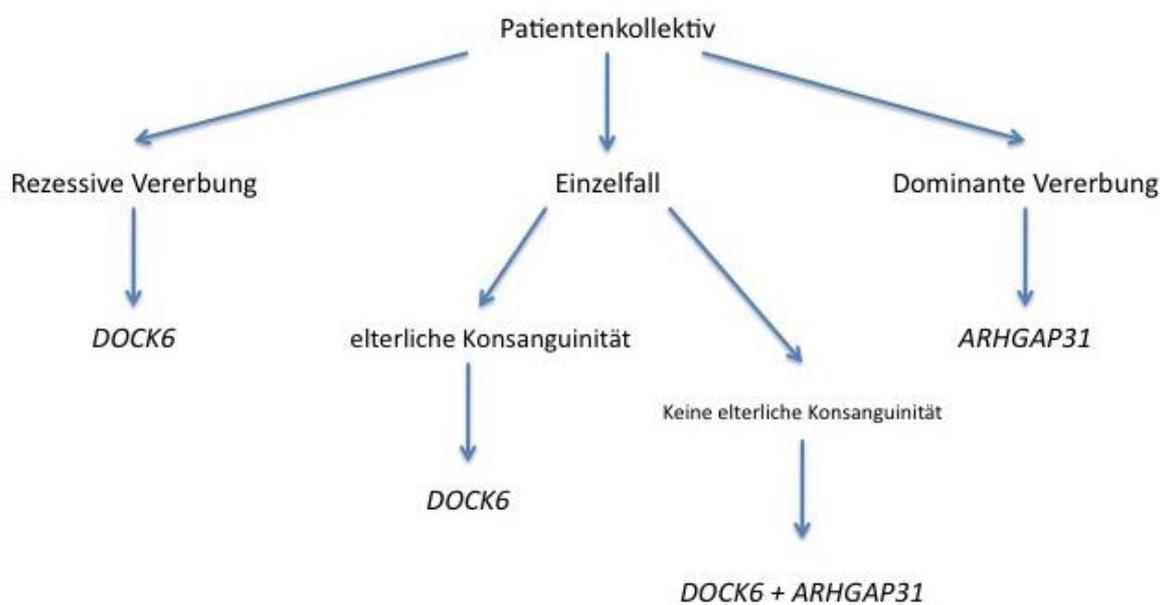


Abbildung 5: Flussschema der Sequenzierung

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Extraktion und Konzentrationsbestimmung

Von vielen Patienten lag bereits Material in Form von DNA vor, welche zuvor in Erlangen oder von den Einsendern selbst aus Blut isoliert wurde. Neue Zusendungen wurden im Institut für Humangenetik in Magdeburg mit dem chemagic DNA Blood Kit (Perkin Elmer; Waltham, Massachusetts, USA) gemäß dem Protokoll des Herstellers isoliert. In diesem Verfahren können aus 1 ml Blut etwa 2-4 µl DNA isoliert werden. Diese enthält dann genomische, mitochondriale und, falls vorhanden, virale DNA. Zur Aufreinigung werden magnetische Beads verwendet und das Produkt anschließend in Elution Buffer gelöst (Chemagen Technologie 2012).

Nach dieser Aufreinigung erfolgte die Messung der DNA-Konzentration mittels NanoDrop Spektralphotometer (Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Dieses misst die Extinktion einer Probe bei verschiedenen Wellenlängen und errechnet so über das Lambert-Beersche Gesetz die Konzentration (Thermo Fisher Scientific 2009).

2.2.2 Genomische DNA-Amplifikation

Einige der zu untersuchenden Proben der Patienten wiesen eine niedrige Konzentration an DNA auf. Um eine ausreichende Menge an DNA für die PCR und anschließende Sequenzierung verwenden zu können, wurde das GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit verwendet. Das hierfür verwendete Protokoll (siehe Tabelle 1) entsprach den Vorgaben von GE Healthcare (Chalfont St Giles, Groß Britannien) (GE Healthcare 2006).

Tabelle 1: GenomiPhi V2 Protokoll

Reaktionsschritt	Protokoll
1. Denaturierung	1 µl DNA (10 ng/µl) + 9 µl Sample buffer 3 min bei 95°C denaturieren, danach auf 4°C abkühlen
2. Amplifikation	9 µl Reaction buffer und 1 µl Enzyme Mix zur Probe geben. Bei 30°C für 1,5 Stunden inkubieren.
3. Inaktivierung der Polymerase	Probe für 10 min auf 65°C erhitzen
4. Abkühlen	Probe auf 4°C abkühlen

Dieses Verfahren beruht auf der Amplifikation der DNA mit zufälligen hexameren Primern, die unspezifisch an der gesamten DNA binden. Mit Hilfe der Phi29 DNA Polymerase wird nun das gesamte in der Probe vorhandene DNA-Material amplifiziert. Man benötigt etwa 10 ng Ausgangsmaterial und erhält laut Protokoll etwa 4-7 µg genomisch amplifizierte, hochmolekulare DNA.

2.2.3 PCR

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR, polymerase chain reaction) zählt heutzutage zu den Standardverfahren der Humangenetik. Hierbei amplifiziert man zur späteren Untersuchung einen speziellen genomischen DNA-Abschnitt mit Hilfe von zwei spezifischen Primern. Diese Primer flankieren hierbei das zu amplifizierende Endprodukt, welches dann unter Verwendung von Desoxyribonukleosidtriphosphaten (dNTPs) und einer hitzestabilen DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase), welche die zur Denaturierung notwendigen Temperaturen aushält, vervielfältigt wird. Die dNTP-Lösung beinhaltet jeweils von Adenosin, Cytosin, Guanosin und Thymin die entsprechenden Nukleosidtriphosphate. Weitere Zusatzstoffe zur Reaktionslösung werden zur Pufferung oder zum Beeinflussen der Schmelzeigenschaften der DNA verwendet. Das Protokoll hierfür war das im Labor standardmäßig verwendete PCR-Protokoll (siehe Tabelle 2).

Der Ablauf der PCR gliedert sich in drei Schritte: Zuerst wird die doppelsträngige DNA zu Einzelsträngen aufgetrennt (Denaturierung). Nun lagern sich die Primer an diese an (Annealing) und die *Taq*-Polymerase beginnt mit der Synthese des komplementären Stranges (Elongation). Somit kann bei jedem Zyklus eine Verdopplung der DNA erreicht werden, was mit einer exponentiellen Steigerung der DNA-Menge des gewünschten Abschnittes einhergeht (siehe Tabelle 3).

Zur Vermeidung der Amplifikation von unerwünschten Nebenprodukten wurde ein Touchdown-Protokoll gewählt. Hierbei blieben die Temperaturen von Denaturierung (94°C) und Elongation (72°C) gleich, die Temperatur des Annealings wurde jedoch von 65° auf 55° im Verlauf abgesenkt. Dadurch wird in den ersten PCR-Zyklen die Spezifität erhöht.

Tabelle 2: Reagenzien der PCR

Reagenzien	Volumen
DNA (50 ng/μl)	0,7μl
ddH ₂ O	5,6 μl
Rxn Puffer (10x)	2 μl
dNTPs (2 mM)	2 μl
FP (2,5 pmol)	2 μl
RP (2,5 pmol)	2 μl
MgCl ₂ (50 mM)	0,6 μl
DMSO (5 %)	1 μl
Betain (5 M)	4 μl
Taq (5 U/μl)	0,1 μl
Volumen	20 μl

Tabelle 3: Reaktionsprotokoll der PCR

Reaktionsschritt	Protokoll
Initiale Denaturierung	94°C, 5 min
Amplifikation	41 Zyklen <i>Denaturierung</i> 94°C, 30 sec <i>Annealing</i> 65°C, 45 sec für 2 Zyklen 63°C, 45 sec für 2 Zyklen 61°C, 45 sec für 2 Zyklen 59°C, 45 sec für 2 Zyklen 57°C, 45 sec für 2 Zyklen 55°C, 45 sec für 31 Zyklen <i>Elongation</i> 72°C, 45 sec
Abschließende Elongation	72°C, 10 min
Abkühlen	4°C, unendlich

2.2.4 Gelelektrophorese

Der Erfolg der PCR wurde mit Hilfe von Agarose-Gelelektrophorese überprüft. In diesem Verfahren wandern die durch die Phosphatgruppen negativ geladenen DNA-Stränge durch ein elektrisches Feld im Gel zur Anode. Auf ihrem Weg werden sie durch ein Geflecht von langen Polymerketten des Agarosegels ihrer Größe nach aufgetrennt. Bei korrekt stattgefundenener PCR bildet sich hier eine scharf begrenzte Bande an einer von der Größe des PCR-Fragments abhängigen Position, die mit einem Längenstandard verglichen werden kann. Die Referenzwerte werden durch den Längenstandard Fermentas 100 bp DNA ladder (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) gegeben, welcher 15 Banden mit einer Reichweite von 100 bp bis 1500 bp erzeugt. Das Fehlen einer Bande im Produkt sprach für ein Fehlschlagen / Ineffizienz der PCR, doppelte Banden oder unscharfe Begrenzungen für eine unspezifische Amplifikation von DNA.

Die DNA-Proben wurden zusammen mit einem Loading buffer auf dem Gel aufgetragen. Es wurde ein 2 %-Agarosegel verwendet. Dieses setzte sich zusammen aus 4 g Agarose, 40 ml 5x TBE-Puffer, 160 ml destilliertem Wasser und 20 µl Ethidiumbromid. Letzteres interkaliert zwischen den Basenpaaren der DNA. Hierdurch wird sein Anregungsspektrum so verändert, dass es bei Bestrahlung mit ultraviolettem Licht durch eine leuchtende Bande die Lage der DNA im Gel anzeigt. Die Gelbilder wurden mit der DeVision DBOX mit UV Transilluminator aufgenommen und elektronisch gespeichert bzw. ausgedruckt.

2.2.5 Aufreinigung der PCR-Produkte

Um das erzeugte PCR-Produkt weiter verwenden zu können, musste es von den zusätzlichen Bestandteilen im Reaktionsansatz gereinigt werden. Hierbei wurden die überzähligen Primer, Salze, Nukleotide und Enzyme mittels der Agencourt AMPure XP-Methode entfernt. Die einzelnen Schritte werden hierbei von einem Pipettier-Roboter (Biomek NXp Laboratory Automation Workstation / Beckman Coulter; Brea, CA, USA) automatisch durchgeführt.

Das Verfahren, welches auf Abbildung 6 aus dem Benutzerhandbuch von Agencourt Bioscience Corporation zu sehen ist, gliedert sich in sechs Schritte (Agencourt Bioscience Corporation 2009). Im ersten Schritt (1) werden 1,8 µl AMPure XP pro 1 µl PCR-Produkt hinzugefügt, wodurch sich die enthaltenen paramagnetischen Beads im zweiten Schritt (2) an die PCR-Produkte binden. Dieser Komplex aus Beads und DNA wird nun magnetisch separiert (3) und anschließend wird das Gefäß zweimal mit 70 % Ethanol gereinigt (4). Nun wird hochaufgereinigtes Wasser verwendet, um durch die pH-Änderung die DNA von den Beads zu lösen (5) und anschließend in ein neues Gefäß zu überführen (6).

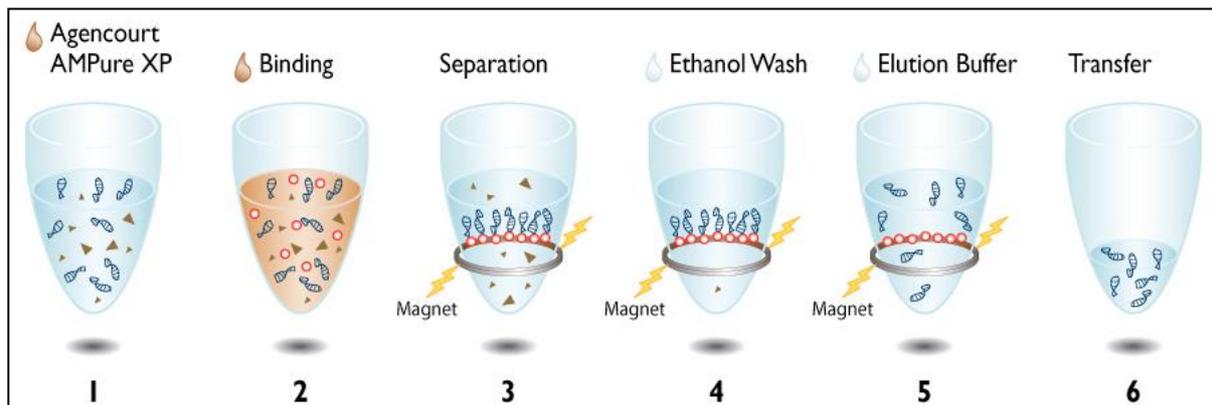


Abbildung 6: Aufreinigung des PCR-Produkts.

Schematische Darstellung der sechs Schritte nach dem Protokoll des Herstellers (Agencourt Bioscience Corporation 2009)

2.2.6 Sequenzierung

Um nun die DNA-Sequenz der erzeugten PCR-Produkte analysieren zu können, wurde das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit verwendet. Dieses Kit arbeitet nach einer weiterentwickelten Methode des von Sanger *et al.* beschriebenen Kettenabbruch- und Didesoxynucleotidverfahrens (Sanger et al. 1992).

Ähnlich wie bei der PCR wird die doppelsträngige DNA in diesem Prozess denaturiert, und anschließend mit Hilfe von Primern, einer Polymerase und Nukleotiden ein neuer komplementärer Strang gebildet. Der Unterschied in den beiden Verfahren ist jedoch, dass zum einen der neu synthetisierte Strang unidirektional, also nur in eine Richtung, gebildet wird, da nur wahlweise ein Vorwärts- oder ein Rückwärtsprimer verwendet werden, und zum Anderen zu den dNTPs noch zusätzlich Didesoxyribonukleosidtriphosphate (ddNTPs) enthalten sind. Diese ddNTPs haben am 3'-Ende keine Hydroxylgruppe, was dazu führt, dass keine weitere Phosphodiesterbindung gebildet werden kann und die Synthese des Stranges abbricht. Des Weiteren sind die ddNTPs mit verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen spezifisch markiert, die bei der späteren Auswertung die Base identifizieren. Die Sequenzierungsreaktion wurde in einem speziellen Fast-Cycler (Veriti 96 well Fast Thermal Cycler / Applied Biosystems; Foster City, CA, USA) mit dem unten genannten Standardprotokoll des Labors durchgeführt (siehe Tabellen 4 und 5).

Tabelle 4: Reagenzien der Sequenzierungsreaktion

Reagenzien	Volumen
H ₂ O	2,65 µl
Puffer	1,0 µl
BigDye	0,25 µl
Volume	3,9 µl

Tabelle 5: Reaktionsprotokoll der Sequenzierungsreaktion

Reaktionsschritt	Protokoll
Amplifikation	26 Zyklen <i>Denaturierung</i> 98°C, 10 sec <i>Annealing</i> 55°C, 10 sec <i>Elongation</i> 60°C, 60 sec
Abkühlen	10°C, unendlich

2.2.7 Aufreinigung und Auswertung der Sequenzierung

Um die in der Sequenzierungsreaktion gewonnenen Produkte auswerten zu können, müssen auch diese wieder aufgereinigt werden. Hierfür wurde die auf Abbildung 7 aus dem Benutzerhandbuch von Agencourt Bioscience Corporation gezeigte Agencourt CleanSEQ-Methode verwendet (Agencourt Bioscience Corporation 2006). Sie funktioniert nach demselben Prinzip wie die Aufreinigung der PCR. Paramagnetische Beads binden an das gewünschte Produkt um dieses im Well zu behalten und die restlichen Bestandteile zu entfernen. Die Pipettierschritte erfolgten wiederum am Pipettier-Roboter.

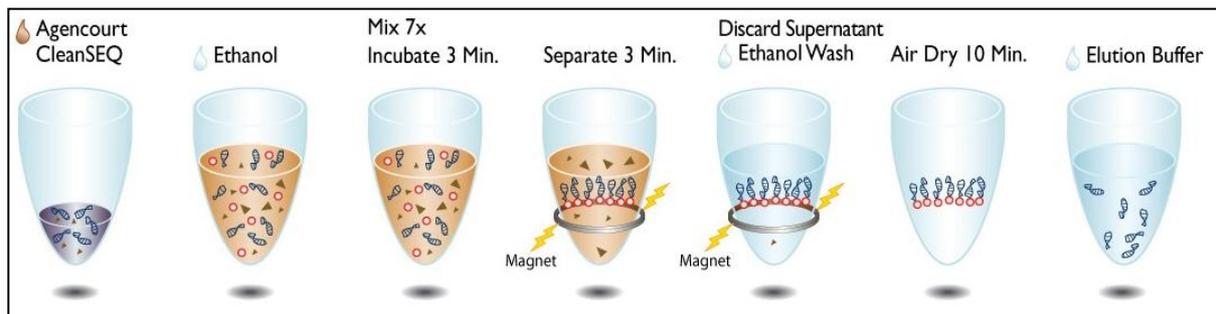


Abbildung 7: Aufreinigung des Sequenzierungsprodukts

Schematische Darstellung des Verfahrens nach dem Protokoll des Herstellers (Agencourt Bioscience Corporation 2006)

Nach dieser Aufreinigung wurde das Reaktionsprodukt im Sequenzierautomaten ABI3500XL capillary sequencer von Applied Biosystems (Foster City, CA, USA) ausgewertet. Dies funktionierte, indem das fluoreszenzmarkierte Produkt durch Elektrophorese in einer gelgefüllten Kapillare nach der Fragmentlänge aufgetrennt wurde. Da die vorhandenen ddNTPs durch die fehlende Hydroxylgruppe die Stränge an unterschiedlichen Stellen abgebrochen haben, existieren Produkte unterschiedlicher Länge mit jeweils einem spezifischen ddNTP am Ende. Diese können während des Prozesses an einem Laser und Detektor vorbeigeführt werden. Die angeregten Fluoreszenzfarbstoffe offenbarten so durch ihre spezifische Wellenlänge die letzte Base des Stranges einer bestimmten Nukleotidanzahl.

Die nacheinander gemessenen Fluoreszenzwerte wurden als Rohdaten gespeichert, um diese später auswerten zu können. Für diese Auswertung wurde das Programm Sequence Pilot v4.0.1 der JSI medical systems GmbH (Ettenheim, Deutschland) verwendet. Als Referenzsequenzen diente für *ARHGAP31* das Transkript mit der Ensemble-ID ENST00000264245 und für *DOCK6* ENST00000294618 (Yates et al. 2016).

2.2.8 Untersuchungen auf RNA-Ebene

Um die Auswirkungen einer Splice Site Mutation auswerten zu können, wurde mit Hilfe des PAXgene Blood RNA Kits (PreAnalytix RNA) die RNA aus dem Blut des Patienten isoliert. Anschließend wurde das Superscript III First-Strand Synthesis System von Invitrogen (Carlsbad, CA, USA) verwendet um die gewonnene RNA in eine cDNA umzuschreiben. Um spezifisch nur die cDNA in der anschließenden PCR zu vervielfältigen, wurden Primer ausgewählt, die auf Übergängen der einzelnen benachbarten Exons lagen. Die gewonnene Sequenz wurde nun mit der cDNA-Vorlage (*DOCK6*, ENST00000294618) manuell auf teilweise oder ganz fehlende Exons verglichen. Es wurden die verwendeten Methoden gemäß der Protokolle des Herstellers durchgeführt.

2.2.9 Validierung der Ergebnisse

Bei der Auswertung der erhaltenen Sequenzen im Sequenz Pilot wurden Auffälligkeiten zuerst mit der dbSNP-Datenbank (Kitts et al. 2014) sowie dem ExAC-Browser (Lek et al. 2016) verglichen. Anschließend wurden die Veränderungen weiter mit dem Prädiktionsprogramm MutationTaster (Schwarz et al. 2010) auf ihre mögliche krankheitsverursachende Wirkung überprüft. Auch die Programme MutPred (Li et al. 2009) und PolyPhen-2 (Adzhubei et al. 2010) wurden zur weiteren Überprüfung verwendet. Diese Programme verwenden unterschiedliche Algorithmen, um die Auswirkung einer Sequenzveränderung auf die Genfunktion vorherzusagen. Sie bewerten unter anderem Art eines Aminosäureaustausches, evolutionäre Konservierung der Aminosäureposition, und mögliche Änderungen in Struktur und Funktion des endgültigen Proteins sowie zusätzlich das Auswirkungen auf das Spleißen bei dem MutationTaster.

Der ExAC-Browser vergleicht gefundene Mutationen mit einer Datenbank, welche die Informationen der Exom-Sequenzierungen von über 60.000 Menschen beinhaltet und gibt mit der Allelfrequenz an, wie oft die gesuchte Veränderung in dieser Population gefunden wurde. Hierbei unterscheidet er nochmals in hetero- und homozygot (Lek et al. 2016). Da es sich bei AOS um eine sehr seltene Erkrankung handelt, würde man erwarten, dass pathogene Mutationen in der Referenzpopulation nicht oder in nur sehr geringer Häufigkeit auftreten. Bei einem dominanten Erbgang (*ARHGAP31*) würden mehr als zwei Beobachtungen einer in Frage stehenden Variante in einer Referenzpopulation dieser Größe ein starkes Argument

gegen eine Pathogenität darstellen, bei einem rezessiven Erbgang (*DOCK6*) mehr als 20 heterozygote bzw. eine oder mehr homozygote Beobachtungen. .

Die Werte von MutationTaster geben die Wahrscheinlichkeit an, mit der die Vorhersage zutreffen sollte, in unserem Fall also die Wahrscheinlichkeit mit der die Mutation krankheitsverursachend ist (Schwarz et al. 2010). Bei MutPred zeigt ein Wert von 0.750 – 1.000 eine hohe Wahrscheinlichkeit einer krankheitsverursachenden Mutation, ein Wert von 0.500 – 0.749 eine mittlere und ein Wert von 0.000 – 0.499 eine geringe Wahrscheinlichkeit (Li et al. 2009). PolyPhen-2 gibt mit einem Wert von >0.909 eine wahrscheinlich schädliche Mutation, mit 0.447 – 0.908 eine möglicherweise schädliche Mutation und mit ≤ 0.446 eine nicht krankheitsverursachende Mutation an (Adzhubei et al. 2010).

Eine weitere Grundlage der Validierung war die Segregation und Vererbung in der Familie im Zusammenhang mit dem Auftreten der klinischen Symptome.

Für die Prädiktion der Auswirkungen von Splice Site Mutationen wurden die Programme NetGene2 (Brunak et al. 1991) und BDGP (Berkeley Drosophila Genome Project) (Reese et al. 1997) verwendet. Die vorhergesagten Auswirkungen auf das Spleißen konnten für eine Veränderung an der cDNA des Patienten experimentell überprüft werden (siehe Kapitel 2.2.8).

2.3 Material

2.3.1 Reagenzien und Geräte

Reagenzien und Lösungen:

Reagenz	Hersteller
Agencourt AMPure XP	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Agencourt CleanSEQ	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Betaine 5M	Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA
Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Borsäure 100 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
chemagic DNA Blood100 Kit	PerkinElmer Inc., Waltham, MA, USA
DMSO 5 %	Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA
dNTP Set 100 mM	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
EDTA Disodium Salt Dihydrate	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Ethanol 100 %	Zentralapotheke Universitätsklinik Magdeburg, Deutschland
Ethidium bromide	Boehringer Mannheim, Mannheim, Deutschland
Fermentas 100 bp DNA ladder	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Ficoll 400	Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit	GE Healthcare, Little Chalfont, UK
Orange G	Chemapol, Prag, Tschechische Republik
PAXgene™ 96 Blood RNA Kit	PreAnalytiX GmbH, Hombrechtikon, Schweiz
SuperScript III First-Strand Synthesis System for RT-PCR	Life Technologies GmbH, Darmstadt, Deutschland
<i>Taq</i> DNA Polymerase Recombinant (Kit mit <i>Taq</i> DNA Polymerase, Rxn Puffer und MgCl ₂ 50 mmol)	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
<i>Taq</i> Platinum DNA Polymerase Recombinant	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe; Deutschland
UltraPure™ Agarose	Invitrogen, Carlsbad, CA, USA

Geräte:

Name	Hersteller
8-Kanal-Pipette m10 0,5-10 µl	Biohit, Helsinki, Finnland
24-capillary 3500xL Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
96 Multiply PCR plate	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96 well Multiply Fast-PCR plate	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Adhesive Plate Seals	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
Agencourt SPRIPlate	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Biomek NXp Laboratory Automation Workstation	Beckman Coulter, Brea, CA, USA
Combitips plus 0,1 ml und 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Consort Mini Electrophoresis Power Supply E143	Sigma Life Science, St. Louis, MO, USA
DeVision DBOX mit UV Transluminator	Decon ScienceTec, Hohengandern, Deutschland
Heraeus Labofuge 400	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
MicroAmp Optical 96 well-reaction plate	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Milli Q Reference Ultrapure Water Purification System	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
miniSpin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipette stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
NanoDrop Spektralphotometer	Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA
PCR SoftTubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf
PerfectBlue Gelsystem Mini L	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
PerfectBlue Gelsystem Mini S	PEQLAB Biotechnologie GMBH, Erlangen, Deutschland
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
PIPETMAN 0,2-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	Gilson, Middleton, WI, USA
RCT basic IKAMAG	IKA, Staufen, Deutschland
SaveSeal 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Thermowell Sealing Mat 96 well	Corning Inc., Corning, NY, USA
Veriti 96 well Fast Thermal Cycler	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Vortex Genie	Scientific Industries, New York City, NY, USA
VWR DUO cycler	VWR, Radnor, PA, USA

2.3.2 Lösungen

Lösungen	Zusammensetzung
dNTP mix (2 mM) (5 ml)	Jeweils 100 µl 100 nM dCTP, dGTP, dTTP und dATP
Loading Buffer für Gel (50 ml)	<ul style="list-style-type: none"> - 7,5 g Ficoll 400 - 1ml EDTA - Auf 50 ml mit aufgereinigtem Wasser auffüllen - Mixen und etwas Orange G zufügen - 5 min zentrifugieren bei 3000 rpm und Überstand verwenden
TBE Puffer (1l)	<ul style="list-style-type: none"> - 54 g Tris(hydroxymethyl)-aminomethan - 27,5 g Borsäure - 20 ml EDTA (0,5 M)

2.3.3 Software und Datenbanken

Name	URL/Hersteller
Ensembl Genome Browser	http://www.ensembl.org/index.html
ExAC-Browser	http://exac.broadinstitute.org
Berkeley Drosophila Genome Project	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
Chromas	Technelysium Pty Ltd.
dbSNP	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/
MutationTaster	http://www.mutationtaster.org/
MutPred	http://mutpred.mutdb.org/
NetGene2	http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/
PolyPhen-2	http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/
Primer3 Input (v. 0.4.0)	http://frodo.wi.mit.edu/
PubMed	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed
SeqPilot	JSI medical systems
UCSC Genom Browser	http://genome.ucsc.edu/

2.3.4 Primer-Design

Zur Erstellung der Primer wurde das Programm Primer3 (v.0.4.0) verwendet. Für *ARHGAP31* wurde das Transkript ENST00000264245 und für *DOCK6* das Transkript ENST00000294618 von Ensembl als Grundlage genommen. Die Parameter wurden so eingestellt, dass die Primerlänge zwischen 18 und 24 nt liegen sollte und die Bindetemperatur zwischen 57°C und 63°C. Die Lage der Primer wurde so gewählt, dass mindestens 20 bp der flankierenden Introns noch mit sequenziert werden konnten und, dass größere Exons in 500-600 bp große und überlappende Abschnitte geteilt wurden. Kurze und eng benachbarte Exons hingegen wurden in ein Produkt zusammengelegt. Ansonsten wurden die Voreinstellungen beibehalten. Die so ermittelten Primersequenzen wurden anschließend durch die BLAT Search und „*in-silico* PCR“ bei UCSC Genome Browser auf ihre Spezifität überprüft. Die erstellten Primer wurden daraufhin bei Thermo Fisher Scientific Inc. (Waltham, MA, USA) bestellt. Eine Liste der Primer mit Sequenzen befindet sich im Anhang. Bei der Benennung erhielten größere Exons, die in mehrere PCR-Abschnitte aufgeteilt werden mussten, zusätzliche alphabetische Codierungen. Wurden für einen Abschnitt mehrere Primer erstellt, beispielsweise bei Misserfolg des ersten Primers, wurden diese mit Zahlen nach einem Punkt markiert.

3 Ergebnisse

3.1 Etablierung des PCR-Protokolls und der Primer

Zur Etablierung eines Standardverfahrens und der Testung der einzelnen Primer wurden zu Beginn der Arbeit an einer Kontroll-DNA in unserem Institut isoliert wurde, alle Primerpaare getestet. Hierzu wurde wie in 2.2.3 und 2.2.4 beschrieben die PCR mit anschließender Gelelektrophorese durchgeführt und die entstandenen Banden beurteilt. Eine kräftige, scharf begrenzte Bande sprach für ein gutes und ausreichendes Produkt für die weitere Sequenzierung. Die Größe der einzelnen Produkte wurde mit einer DNA-Leiter abgeglichen und mit der erwarteten Größe verglichen. Bilder der Gelelektrophoresen mit Beschriftung der Exon-Nummern zeigen die Abbildungen 8 und 9.

Die auffällig dünnen Banden von Exon 03 des Gens *AHRGAP31* so wie der Exons 44 und 47 *DOCK6* ergaben bei der anschließenden Sequenzierung ausreichend gute Ergebnisse.

Besondere Schwierigkeiten bereiteten jedoch die Primer für die Exons 01 und 17+18 des *DOCK6*-Gens. Hier mussten wiederholt neue Primerpaare erstellt und getestet werden, bis eine zufriedenstellende Kombination gefunden wurde. Zumindest für das Exon 1 liegt der Grund für die Amplifikationsprobleme offensichtlich am hohen CG-Gehalt des Fragments.

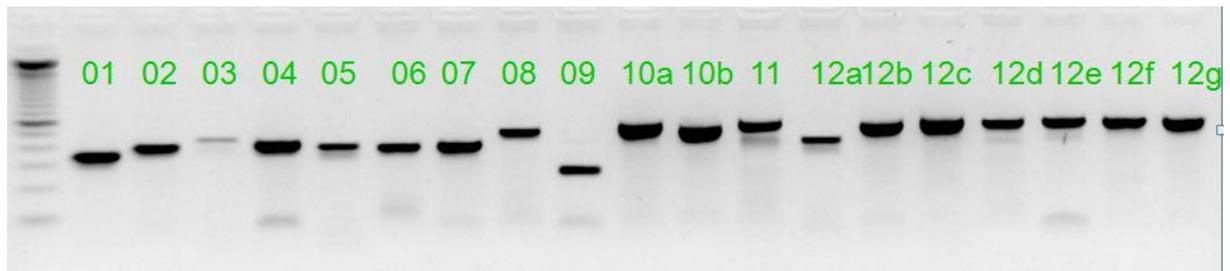


Abbildung 8: PCR-Produkte *ARHGAP31* nach Protokoll im Vergleich zur DNA-Leiter

Ausreichende Amplifikation aller Exons trotz schwacher Bande bei Exon 3 (Siehe Abschnitt 3.1)

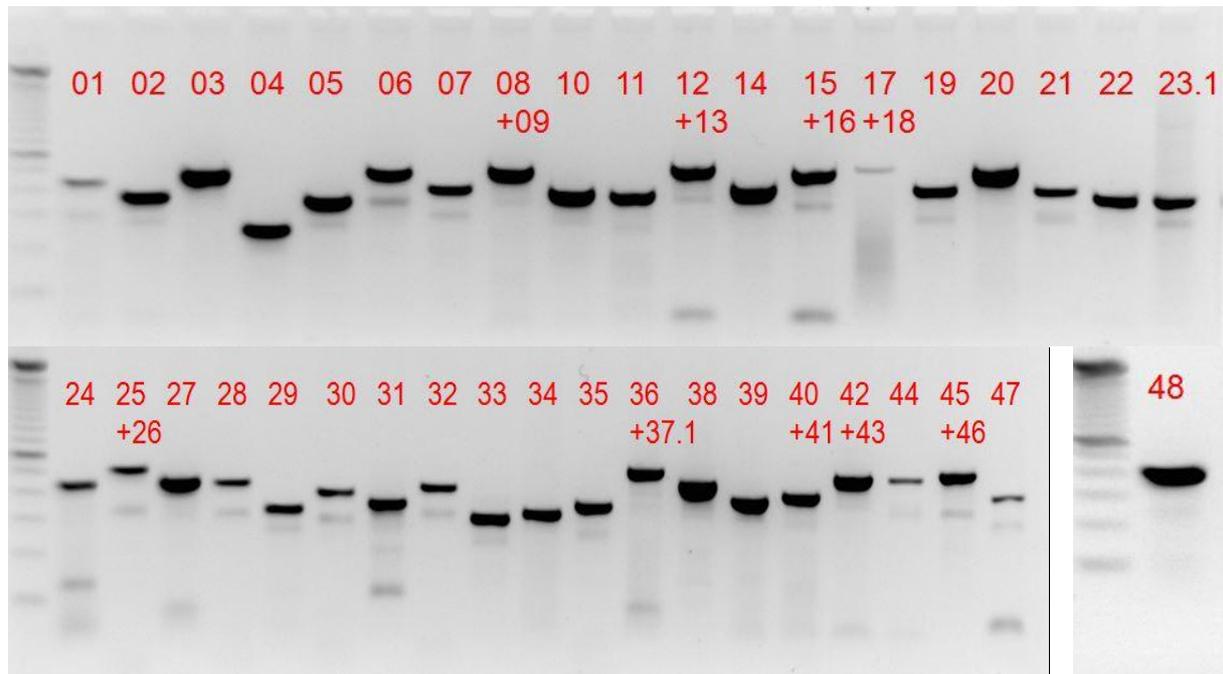


Abbildung 9: PCR-Produkte *DOCK6* nach Protokoll im Vergleich zur DNA-Leiter Ausreichende

Amplifikation aller Exons ausgenommen Exon 01 und 17+18. Exon 44 und 47 ergaben ausreichende Sequenzierungsergebnisse. (siehe Abschnitt 3.1) Exon 48 erscheint vergrößert Aufgrund des größer aufgenommen Bildes und der Anpassung an die übrigen Abbildungen.

3.2 Ergebnisse der Sequenzierungen

Bei dem beschriebenen Patientenkollektiv wurden je nach Einteilung die beiden Gene *DOCK6* und *ARHGAP31* auf Änderungen in ihren 48, beziehungsweise 12 Exons sowie den kurzen Abschnitten (+/- 20 bp) der flankierenden Introns untersucht. Hierbei wurde auf kleine Deletionen, Insertionen oder den Austausch einzelner Basen geachtet. Diese Veränderungen im Gen können zu einer gestörten oder komplett fehlenden Proteinfunktion führen.

Bei den 21 auf Mutationen in *ARHGAP31* untersuchten Patienten wurden mehrere Abweichungen von der Referenzsequenz gefunden. Der überwiegende Teil davon war als Polymorphismen mit einer Frequenz über 1% in der dbSNP-Datenbank bereits erfasst und häufig im ExAC-Browser aufgeführt. Daher wurden sie als nicht krankheitsverursachend bewertet. Die nicht bekannten Veränderungen wurden mittels der genannten Programme auf ihre mögliche Pathogenität überprüft und ebenfalls in Summe mit der Allelfrequenz des ExAC-Browsers als sehr wahrscheinlich nicht krankheitsverursachend befunden. Somit konnten in der Kohorte keine weiteren Mutationen für autosomal-dominant vererbte AOS-Fälle gefunden werden.

Gefundene Veränderungen die mit einer Häufigkeit unter 1 % in der Normalbevölkerung (dbSNP) vorhanden sind, zeigt Tabelle 6. Die Veränderungen in Exon 04 und 11, für die der MutationTaster eine krankheitsverursachende Auswirkung vorhersagt, wurden aufgrund der zu relativ hohen Allelfrequenz im ExAC-Browser als pathogene Mutationen ausgeschlossen.

Tabelle 6: Varianten *ARHGAP31*

Position	Nukleotidveränderung	Proteinveränderung	dbSNP (139)	ExAC-Allelfrequenz	MutationTaster	MutPred	PolyPhen-2 (HumVar)
Exon 04	c.384G>C	p.(=)	rs150339878	0.001764	disease causing = 1	-	-
Exon 06	c.540-6C>T	r.spl.? p.?	rs16829782	0.07533	polymorphism = 0.99	-	-
Exon 07	c.881+7G>A	r.spl.? p.?	rs78837524	0.06508	polymorphism = 0.99	-	-
Exon 11	c.1926+5A>G	r.spl.? p.?	rs1463139	0.6424	disease causing = 1	-	-
Exon 11	c.1926+11T>C	r.spl.? p.?	rs1463138	0.5507	polymorphism = 0.99	-	-

Bei den 25 Patienten, bei denen *DOCK6* untersucht wurde, konnten viele Abweichungen von der Referenzsequenz gefunden werden. Der Großteil der gefundenen Veränderungen waren auch hier bekannte Polymorphismen mit einer Frequenz von >1%, die bei dbSNP und hoher Allelfrequenz im ExAC-Brwoser zu finden waren. Es zeigten sich jedoch zusätzlich neue Veränderungen. Unter den neuen und sehr seltenen Varianten (ExAC <1%) konnten wiederum einige per Prädiktion als wahrscheinlich benigne identifiziert werden (siehe Tabelle 7), jedoch hatten vier Mutationen eine eindeutige krankheitsverursachende Vorhersage (siehe Tabelle 8).

Die in Tabelle 7 aufgeführte Veränderungen, für welche der MutationTaster erneut eine krankheitsverursachende Auswirkung vorhersagte, konnten ebenfalls aufgrund der verhältnismäßig hohen Allelfrequenz mit hoher Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden. In Exon 12 wurde die Veränderung p.(Arg430His) weiterhin durch die zusätzlichen Programme entkräftet. Alle in Tabelle 7 aufgelisteten Veränderungen wurden überdies nur in einfacher heterozygoter Form bei AOS-Patienten nachgewiesen, was bei dem bekannten autosomal-rezessiven Vererbung des *DOCK6*-assoziierten AOS keine hinreichende Begründung für die Erkrankung wäre. Die Veränderungen sind daher als wahrscheinlich seltene Varianten ohne Krankheitswert oder Varianten unklarer Signifikanz (VUS) einzustufen.

Tabelle 7: Varianten mit wahrscheinlich nicht pathogener Wirkung oder unklarer Signifikanz bei *DOCK6*

B = benigne (engl: benign) PoD= Wahrscheinlich Schädlich (engl: possibly damaging)

Position	Nukleotidveränderung	Proteinveränderung	dbSNP (139)	ExAC-Allelfrequenz	MutationTaster	MutPred	PolyPhen-2 (HumVar)
Exon 02	c.100C>G	p.(His34Asp)	rs201065561	0.001247	polymorphism = 0.99	0.155	B (0.017)
Exon 09	c.885C>T	p.(=)	rs146599144	0.008338	disease causing = 1	-	-
Exon 12	c.1289G>A	p.(Arg430His)	rs143655255	0.003896	disease causing = 0.99	0.334	PoD (0.512)
Exon 30	c.3873C>T	p.(=)	rs200843111	0.0004477	disease causing = 1	-	-
Exon 38	c.4899G>A	p.(=)	rs72985308	0.002561	disease causing = 1	-	-

Da Mutationen in *DOCK6* autosomal-rezessiv vererbt werden, erwarteten wir bei einem Patienten entweder eine homozygote oder zwei heterozygote (Compound-Heterozygotie) krankheitsverursachende Mutationen, um davon ausgehen zu können, dass ein *DOCK6*-Defekt ursächlich für das AOS ist. Dieses war bei drei Patienten der Fall. Der erste Fall wies die homozygote Mutation c.1300delC, p.(Gln434Argfs*21), der zweite homozygot c.3047T>C, p.(Leu1016Pro) und der dritte die zwei compound-heterozygoten Mutationen c.1362_1365delAACT, p.(Thr455Serfs*24) und c.4491+1G>A auf, von denen die erste schon von Shaheen *et al.* beschrieben und letztere eine Splice Site-Mutation war (siehe Tabelle 8) (Shaheen et al. 2011).

Tabelle 8: Mutationen und Prädiktion (Patient = Pat.)

Position	Pat.	Nukleotid- veränderung	Protein- veränderung	dbSNP (139)	ExAC- Allelfrequenz	Mutation- taster	Mut Pred	PolyPhen2 (HumVar)
Exon 12	1	c.1300delC	p.(Gln434Argfs*21)	-	-	disease causing = 1	-	-
Exon 12	3	c.1362_1365delAACT	p.(Thr455Serfs*24)	rs762345010	0.00004533	disease causing = 1	-	-
Exon 25	2	c.3047T>C	p.(Leu1016Pro)	-	-	disease causing = 0.99	0.756	1.000
Intron 35	3	c.4491+1G>A	r.spl.? p.?	-	0.00003411	disease causing = 0.99	-	-

3.3 Patienten und Mutationen

3.3.1 Patient 1

Bei dem Patienten handelte sich um einen aus der Türkei stammenden 20-jährigen jungen Mann von gesunden konsanguinen Eltern (erstgradige Cousins; siehe Abbildung 10 mit Legende Abbildung 11). Wir fanden bei der Untersuchung von *DOCK6* die homozygote Veränderung c.1300delC in Exon 12. Es handelt sich hierbei um eine Frameshift-Mutation, für die als Konsequenz ein vorzeitiger Abbruch der Proteinsynthese vorhergesagt wird (p.(Gln434Argfs*21)). MutationTaster gab eine Wahrscheinlichkeit von 1 für die Möglichkeit einer Pathogenität an. Diese Einschätzung beruhte auf mehreren Ursachen. Zum einen wurde angenommen, dass das verkürzte Protein durch den NMD vorzeitig abgebaut werden würde, zum anderen wären die Proteineigenschaften, selbst wenn es zur Synthese eines mutanten Proteins kommen sollte, durch die beim Frameshift geänderte Aminosäuresequenz und den vorzeitigen Kettenabbruch sehr wahrscheinlich hochgradig beeinträchtigt. Beides ist vereinbar mit der loss-of-function-Hypothese bei mit AOS assoziierten Mutationen des *DOCK6*-Gens (siehe Kapitel 1.3).

Bei der Analyse der restlichen Familienmitglieder konnte gezeigt werden, dass beide Elternteile diese Mutation heterozygot trugen. Der gesunde Bruder hatte auf beiden Allelen keine Mutation, also den Wildtyp. Diese Konstellation passt zu dem anzunehmenden autosomal-rezessiven Erbgang und legt weiter nahe, dass es sich um die kausale Mutation in der Familie handelte.

Neben der eigentlichen Mutation konnte im gleichen Exon vier Basen zuvor eine stille Mutation c.1296G>T; p.(Gly432Gly) homozygot entdeckt werden. Damit konnte zusätzlich untermauert werden, dass bei den konsanguinen Eltern dasselbe Allel eines gemeinsamen Vorfahren vorhanden und vererbt war. Bei dem gesunden Bruder konnte diese Variante wie erwartet nicht dargestellt werden.

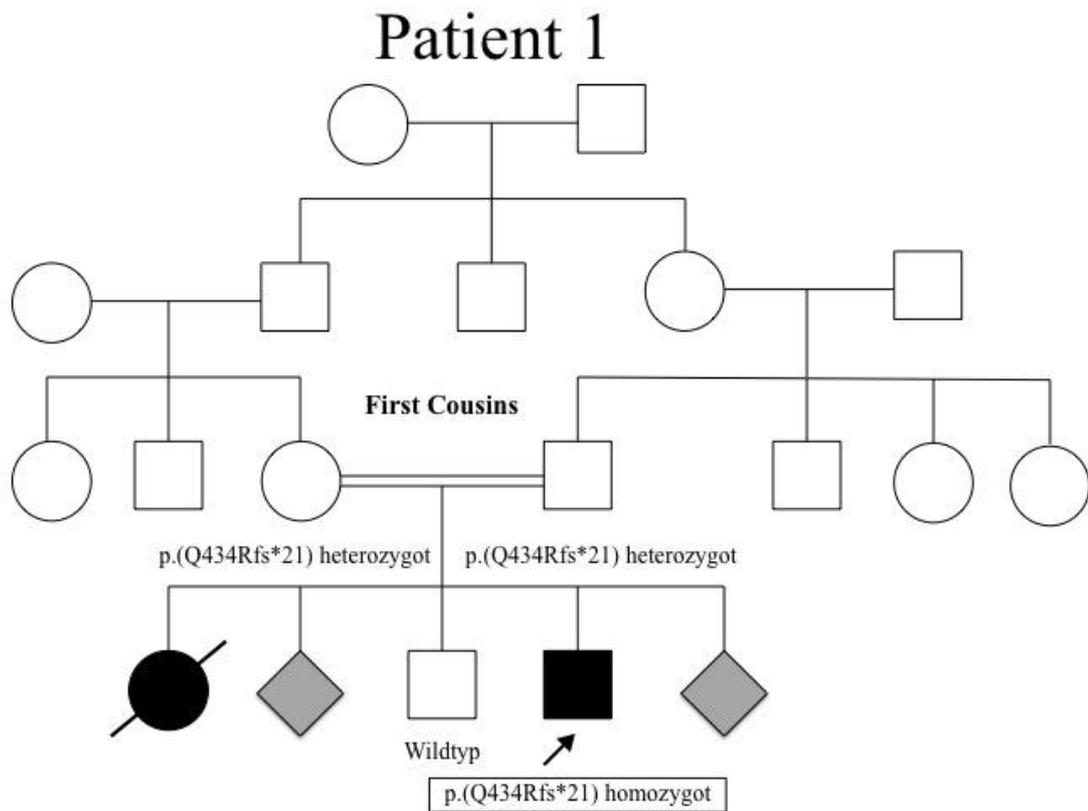


Abbildung 10: Stammbaum Patient 1

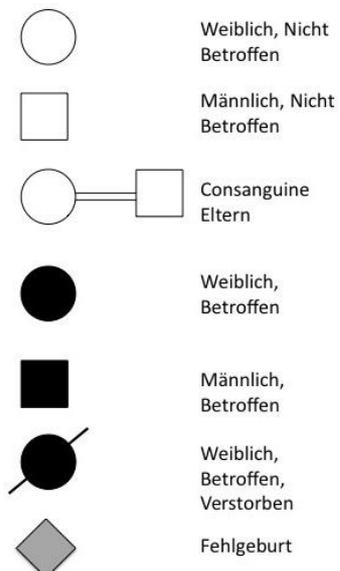


Abbildung 11: Legende für Stammbäume

Die klinische Symptomatik stellte sich wie folgt dar:

Der Patient wies eine parietal gelegene Narbe von 11x4 cm Größe nach einer abgeheilten großen ACC auf. Die TTLD zeigten sich durch komplett fehlende Finger der rechten Hand, links waren sie nur rudimentär vorhanden. Die Zehen waren beidseits verkürzt (siehe Abbildung 12). Eine CMTC konnte subcostal rechts gesehen werden.



Abbildung 12: Klinische Fotos Patient 1

Aufnahmen im Alter von ca. 20 Jahren, Skalp mit ACC (11x4 cm), Hände mit asymmetrischen Defekten aller Finger und Füße mit verkürzten Zehen.

Kognitiv konnten schwere Beeinträchtigungen festgestellt werden. In der cranialen Computertomographie (cCT) mit sechs Jahren zeigte sich eine Ventrikulomegalie sowie periventriculäre Verkalkungen (siehe Abbildung 13).

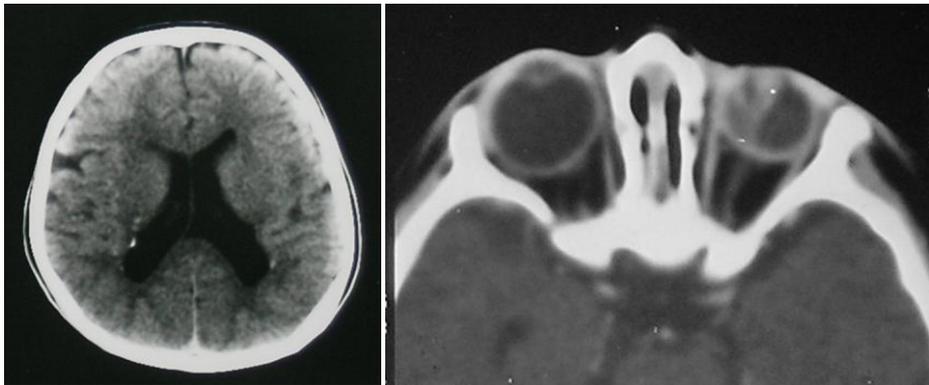


Abbildung 13: Patient 1 cCT und Orbita-CT

Aufnahmen im Alter von ca. 6 Jahren, Ventrikulomegalie und periventriculäre Verkalkungen so wie Mikrophthalmie des linken Auges.

Seit seinem zweiten Lebensjahr litt der Patient an Epilepsie und tonisch-klonischen Anfällen. Weiter traten Wutausbrüche und Lachanfalle auf. Mit vier Jahren begann er einzelne Silben zu sprechen, kann aber im Alter von 20 Jahren immer noch keine kompletten Worte verwenden. Die Untersuchung des linken Auges ergab eine Mikrophthalmie, Ablösungen der Netzhaut, zystische kolobomatöse Veränderungen und einen fehlenden Visus (siehe Abbildung 13). Das rechte Auge zeigte keine Veränderungen. Aufgrund der spastischen Lähmung und der Kontrakturen im Knie ist der Patient nicht in der Lage zu laufen. Die als Kleinkind verstorbene Schwester des Patienten soll ähnliche Hand- und Fußanomalien aufgewiesen haben. Beide Eltern haben keinerlei klinische Auffälligkeiten im Sinne eines AOS, die Mutter gab jedoch zwei Fehlgeburten an (siehe Abbildung 10).

3.3.2 Patient 2

Bei Patient 2 handelte sich um ein zum Zeitpunkt der Diagnose fünf Jahre altes Mädchen aus der Türkei mit gesunden konsanguinen Eltern (Cousin und Cousine ersten Grades; siehe Abbildung 14 mit Legende Abbildung 11).

Die hier in *DOCK6* gefundene Missense-Mutation c.3047T>C, oder p.(Leu1016Pro), in Exon 25 war homozygot bei der Indexpatientin. Die Prädiktion von MutationTaster ergab eine Wahrscheinlichkeit für eine krankheitsverursachende Auswirkung von 0.99. Diese Beurteilung erfolgte vor allem auf der Annahme, dass die geänderte Aminosäure hoch konserviert erschien und eine Änderung vermutlich starke Auswirkungen auf die Funktion des Proteins haben würde. Auch MutPred gab mit einem Wert von 0.756 und PolyPhen-2 mit einem HumVar-Wert von 1.000 eine hohe Wahrscheinlichkeit an für die Pathogenität der Mutation.

Beide Eltern und die gesunde Schwester zeigten in der Sequenzierung diese Mutation heterozygot. Auch dieses Segregationsmuster passt zur Annahme der Pathogenität bei autosomal-rezessiver Vererbung.

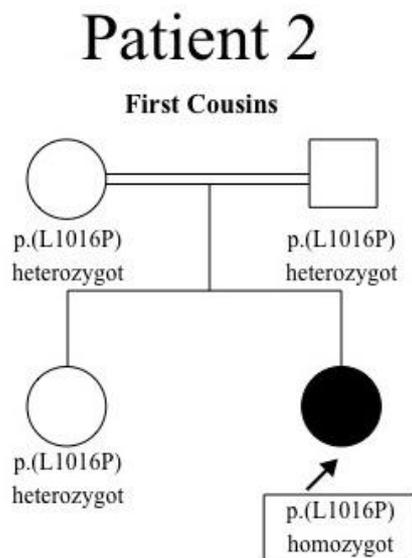


Abbildung 14: Stammbaum Patient 2

Klinisch wurde bei der Patientin folgendes beschrieben:

Im Parietal-Bereich des Schädels zeigte sich eine 10x10 cm große ACC. Die Ausprägung der TTLD zeigte sich in hypoplastischen Endgliedern an Fingern und Zehen, mit hypoplastischen Nägeln (siehe Abbildung 15). Der zweite und dritte Zeh wiesen eine partielle kutane Syndaktylie auf.



Abbildung 15: Klinische Fotos Patient 2

Aufnahmen in Alter von ca. 5 Jahren, Skalp mit narbig abgeheilter ACC von 10x10 cm und Hände mit hypoplastischen Endgliedern.

Die Untersuchungen des Schädels zeigten einen Mikrozephalus. Ein cCT oder MRT des Schädels wurde nicht durchgeführt. Weiter wurde eine Epilepsie beschrieben. Auch die Augen zeigten Veränderungen. Beidseits wurden verkleinerte Bulbi festgestellt, eine Leukokorie, Glaskörpertrübungen und Hypoplasie der vorderen Augenkammer. Die Haut wurde als sehr hell beschrieben und es fiel eine breite hervortretende Stirn auf. Weiter zeigten sich eine verbreiterte Nasenwurzel, ein hoher Gaumen und ein kurzer Hals.

In einer früher durchgeführten Analyse der Familie der Patientin mit einem Affymetrix 250k SNP Array hatte sich eine große homozygote Region von 22 Mb gezeigt, die auf dem Chromosom 19 zwischen 19p3.4 und 19p21.8 lag und somit den Locus von *DOCK6* einschloss. Da es sich um eine konsanguine Familie handelt, bei welcher anzunehmen ist, dass krankheitsverursachende Mutationen in homozygoten Gebieten liegen, ist dieses ein weiterer Anhaltspunkt für die Vermutung von *DOCK6* als verantwortliches Gen für die Erkrankung in der Familie.

3.3.3 Patient 3

Bei Patient 3 handelte sich um einen 10-jährigen Jungen aus Deutschland mit gesunden nicht verwandten Eltern (siehe Abbildung 16 mit Legende Abbildung 11).

Bei diesem Patienten konnten wir zwei heterozygote Mutationen in *DOCK6* entdecken. Zum einen die bereits von Shaheen *et al.* beschriebene Mutation c.1362_1365delAACT, beziehungsweise p.(Thr455Serfs*24) (Shaheen et al. 2011), und zum anderen die neue Splice Site-Mutation c.4491+1G>A.

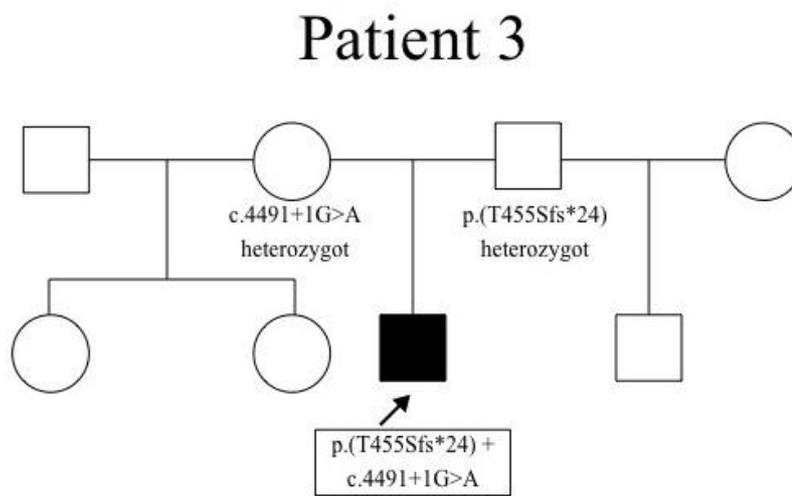


Abbildung 16: Stammbaum für Patient 3

Nach der Prädiktion durch MutationTaster ist die Mutation p.(Thr455Serfs*24) mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit von 1 als pathogen anzusehen. Die Veränderung führt wahrscheinlich zum vorzeitigen Abbau der mRNA durch den NMD, aber auch ein exprimiertes verändertes und trunkiertes Protein wäre vermutlich funktionslos.

Die zweite Mutation c.4491+1G>A wurde durch MutationTaster mit einer Wahrscheinlichkeit von 0.99 für krankheitsverursachend befunden. Dieses liegt an der Beeinträchtigung der Donor Splice Site; es wird das obligate Guanin an Position +1 des Splice-Donors von Exon 35 durch Adenin ersetzt. Durch Amplifikation und Sequenzierung eines cDNA Fragments, das die Exons 33 bis 37 umspannt, zeigte sich, dass die Veränderung zu einem aberranten Spleißen führt, indem es zu einem Exon Skipping des Exons 35 kommt, wie in Abbildung 17 dargestellt. Bei der Untersuchung zeigte sich im Hintergrund die normale Frequenz, also die Frequenz von Exon 35. Dies lässt sich dadurch erklären, dass die Mutation nur heterozygot vorliegt und so das andere Allel im Hintergrund regulär synthetisiert wurde.

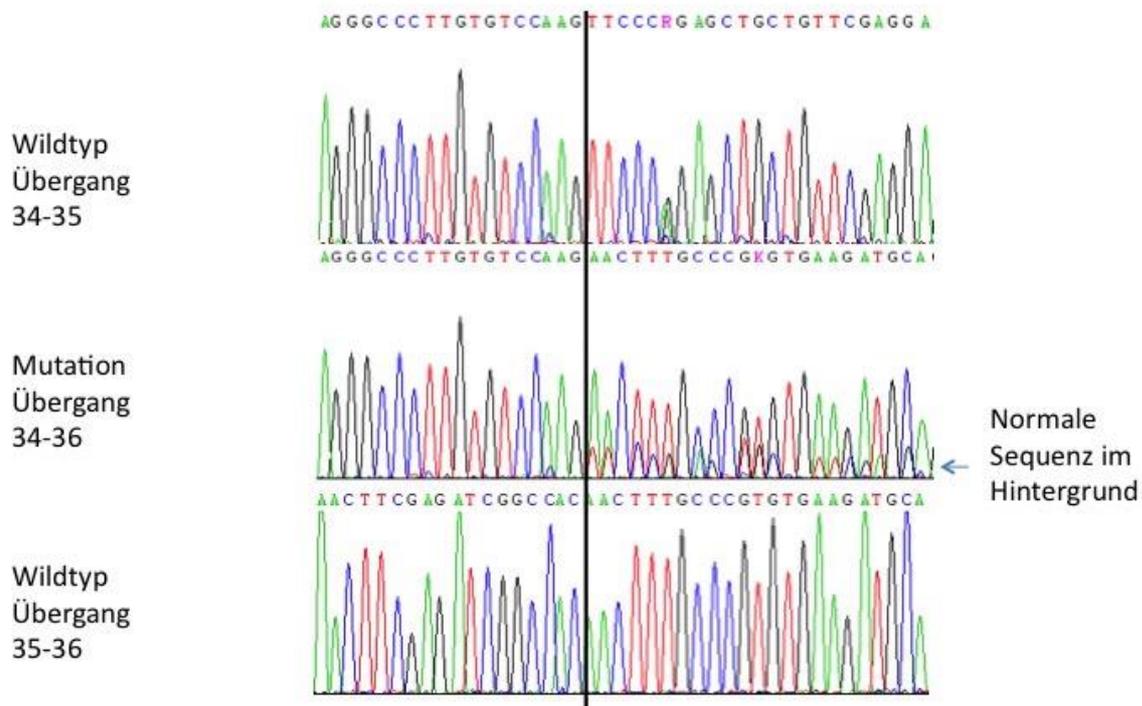


Abbildung 17: Exon Skipping des Exons 35 bei Patient 3

Die beiden Mutationen konnten heterozygot in je einem Elternteil nachgewiesen werden. Die Mutter wies heterozygot die Mutation c.4491+1G>A auf, der Vater heterozygot p.(Thr455Serfs*24).

Die klinischen Symptome des Patienten wurden wie folgt beschrieben:

Es zeigte sich bei Geburt eine vergrößerte Fontanelle, sowie eine okzipital gelegene ACC von 10x10 cm. Die TTLD zeigten sich an den Händen durch eine Brachydaktylie und eine Kamptodaktylie. An den Füßen wurde ebenfalls eine Brachydaktylie, eine Syndaktylie der Digiti 2 und 3 auf beiden Seiten, sowie beidseits eine Supinationsstellung beschrieben. Dieses zeigt die Abbildung 18. Eine CMTC konnte ebenfalls gesehen werden. Der Patient ist stark entwicklungsverzögert hinsichtlich der Motorik, Kognition und Sprache. Er war im Alter von acht Jahren in der Lage, Sätze mit bis zu drei Worten zu bilden mit einem Wortschatz von ca. 150 Wörtern. Es wurde autoaggressives Verhalten und stereotype Bewegungen wie Klatschen beschrieben. Im MRT (siehe Abbildung 19) konnte eine generelle Volumenverminderung des Gehirns mit gleichzeitig dilatierten Ventrikeln gesehen werden. Auch eine Hypoplasie des Corpus callosum wurde beschrieben. Der Patient hatte Epilepsie-typische Potentiale im EEG und litt an einer Epilepsie, die sich seit dem ersten Lebensjahr etwa zweimal im Quartal mit größeren Anfällen zeigte. Ein laut der Mutter bestandener angeborener Herzfehler konnte in einer Echokardiographie nicht mehr nachgewiesen werden (vermutlich Spontanverschluss eines kleinen Vorhof- oder Kammerseptumdefekts; alte Unterlagen nicht verfügbar). Der

Patient zeigt binokular eine hochgradige Sehbehinderung bei der nur Hell und Dunkel unterschieden werden kann. Gelegentlich zeigen sich bei dem Patienten Autoaggressionen mit Verletzen der Handflächen.



Abbildung 18: Klinische Fotos Patient 3

Aufnahmen im Alter von ca. 10 Jahren, Fotos des Skalpdefekts von 10x10 cm, der Hand mit Brachydaktylie und Kamptodaktylie und des Fußes mit Brachydaktylie, eine Syndaktylie der Digiti 2 und 3 und Supinationsstellung.

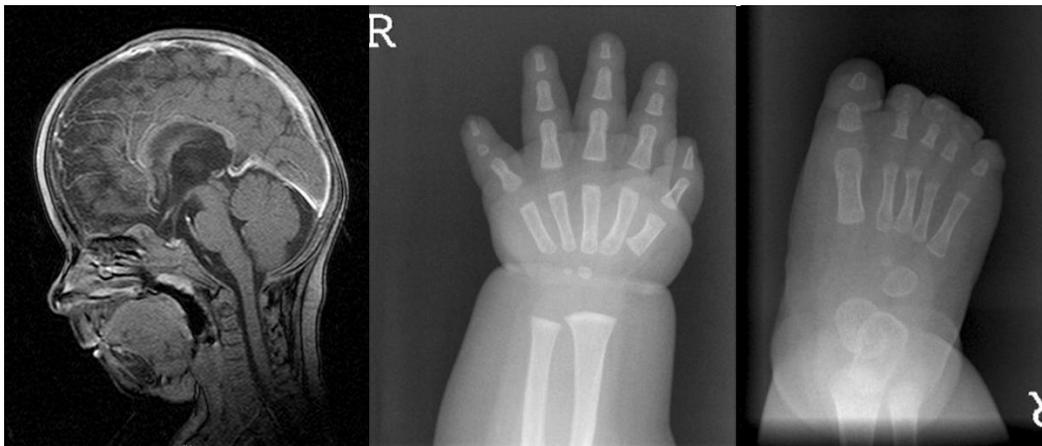


Abbildung 19: Patient 3 MRT Schädel, Röntgen von Hand und Fuß

Aufnahmen im Alter von ca. einem Jahr, Volumenminderung des Gehirns und Hypoplasie des Corpus callosum, Hypoplasie der Endphalangen der Hand und des Fußes.

3.4 Vergleich der Symptome bei Patienten mit DOCK6-Mutationen

Bei allen drei *DOCK6*-Mutations-positiven Patienten unserer Kohorte konnten deutliche phänotypische Ähnlichkeiten bemerkt und für das AOS sonst seltene assoziierte Manifestationen festgestellt werden, die in den publizierten autosomal-dominanten Fällen nicht beobachtet werden konnten (Southgate et al. 2011, Snape et al. 2009). Alle drei Patienten zeigten eine mentale Retardierung oder Entwicklungsverzögerung, eine Mikrozephalie, intrakranielle Veränderungen und Pathologien der Augen. Neurologische und okuläre Anomalien waren auch in den beiden Patienten, die von Shaheen et al publiziert wurden, beschrieben worden. Aufgrund der geringen Patientenzahl war die Signifikanz dieser Assoziation jedoch unklar geblieben. Die dort beschriebenen Symptome sind in Tabelle 9 den eigenen Beobachtungen gegenübergestellt. (Shaheen et al. 2011).

Diese Assoziation neurologischer und ophthalmologischer Symptome wurde bereits 1995 von Orstavik *et al.* bei autosomal-rezessiven Fällen gesehen und wird zum Teil als eigene Variante von AOS gesehen (Orstavik et al. 1995).

Tabelle 9: Vergleichstabelle der Patienten

	Patient 1	Patient 2	Patient 3	Fall 1 (Shaheen et al. 2011)	Fall 2 (Shaheen et al. 2011)
Mutation Allel 1	c.1300delC p.(Q434Rfs*21)	c.3047T>C p.(L1016P)	c.1362_1365del AACT p.(T455Sfs*24)	c.1362_1365del AACT p.(T455Sfs*24)	c.1245dupT p.(D416*)
Mutation Allel 2	c.1300delC p.(Q434Rfs*21)	c.3047T>C p.(L1016P)	c.4491+1G>A -	c.1362_1365del AACT p.(T455Sfs*24)	c.1245dupT p.(D416*)
Geschlecht / Alter	Männlich, 22 Jahre	Weiblich, 5 Jahre	Männlich, 10 Jahre	Männlich, 11 Monate	Weiblich, 3,5 Jahre
Konsanguinität	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
ACC	11 x 4 cm	10 x 10 cm	Ja	Ja	Ja
TTLD	Fehlende Finger, Zehen verkürzt	Hypoplastische Finger und Zehen	Brachydaktylien und Syndaktylien	Hände und Füße	Hände und Füße
Kognitiver Status	Schwere Beeinträchtigungen	Entwicklungsverzögerung	Stark entwicklungsverzögert	Entwicklungsverzögerung	Sprachentwicklung verzögert
Neurologische Symptome	Epilepsie	Epilepsie	Epilepsie	Epilepsie, axiale Hypotonie mit Hypertonie der Extremitäten	Keine Anomalien
Zerebrale Bildgebung (MRT/cCT)	Ventrikulomegalie und periventriculäre Verkalkungen	Keine Daten vorhanden	Ventrikulomegalie und Hypoplasie des Corpus callosum	Ventrikulomegalie und periventriculäre Verkalkungen	Keine Anomalien
Mikrophthalmie	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
Pathologien der Augen	Mikrophthalmie, Netzhautablösung, zystische kolobomatöse Veränderungen, kein Visus	Mikrophthalmie, bilaterale Leukokorie, bilaterale Petersche Anomalie, Glaskörpertrübungen	Schlechter Visus	Schlechter Visus und Optikusatrophie	Keine Anomalien

4 Diskussion

4.1 Beurteilung der Ergebnisse für *DOCK6* und *ARHGAP31*

Zu Beginn dieser Arbeit waren zu den genetischen Grundlagen des AOS zwei Publikationen von Southgate *et al.* sowie von Shaheen *et al.* veröffentlicht. Diese fanden jeweils für autosomal-dominante bzw. autosomal-rezessive Fälle anhand von einzelnen Patienten (jeweils nur zwei Familien) Mutationen in den beiden Genen *ARHGAP31* und *DOCK6* als ursächliche Veränderungen. Auch waren die beiden Mutationen in *DOCK6* nur in zwei arabischen konsanguinen Familien gefunden worden.

Daher war es die Zielsetzung dieser Arbeit in unserem eigenen Kollektiv von insgesamt 41 nicht verwandten Patienten gezielt je nach angenommenem Vererbungsmuster auf weitere Mutationen in den beiden bekannten Genen zu untersuchen, um nach Möglichkeit die Aussage der beiden Publikationen zu bestätigen, sowie die Bedeutung dieser Gene im eigenen Kollektiv zu untersuchen, das phänotypische und Mutationsspektrum weiter zu erforschen und ggf. Genotyp-Phänotyp-Korrelationen herauszuarbeiten.

Im Laufe der Arbeit wurden noch *EOGT*, *RBPJ*, *NOTCH1* und *DLL4* als weitere AOS-Gene publiziert, welche jedoch im Rahmen dieser Untersuchungen nicht mit aufgenommen wurden.

In *ARHGAP31* konnten wir bei 26 Patienten mit sporadischem AOS oder einem Stammbaum, der für autosomal-dominante Vererbung sprach, keine weiteren Mutationen feststellen. Das spricht dafür, dass dieses Gen nur für einen sehr geringen Anteil der AOS-Fälle verantwortlich ist. Bereits in der Arbeit von Southgate *et al.* wurde dies angedeutet, da nur bei zwei von 43 nicht verwandten Patienten Mutationen in *ARHGAP31* nachgewiesen werden konnten. Es ist aber nicht auszuschließen, dass wir mit der eingesetzten Methode unseres Mutationsscreenings (Sequenzierung der Exons und angrenzender intronischer Bereiche) Mutationen nicht nachweisen konnten. Hierzu würden große Insertionen und Deletionen, Rearrangements, weiter intronisch oder im Promotor gelegene Mutationen zählen. Solche Mutationen sind bisher in diesem Gen noch nicht beschrieben worden. Theoretisch wäre auch möglich, dass *ARHGAP31*-Mutationen auch für ein scheinbar rezessives AOS, beispielsweise bei konsanguinen Eltern eines Einzelfalls, verantwortlich sein könnten. Familien mit rezessiver Vererbung wurden im Rahmen dieser Arbeit nicht hinsichtlich Mutationen des *ARHGAP31*-Gens untersucht. Auch wurde die Kohorte zum Zeitpunkt meiner Studien noch nicht auf Mutationen in den weiteren AOS-Genen (*RBPJ*, *EOGT*, *NOTCH1*, *DLL4*)

untersucht. Insgesamt sprechen die eigenen und publizierten Daten für einen nur geringen Beitrag von *ARHGAP31*-Mutationen zum AOS.

In zwei Familien mit autosomal-rezessiven Stammbäumen, sowie in einem sporadischen Fall konnten wir vier verschiedene *DOCK6*-Mutationen in biallelischer Verteilung nachweisen. Hierunter waren drei bisher unbekannte Mutationen und eine bereits publizierte Mutation. Anders als bei den vorherigen Publikationen zeigte unsere Untersuchungskohorte eine größere Vielfalt bei der Herkunft der Patienten. Zwei dieser Fälle stammten erneut von konsanguinen Eltern, der dritte jedoch von nicht verwandten Eltern aus Deutschland. Es ist somit der erste beschriebene Fall von *DOCK6*-assoziiertem AOS aus Deutschland. Bei den Mutationen handelte es sich sowohl um Frameshift-, Missense- als auch um Splice Site-Mutationen. Die Tatsache, dass in der ersten Familie mehrere Kinder betroffen waren passt zur rezessiven Vererbung.

Dass die Eltern des deutschen Patienten nicht wissentlich verwandt sind passt zu dem Befund, dass die beiden Mutationen bei Patient 3 compound-heterozygot vorlagen. Daher handelt es sich hierbei auch um einen der ersten Fälle von AOS mit einer Mutation in *DOCK6* aus einer nicht konsanguinen Familie. Lehman *et al.* entdeckten in etwa zeitgleich einen ähnlichen Fall publizierten diesen bereits 2014 (Lehman et al. 2014).

Somit konnte in unserer Kohorte von 41 Patienten mit 3 *DOCK6*-positiven Patienten ein Prozentsatz von 7,3 % genetisch aufgeklärt werden. In Bezug auf die Fälle mit eindeutiger oder vermuteter autosomal-rezessiver Vererbung waren es 5,2 % (1/19) und bei den sporadischen Fällen 9 % (2/22). Die Daten der in dieser Dissertation untersuchten 41 Familien wurden als Teil einer noch größeren Kohorte publiziert, die insgesamt 78 nicht untereinander verwandte Familien umfasste, von denen die anderen aus kooperierenden humangenetischen Instituten aus London und Antwerpen stammten. In der verbundenen Kohorte fanden sich *DOCK6*-Mutationen bei 13 % (10/78) bezogen auf die gesamte Kohorte, mit 29 % (9/31) bei den autosomal-rezessiven und 2 % (1/47) bei den sporadischen Fällen (Sukalo & Tilsen et al. 2015).

Bei der Betrachtung der Statistik ist zu bedenken, dass in unserer Kohorte eine Verzerrung aufgrund der bevorzugten Sammlung von rezessiven und sporadischen Fällen nicht auszuschließen ist. Zwar steht diese Annahme im Widerspruch zum Vergleich mit der Publikation von Sukalo und Tilsen *et al.*, bei der, trotz ausgewogenerem Verhältnis, ein höherer Prozentsatz an DOCK6-Mutation bei den Patienten gefunden wurde, ist jedoch aufgrund der geringen Größe der Kohorten wahrscheinlich zu erklären.

Natürlich konnte in unserer mit autosomal-rezessiver Vererbung vereinbaren Kohorte, die auch viele sporadische Fälle mit konsanguinen Eltern einschloss, nicht ausnahmslos von diesem Vererbungsweg in den einzelnen Familien ausgegangen werden. So könnten sporadische Fälle auch durch dominant erbliche *de novo* Mutationen bedingt sein. Und das Auftreten der Erkrankung bei Geschwistern gesunder Eltern könnte durch ein elterliches Keimzellmosaik oder eine dominante Mutation mit unvollständiger Penetranz erklärt werden. Die Kontrolle der einzelnen mutationspositiven Patienten, die Überprüfung der Segregation, sowie die vorangegangenen Publikationen sprachen jedoch bei diesen Patienten stark für unsere Annahme.

4.2 Beurteilung der einzelnen Mutationen

Insgesamt haben wir vier unterschiedliche sehr wahrscheinlich pathogene *DOCK6*-Mutationen in drei nicht untereinander verwandten Familien gefunden. In allen Familien segregierte die Mutation mit dem AOS-spezifischen Phänotyp entsprechend des postulierten autosomal-rezessiven Vererbungsmodells. Bei den Mutationen p.(Gln434Argfs*21) von Patient 1 und p.(Thr455Serfs*24) von Patient 3 handelt es sich jeweils um Frameshift-Mutationen, wobei die zweite bereits durch Shaheen *et al.* beschrieben war. Die starken Veränderungen durch diese Mutationen, wie der frühzeitige Abbruch der Translation, das somit verkürzte Protein oder – noch wahrscheinlicher – das komplette Fehlen eines Genprodukts aufgrund von rascher Degradation der mRNA durch NMD, lassen die Annahme zu, dass durch diese Mutationen die Funktion praktisch vollständig aufgehoben oder das mutante Protein gar nicht vorhanden ist. Das ist mit der Annahme vereinbar, dass der pathogenetische Mechanismus beim *DOCK6*-assoziierten AOS ein Verlust der Proteinfunktion ist (loss-of-function-Hypothese) (siehe Kapitel 1.3).

Eine weitere klare funktionelle Einschätzung existiert für die Mutation c.4491+1G>A. Diese verursacht einen Austausch eines der invarianten Nukleotide des Splice-Donors und führt zu der Annahme, dass ein Spleißen an der authentischen Exon 35-Intron 35 Splice Site nicht stattfinden kann. Mögliche Folgen könnten prinzipiell ein „Auspleißen“ des betreffenden Exons (Exon Skipping), ein Einschluss des Introns in die mRNA (Intron Inclusion) oder ein Spleißen an einer ektopen alternativen Splice Site sein. Durch unsere Untersuchungen der cDNA des Patienten ließ sich der Verlust der Splice-Donor-Funktion belegen und die exakte Konsequenz als komplettes Exon Skipping des Exons 35 (r.4339_4491del) nachweisen. Auf Proteinebene lässt sich so ein Ausfall von 51 Aminosäuren und daher einem relevanten Anteil des Proteins (p.(Phe1447_His1497del)) vorhersagen. Es ist anzunehmen, dass diese Deletion schwerwiegende Auswirkungen auf die Proteinfunktion hat, auch wenn die genaue Bedeutung der von der Deletion betroffenen Proteindomäne nicht bekannt ist. Gemeinsam mit der heterozygoten Frameshift-Mutation auf dem zweiten Allel sind bei diesem Patienten somit beide Allele vermutlich weitgehend oder komplett funktionslos. Auch hier können wir aufgrund dessen davon ausgehen, dass es sich um pathogene Mutationen auf beiden Allelen handelt.

Schwieriger gestaltete sich dieser Kausalitäts-Nachweis für die Missense-Mutation p.(Leu1016Pro), die als homozygote Mutation beim Indexpatienten 2 sowie heterozygot bei

den Eltern und dem gesunden Geschwisterkind gefunden wurde. Die Veränderung ist nicht als Polymorphismus bekannt und konnte auch im ExAC-Brwoser nicht gefunden werden. Die Prädiktionen mit verschiedenen Programmen, wie in Tabelle 8 zu sehen, sagen einheitlich eine pathogene Wirkung für den Aminosäureaustausch an dieser hochkonservierten Position voraus (siehe Abbildung 20) (Sukalo & Tilsen et al. 2015).

Human	1016	LSLVDRGFVFSLVRAHYKQVATR
Mmulatta	1002	LSLVDRGFVFSLVRAHYKQVATR
Mmusculus	1080	-----SLVRAHYKQVATR
Trubripes	1088	-SLMORGFVFNLRISYYKQIANK
Drerio	1083	-----LVRISYYKQIINNK
Dmelanogaster	1052	-----GFVFGSLIKTYTRVLSIK
Celegans	1027	-----RIFVMKLVHKYLIAFVES
Xtropicalis	1044	LSLVDRGFVFNLRISYYKQVMWK

Abbildung 20: Konservierung der Missense-Mutation p.(Leu1016Pro) (BLAST Alignment)

Weiter war durch eine vorhergegangene Homozygotie-Kartierung bei dem Indexpatienten mittels SNP-Array eine 22 Mb große homozygote Region auf Chromosom 19 gefunden worden, welche den Lokus von *DOCK6* einschließt. Dieser Befund deckt sich mit der Erwartung, dass sich die kausalen Mutationen für rezessive Erbkrankheiten bei Nachkommen konsanguiner Eltern häufig in größeren Abschnitten mit Homozygotie befinden. Insgesamt sprechen Segregation, Homozygotie-Kartierung, Prädiktionen, das Fehlen in den Datenbanken und Konservierung für die pathogene Bedeutung dieser Missense-Mutation, die gleichzeitig die erste bekannte Missense-Mutation in diesem Gen darstellte. Die genauen Auswirkungen auf die Proteinfunktion durch die ausgetauschte Aminosäure konnten aber nicht vorhergesagt werden. Für funktionelle Untersuchungen auf Protein-Ebene durch beispielsweise einen Western-Blot (nur quantitative Aussage bei möglicher verminderter Protein-Stabilität durch die Mutation) fehlte geeignetes Untersuchungsmaterial. In der erweiterten Kohorte mit 10 *DOCK6*-positiven Familien, die von Sukalo und Tilsen *et al.* publiziert wurden, fanden sich vier weitere Patienten mit Missense-Mutationen (Sukalo & Tilsen et al. 2015). Dies ist nicht ungewöhnlich für autosomal-rezessive Erkrankungen, dass es neben Nonsense-, Frameshift- und Spleiß-Mutationen auch Missense-Mutationen mit loss-of-function-Effekt gibt.

4.3 Beurteilung des mit *DOCK6*-Mutationen assoziierten Phänotyps und Auswirkungen auf die Diagnostik

Besonders auffällig in unseren Untersuchungen waren die phänotypischen Ähnlichkeiten der Patienten. Anders als bei der ursprünglichen Beschreibung von AOS und in der Mehrheit der Fälle mit dominant vererbten Formen der Erkrankung hatten alle Patienten mit nachgewiesenen *DOCK6*-Mutationen zusätzliche neurokognitive Defizite wie eine globale Entwicklungsverzögerung, mentale Retardierung oder zerebrale Bewegungsstörungen. Auch eine Epilepsie war bei allen drei Patienten beschrieben. Eine Mikrozephalie wiesen ebenfalls alle auf und im MRT zeigte sich bei zwei von ihnen eine Erweiterung der Hirnventrikel gemeinsam mit einer Hirnatrophie. Bei dem dritten Patient wurde durch die behandelnden Ärzte kein cCT oder MRT des Schädels veranlasst. Pathologien der Augen, wie Mikrophthalmie, Visusminderungen bis zur Blindheit, Glaskörpertrübungen, sowie Ablösungen der Netzhaut, die auch bei allen drei Patienten vorkamen, komplettierten das gemeinsame Schädigungs-Muster.

Unserer Auffassung nach zeigte sich also bei Mutationen in *DOCK6* diese charakteristische Verbindung von ACC und TTLD mit neurologischen und okulären Pathologien. Dass diese Veränderungen bei autosomal-rezessiven Mutationen häufiger zu finden sind, wurde bereits in der klinischen Übersichtsarbeit von Snape *et al.* hervorgehoben. Erstmals wurde diese Assoziation bei zwei Geschwistern mit AOS durch Orstavik *et al.* beschrieben, wodurch die Bezeichnung „Orstavik-Typ“ des AOS zustande kommt (Snape *et al.* 2009, Orstavik *et al.* 1995). Neurokognitive und okuläre Anomalien wurden auch bei den beiden Familien beschrieben, in denen *DOCK6*-Mutationen erstmals identifiziert wurden, wobei eine detaillierte Beschreibung des neurologischen und okulären Phänotyps aber nicht vorliegt (Shaheen *et al.* 2011). Auch bei dem von Lehmann *et al.* beschriebenen Fall waren diese zu sehen (Lehmann *et al.* 2014). Unsere Ergebnisse sowie die anderen publizierten Fälle legen also nahe, dass für den „Orstavik-Typ“ des AOS im Wesentlichen die Defekte im *DOCK6*-Gen verantwortlich sind im Sinne einer klaren Genotyp-Phänotyp-Korrelation. Tatsächlich konnte an DNA-Proben der von Orstavik *et al.* ursprünglich publizierten Familie auch eine *DOCK6*-Mutation nachgewiesen werden. Die Ergebnisse dieser Dissertation zusammen mit neun weiteren unveröffentlichten *DOCK6*-positiven Fällen aus sieben Familien (einschließlich der Original-Orstavik-Familie) wurden kürzlich in der Arbeit „*DOCK6* Mutations Are Responsible for a Distinct Autosomal-Recessive Variant of Adams-Oliver Syndrome Associated with Brain and Eye Anomalies“ von Sukalo und Tilsen *et al.* gemeinsam mit den humangenetischen Instituten aus Antwerpen und London publiziert

(Sukalo & Tilsen et al. 2015). Hierbei bestätigten wir die Annahme, dass es sich bei dem „Orstavik-Typ“ um einen eigenständigen Typ der Erkrankung handelt. Die Penetranz zerebraler / neurologischer Anomalien beim *DOCK6*-assoziierten AOS scheint annähernd vollständig zu sein, die Ausprägung ist aber variabel.

Im Gegensatz zu Patienten mit *DOCK6*-Mutationen wurde bei Patienten mit einer weiteren autosomal-rezessiv vererbten Form des AOS aufgrund von Mutationen im *EOGT*-Gen nur in einem von bisher fünf publizierten Betroffenen milde zerebrale Veränderungen beobachtet und keine Fehlbildungen/Anomalien der Augen (Shaheen et al. 2013). Aus dem Kollektiv, das im Rahmen dieser Dissertation untersucht wurde, wurde nachträglich bei einer Familie mit zwei betroffenen Kindern und entfernter elterlicher Blutsverwandtschaft eine durch eine neue *EOGT*-Mutation bedingte Form des AOS nachgewiesen (unpublizierte Daten). Auch hier handelte es sich um einen AOS-Phänotyp mit ACC und milden TTLD ohne zusätzlich klinische Symptome. *EOGT*-Mutationen scheinen nach bisherigen Ergebnissen mit einem kleineren Teil von autosomal rezessiven AOS-Fällen assoziiert zu sein als *DOCK6*-Defekte.

In Zukunft ist bei dieser heterogenen Krankheit damit zu rechnen, dass Mutationen in weiteren Genen publiziert werden. Dies bestätigte sich vor kurzem durch die Publikationen von zwei weiteren Genen für die autosomal-dominante Form. Mutationen in *NOTCH1* (Stittrich et al. 2014) und *DLL4* (Meester et al. 2015) konnten gefunden werden. Selbst alle bekannten Gene (siehe Tabelle 10) erklären bislang noch weniger als die Hälfte der Fälle (Beobachtung an der Magdeburger AOS-Kohorte, Unpublizierte Erfahrung). Für die genetische Diagnostik bedeutet dies, dass in vielen Fällen heute noch kein Nachweis der genetischen Ursache möglich ist, und damit auch die Klärung des Vererbungsmodus, die vor allem für Familien mit einem sporadischen Fall von AOS stets unklar ist, nicht immer gelingt. Unsere Ergebnisse in Familie 3 sind ein Beispiel dafür, dass auch bei Einzelfällen ohne elterliche Konsanguinität ein rezessiv vererbtes AOS grundsätzlich in Frage kommt, wie es auch bei anderen autosomal-rezessiv vererbten Krankheiten der Fall ist. Die hier aufgezeigten klaren Genotyp-Phänotyp-Korrelationen für das *DOCK6*-assoziierte AOS legen nahe, dass in der Diagnostik bei Vorliegen von zerebralen und/oder okulären Anomalien die Sequenzierung von *DOCK6* oberste Priorität hat. Es ist gut möglich, dass auch für andere genetische Subtypen von AOS noch signifikante Phänotyp-Assoziationen identifiziert werden, was künftig die Diagnostik deutlich vereinfachen und beschleunigen kann. Die bisher noch aufwendige Analyse aller AOS-Gene könnte so erspart bleiben. Auf längere Sicht wird aber

die genetische Diagnostik hinsichtlich AOS aufgrund der sich abzeichnenden großen Heterogenität wahrscheinlich eher den Weg der „Multi-Gen-Panel-Analyse“ mit Hilfe der neuen Sequenzierungstechnologien gehen.

Tabelle 10: Bisher bekannte Gene für AOS in chronologischer Reihenfolge.

Gen	Lokus (Chromosom)	Vererbung	Typischer Phänotyp	Referenz Erstbeschreibung
<i>ARHGAP31</i>	3q13.33	autosomal-dominant	ACC, TTLD	Southgate et al. 2011
<i>DOCK6</i>	19p13.2	autosomal-rezessiv	"Orstavik-Typ" (ACC, TTLD, Neurologische und okuläre Anomalien)	Shaheen et al. 2011
<i>RBPJ</i>	4p15.2	autosomal-dominant	ACC, TTLD	Hassed et al. 2012
<i>EOGT</i>	3p14.1	autosomal-rezessiv	ACC, TTLD	Shaheen et al. 2013
<i>NOTCH1</i>	9q34.3	autosomal-dominant	ACC, TTLD, kardiovaskuläre Anomalien	Stittrich et al. 2014
<i>DLL4</i>	15q15.1	autosomal-dominant	ACC, TTLD	Meester et al. 2015

4.4 Schädigungsmuster und pathophysiologische Überlegungen zum *DOCK6*-assozierten AOS

Die Pathophysiologie der phänotypischen Veränderungen bei Patienten mit Mutationen in *DOCK6* ist nicht genau erforscht. Für die klassischen Merkmale des AOS, nämlich ACC und TTLD, wird schon lange eine Störung der Vaskulogenese als Grundlage angenommen (Snape et al. 2009). Die Mikrozephalie, die periventrikulären Kalzifikationen sowie die neurologischen Schädigungen, bei Patienten mit *DOCK6*-Mutationen legen die Vermutung nahe, dass es sich auch hierbei eher um Folgen einer disruptiven vaskulären Störung, als um eine primäre Fehlentwicklung handelt.

Beispielsweise können die Veränderungen, welche als Kalzifikationen beschrieben wurden, auch durch vorhergegangene Mikroblutungen entstanden sein. Auch die am Auge beobachteten Veränderungen, wie Mikrophthalmie und Netzhautabhebungen, sind vereinbar mit vaskulärer Disruption.

Die Frage, warum *DOCK6*-Defekte in einem deutlich höheren Maß die vaskuläre Integrität von ZNS und Augen beeinträchtigen, ist bisher nicht geklärt, genauso wie die genaue Pathologie der vermuteten Gefäßläsionen beim AOS. Dies wird Gegenstand zukünftiger Forschungsanstrengungen sein.

5 Zusammenfassung

Im Jahre 1945 beschrieben Adams und Oliver als erste ein Syndrom mit Aplasia cutis congenita (ACC) und terminale Extremitätendefekten (TTLD), welches einem autosomal-dominanten Erbgang folgte. Über die Jahre kamen zahlreiche weitere Fallberichte hinzu, die zusätzliche assoziierte Anomalien wie Cutis marmorata telangiectatica congenita (CMTC), Herz-Gefäß-Anomalien, neurologische und okuläre Anomalien beschreiben, sowie auch die Existenz autosomal-rezessiver Vererbung. Southgate *et al.* beschrieben 2011 Mutationen im *ARHGAP31*-Gen als kausal für zwei autosomal-dominante AOS-Familien. Kurz darauf wurden von Shaheen *et al.* *DOCK6*-Mutationen bei zwei Familien mit autosomal-rezessiver Vererbung des Adams-Oliver-Syndrom (AOS) publiziert.

In dieser Studie konnten in einer großen Kohorte von insgesamt 41 unabhängigen AOS-Familien vier verschiedene Mutationen in drei Familien nachgewiesen werden. In allen Fällen lag ein autosomal-rezessiv vererbtes AOS aufgrund von Mutationen in *DOCK6* vor. Damit waren *DOCK6*-Mutationen für 7,3 % der Fälle in dieser Kohorte verantwortlich. *ARHGAP31*-Mutationen konnten nicht nachgewiesen werden.

Zwei der Index-Patienten mit *DOCK6*-assoziiertem AOS stammten von konsanguinen Eltern und wiesen jeweils homozygote Mutationen auf, einer stammte von nicht verwandten Eltern und hatte zwei compound-heterozygote Mutationen. In allen Familien konnte die Segregation der Mutation(en) mit dem Phänotyp im Sinne eines autosomal-rezessiven Modells bestätigt werden.

Drei der krankheits-assoziierten *DOCK6*-Mutationen waren neu, während eine bereits durch Shaheen *et al.* beschrieben war. Die identifizierten pathogenen Mutationen umfassten zwei Frameshift-Mutationen, c.1300delC in Exon 12 (p.(Gln434Argfs*21)) und die bereits bekannte Mutation c.1362_1365delAACT ebenfalls in Exon 12 (p.(Thr455Serfs*24)). Bei einer weiteren Mutation handelte es sich um eine Splice Site Mutation c.4491+1G>A. Die Auswirkungen dieser Mutation wurde zusätzlich auf der cDNA-Ebene überprüft, wodurch ein Skipping von Exon 35 nachgewiesen werden konnte (r.4339_4491del), p.(Phe1447_His1497del)). Für all diese Mutationen ist ein weitgehender oder vollständiger Verlust der Funktion oder Expression der Genprodukte passend zur loss-of-funktion-Hypothese anzunehmen.

Ein Patient aus einer der konsanguinen Familien wies eine homozygote Missense-Mutation in Exon 25 auf, c.3047T>C (p.(Leu1016Pro)). Hier sprachen die Segregation in der Familie, die

hohe Konservierung der betroffenen Aminosäure, das Fehlen in den Datenbanken und die *in silico*-Prädiktion mit verschiedenen Programmen für die Pathogenität dieser Veränderung. Weiter lag der *DOCK6*-Lokus bei dem Patienten in einem 22Mb großen homozygoten Bereich, der bereits vorher durch Homozygotie-Kartierung mittels SNP-Array nachgewiesen worden war. Eine Klärung der genauen funktionellen Auswirkung dieser Mutation war nicht möglich.

Phänotypisch war auffällig, dass alle drei Patienten mit *DOCK6*-Mutationen zu den typischen AOS-Zeichen (ACC und TTLD) zusätzlich noch schwerwiegende neurologische und okuläre Pathologien aufwiesen. Diese umfassten mentale Retardierung, Epilepsie, Erweiterung der Hirnventrikel, Mikrophthalmie und Visusminderungen bis hin zur Blindheit. Dass diese Assoziation mit Veränderungen des Nervensystems und der Augen gehäuft bei autosomal-rezessiven Fällen auftritt, war bereits in einer Übersichtsarbeit von Snape *et al.* aus dem Jahr 2009 empirisch herausgearbeitet worden. Eine erste Beschreibung als möglicher Subtyp des AOS stammte von Orstavik *et al.* aus dem Jahr 1995. Die Ergebnisse dieser Studie im Zusammenhang mit weiteren in der Literatur beschriebenen Fällen zeigen, dass Mutationen in *DOCK6* signifikant mit dem „Orstavik-Typ“ des AOS assoziiert sind. Diese Erkenntnis kann künftig auch bei der Priorisierung der zu sequenzierenden Gene in der genetischen Diagnostik bei AOS-Patienten berücksichtigt werden und kann bei der prognostischen Einschätzung eines jungen Kindes mit gesicherter *DOCK6*-Mutation, insbesondere bei der Auswahl der durchzuführenden Untersuchungen und Interpretation der Ergebnisse, hilfreich sein.

6 Literaturverzeichnis

1. Adams, F. H. and Oliver, C.P.: „Hereditary deformities in man: Due to arrested development.“ *Journal of Heredity*. (1945)
2. Adzhubei, I. A., et al.: „A method and server for predicting damaging missense mutations.“ *Nature Methods* 7(4): 248–249. (2010)
3. Agencourt Bioscience Corporation: „AGENCOURT® CLEANSEQ®: Dye-Terminator Removal.“ (2006)
4. Agencourt Bioscience Corporation: „AGENCOURT® AMPURE® XP: PCR PURIFICATION.“ (2009)
5. Amor, D. J., et al.: „Polymicrogyria associated with scalp and limb defects: variant of Adams-Oliver syndrome.“ *American journal of medical genetics* 93(4): 328–334. (2000)
6. Applied Biosystems: „BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit: Protocol.“ (2010)
7. Bajpai, M. and Pal, K.: „Aplasia cutis cerebri with partial acrania[mdash]Total reconstruction in a severe case and review of the literature.“ *Journal of Pediatric Surgery* 38(2): E4. (2003)
8. Brunak, S., et al.: „ Prediction of Human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA Sequence.“ *Journal of Molecular Biology* 220: 49-65 (1991)
9. Burton, B. K., et al.: „Congenital scalp defects with distal limb anomalies: report of a family.“ *Journal of medical genetics* 13(6): 466–468. (1976)
10. Chemagen Technologie: „ chemagic DNA Blood100 Kit“ (2012)
11. Der Kaloustian, V. M., et al.: „Possible common pathogenetic mechanisms for Poland sequence and Adams-Oliver syndrome.“ *American journal of medical genetics* 38(1): 69–73. (1991)
12. ENSEMBL 86: ENSEMBL Genome Browser „<http://oct2016.archive.ensembl.org>“ (04.11.2016)
13. Fryns, F. P., et al.: „Congenital scalp defect, distal limb reduction anomalies, right spastic hemiplegia and hypoplasia of the left arteria cerebri media. Further evidence that interruption of early embryonic blood supply may result in Adams-Oliver (plus) syndrom.“ *Clinical Genetics* 50: 505-509. (1996)
14. Hassed, S. J., et al.: „RBPJ mutations identified in two families affected by Adams-Oliver syndrome.“ *American journal of human genetics* 91(2): 391–395. (2012)
15. GE Healthcare: „illustra GenomiPhi V2 DNA Amplification Kit: Product Web Protocol.“ (2006)
16. Lehman, A., et al.: „Diffuse Angiopathy in Adams-Oliver syndrome Associated with Truncating *DOCK6* Mutations.“ *American journal of medical genetics* 164(10): 2656-

- 2662 (2014)
17. Lek, M., et al.: „Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans.“ *Nature* 536: 285–291 (2016)
 18. Li, B., et al.: „Automated inference of molecular mechanisms of disease from amino acid substitutions.“ *Bioinformatics* 25: 2744-50 (2009)
 19. Kent W.J., et al.: „The Human Genome Browser at UCSC.“ *Genome Research* 12:996-1006 (2002)
 20. Kitts, A., et al.: „The Database of Short Genetic Variation (dbSNP).“ *The NCBI Handbook – 2nd edition* (2014)
 21. Kuster, W., et al.: „Congenital scalp defects with distal limb anomalies (Adams-Oliver syndrome): report of ten cases and review of the literature“ *American journal of medical genetics* 31(1): 99-115. (1991)
 22. Klinger, G. and Merlob, P.: „Adams-Oliver syndrome: autosomal recessive inheritance and new phenotypic-anthropometric findings.“ *American journal of medical genetics* 79(3): 197–199. (1998)
 23. Life Technologies Corporation: „SuperScript SuperScript® III First-Strand Synthesis System for RT-PCR.“ (2013)
 24. Meester, J. A. N., et al.: „Heterozygous Loss-of-Function Mutations in *DLL4* Cause Adams-Oliver Syndrome.“ *The American Journal of Human Genetics* 97, 475–482. (2015)
 25. McGoey, R. R. and Lacassie, Y.: „Adams–Oliver syndrome in siblings with central nervous system findings, epilepsy, and developmental delay: Refining the features of a severe autosomal recessive variant.“ *American Journal of Medical Genetics Part A* 146(4): 488–491. (2008)
 26. Orstavik, K. H., et al.: „Aplasia cutis congenita associated with limb, eye, and brain anomalies in sibs: a variant of the Adams-Oliver syndrome?“ *American journal of medical genetics* 59(1): 92–95. (1995)
 27. PreAnalytiX: „PAXgene™ 96 Blood RNA Kit Handbook: For isolation of cellular RNA from whole blood.“ (2003)
 28. QIAGEN: „QIAamp DNA Mini Kit and QIAamp DNA Blood Mini Kit.“ (2001)
 29. Reese, M. G., et al.: „Improved splice site detection in Genie.“ *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology* 4(3): 311–323.(1997)
 30. Ridley, A. J., et al.: „The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling.“ *Cell* 70: 401-410. (1992)
 31. Sanger, F., et al.: „DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. 1977.“ *Biotechnology (Reading, Mass.)* 24: 104–108. (1992)

32. Schwarz, J. M., et al.: „MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations.“ *Nature Methods* 7(8): 575–576. (2010)
33. Shaheen, R., et al.: „Mutations in EOGT confirm the genetic heterogeneity of autosomal-recessive Adams-Oliver syndrome.“ *American journal of human genetics* 92(4): 598–604. (2013)
34. Shaheen, R., et al.: „Recessive mutations in DOCK6, encoding the guanidine nucleotide exchange factor DOCK6, lead to abnormal actin cytoskeleton organization and Adams-Oliver syndrome.“ *American journal of human genetics* 89(2): 328–333. (2011)
35. Snape, K. M. G., et al.: „The spectra of clinical phenotypes in aplasia cutis congenita and terminal transverse limb defects.“ *American Journal of Medical Genetics Part A* 149(8): 1860–1881. (2009)
36. Southgate, L., et al.: „Gain-of-Function Mutations of ARHGAP31, a Cdc42/Rac1 GTPase Regulator, Cause Syndromic Cutis Aplasia and Limb Anomalies.“ *The American Journal of Human Genetics* 88(5): 574–585. (2011)
37. Stittrich, A.-B., et al.: „Mutations in NOTCH1 Cause Adams-Oliver Syndrome.“ *The American Journal of Human Genetics* 95(3): 275–284. (2014)
38. Sukalo, M. and Tilsen, F., et al.: „DOCK6 Mutations Are Responsible for a Distinct Autosomal-Recessive Variant of Adams-Oliver Syndrome Associated with Brain and Eye Anomalies.“ *HUMAN MUTATION*, 36(6): 593–598. (2015)
39. Tapon, N. and Hall, A.: „Rho, Rac and Cdc42 GTPases regulate the organization of the actin cytoskeleton.“ *Current Opinion in Cell Biology* 9: 86-92. (1997)
40. Temtamy, S. A., et al.: „Adams-Oliver syndrome: further evidence of an autosomal recessive variant.“ *Clinical dysmorphology* 16(3): 141–149. (2007)
41. Thermo Fisher Scientific: „NanoDrop 2000/2000c Spectrophotometer V1.0 User Manual.“ (2009)
42. Toriello, H. V., et al.: „Scalp and limb defects with cutis marmorata telangiectatica congenita: Adams-Oliver syndrome?“ *American journal of medical genetics* 29(2): 269–276. (1988)
43. Wildeman, M., et al.: „Improving sequence variant descriptions in mutation databases and literature using the Mutalyzer sequence variation nomenclature checker.“ *Human Mutation* 29(1): 6–13. (2008)
44. Vega, F. M., and Ridley, A. J.: „Rho GTPases in cancer cell biology.“ *FEBS Letters* 582: 2093-2101. (2008)
45. Yates, A., et al.: „Ensembl 2016.“ *Nucleic Acids Research* 44: D710-716. (2016)

7 Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildung 1: Exon-Intron-Struktur des ARHGAP31-Gens (Transkript <i>ARHGAP31</i> -001; ENSEMBL 86).....	4
Abbildung 2: Expression von <i>ARHGAP31</i> mRNA in Mausembryonen.....	5
Abbildung 3: Exon-Intron-Struktur des DOCK6-Gens (Transkript <i>DOCK6</i> -001; ENSEMBL 86).....	6
Abbildung 4: Expression von DOCK6 in Mausembryonen.	7
Abbildung 5: Flussschema der Sequenzierung.....	11
Abbildung 6: Aufreinigung des PCR-Produkts.....	16
Abbildung 7: Aufreinigung des Sequenzierungsprodukts.....	18
Abbildung 8: PCR-Produkte <i>ARHGAP31</i> nach Protokoll im Vergleich zur DNA-Leiter.....	26
Abbildung 9: PCR-Produkte <i>DOCK6</i> nach Protokoll im Vergleich zur DNA-Leiter Ausreichende	26
Abbildung 10: Stammbaum Patient 1.....	31
Abbildung 11: Legende für Stammbäume	31
Abbildung 12: Klinische Fotos Patient 1.....	32
Abbildung 13: Patient 1 cCT und Orbita-CT	32
Abbildung 14: Stammbaum Patient 2.....	34
Abbildung 15: Klinische Fotos Patient 2.....	35
Abbildung 16: Stammbaum für Patient 3	36
Abbildung 17: Exon Skipping des Exons 35 bei Patient 3.....	37
Abbildung 18: Klinische Fotos Patient 3.....	38
Abbildung 19: Patient 3 MRT Schädel, Röntgen von Hand und Fuß.....	38
Abbildung 20: Konservierung der Missense-Mutation p.(Leu1016Pro) (BLAST Alignment)	45
Tabelle 1: GenomiPhi V2 Protokoll	12
Tabelle 2: Reagenzien der PCR	14
Tabelle 3: Reaktionsprotokoll der PCR	14
Tabelle 4: Reagenzien der Sequenzierungsreaktion.....	17
Tabelle 5: Reaktionsprotokoll der Sequenzierungsreaktion	17
Tabelle 6: Varianten <i>ARHGAP31</i>	27
Tabelle 7: Varianten mit wahrscheinlich nicht pathogener Wirkung oder unklarer Signifikanz bei <i>DOCK6</i>	28
Tabelle 8: Mutationen und Prädiktion (Patient = Pat.).....	29
Tabelle 9: Vergleichstabelle der Patienten.....	40
Tabelle 10: Bisher bekannte Gene für AOS in chronologischer Reihenfolge.....	48

8 Ehrenerklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

DOCK6- und ARHGAP31-Mutationen bei Adams-Oliver-Syndrom

im Institut für Humangenetik der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg mit Unterstützung durch Prof. Dr. Martin Zenker und Frau Dipl. Biol. Dr. Maja Sukalo

ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Magdeburg, den

Felix Tilsen

9 Darstellung des Bildungsweges

Schulbildung:

Abitur: Erreicht am 25.06.2007 an der
St. Ursula Schule Hannover

Studium:

Studium der Humanmedizin an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg vom Wintersemester 2007/08 bis zum Sommersemester 2014

Erlangen des Physikums an der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg im WS 2010/11

Doktorand im Institut für Humangenetik von Herrn Prof. Dr. Zenker zur Untersuchung der genetischen Grundlage des Adams-Oliver-Syndroms seit November 2011

PJ der Inneren Medizin an der Universität Magdeburg

PJ der Mund-, Kiefer- und Gesichtschirurgie in der BG Klinik in Tübingen bei Prof. Dr. Dr. Reinert

PJ der Chirurgie an der Universitätsklinik Tübingen

Bestehen des Staatsexamens an der Universität Magdeburg im Sommersemester 2014

Publikation der Arbeit „**DOCK6 Mutations Are Responsible for a Distinct Autosomal-Recessive Variant of Adams–Oliver Syndrome Associated with Brain and Eye Anomalies**“ mit gemeinsamer Erstautorschaft mit Frau Maja Sukalo 03/2015

Studium der Zahnmedizin an der Eberhard-Karl Universität Tübingen beginnend im Sommersemester 2015

Beruf:

Assistenzarzt in Weiterbildung zum Mund-, Kiefer-, und Gesichtschirurgen an der Berufsgenossenschaftlichen Unfallklinik Tübingen seit 10/2014

Magdeburg, den

Felix Tilsen

10 Anhang

10.1 Primertabellen

Tabelle 11: Primertabelle *DOCK6*

EXON	FP	RP	Amplikonlänge in bp
1	cctctcctaggtagaaagagc	cggaaaggggtgaattg	429
2	gccctcggcctatttatttc	taggaccaggacaggcactc	368
3	accgccctcctatttgagt	gcctctgtgaatccttctgc	479
4	ggcaggacagtgtaacctt	gggacaatgggcagatacac	249
5	caaaactgtctggtggagca	caaggctgttgggtcattt	354
6	cccaggtgaccttagagtg	tgcccaataaacactgatcg	493
7	cagggatggaaagacgggta	tggcacttaaggattggaga	400
8 + 9	ggcctcaagaggagtg	gccctgattacccttctgg	497
10	aggccaacactaaccttga	gcgcagcttctctagcttct	378
11	gaagtggacacagccaaggt	acagttcggccagcagag	370
12 + 13	ctctgtgcccgaactgt	cctggcacagtaggtgctct	494
14	agtctgccctgactacacagc	cccttcatgcctacacacc	398
15 + 16	cccagcctcatgacctactc	catcgatgctgccttatgtg	474
17	gcagacagcagagacagtgg	cagacactgggagacagaagg	398
18	agacaccctgggcttact	ctcccaggattgacaggaag	293
17 + 18	gggcctagcagcaataagg	acaggaaggaaggcaggtg	496
19	tcattaccctgtgtctcca	ccatcggcaactgttactca	395
20	ggaccagcttfaagggaag	gccaaagggtcacagaagac	490
21	tgatccctcaaatcctgatg	tggccaagttgatctcgaa	400
22	gctgagtaggaaggactgg	actctgctcccagagtgc	374
23	agggcactccactcctctt	ccaaagtgtgggattacagg	370
24	aacctaccttcagcccact	cagcaaagtggattcctggt	456
25 + 26	gatcttggtgagagccaagc	gagggaacatagagatgga	522
27	actccgtgccctgttacatc	gtgcaacaggaatgcctat	461
28	tgagcagagctctgtctagc	tccattacaggggagaaacc	450
29	gccatgaggggaagacttctg	tgagatgaatcctggccaat	337
30	tccactttgaatgagagaagtca	cagagtctctgcacaaagaca	400
31	gagcacaagaaaggatgg	cgcattgtgtacggtgatgat	360
32	ttcatgcctgtgcatttctc	acaaggtttaccgttagcc	419
33	gagagagctcagccatggag	gggtcagaaatccaggtgtt	296
34	gtgccctgtgtctctgact	ctgggattagaggcatgagc	316
35	acttggccaaagaggacaga	cctcactcctgtatggttga	354
36 + 37	cggcaggttgagcagact	atccctgttctccctgcac	520
38	gaggagattggctggtcctt	gacaggatgtcgtcgagat	451
39	ccctcgtggctgagtacct	gctggaagggtctaggaagc	378
40 + 41	gctcacaaggagatgggta	gtgttactgatggctgctg	408
42 + 43	gtcctcacactcccactctg	gtcccaggaacagcact	486
44	ggattccaaacatccagac	gaggtccgtgaaccactt	479
45 + 46	cgactggcttcgatcagg	taatgggaatcgggcaga	511
47	acctcctattcgggtcttt	tccaagctaccagcaaacat	400
48	atgtgggctgggaggtctat	atgtgtggatggggcagt	397

Tabelle 12: Primer für cDNA-Untersuchung

Name	Sequenz	Amplikonlänge in bp
Primer 32-33F	ggacaagaccaaggatgaa	660
Primer 37-38R	cgggcaattctgtacatgagg	-

Tabelle 13: Primertabelle ARHGAP31

EXON	FP	RP	Amplikonlänge in bp
1	gttcttccatcttccgatgc	gcacaggcctggaatacatta	347
2	tgaaggaacatcacctacca	ctgccacacttcctcagtt	387
3	ttcctagggcctggagtaga	ttcctcaccacgctaagat	430
4	gctggagatgagggcctga	tcaggtgattggagactg	398
5	tcaatctgacatcttccaatg	aaatgaccacttaagccacaga	378
6	tttaggagatgagccttgtgc	cagcatcacacagccaaca	367
7	aagaatggaggactgtgga	actgccatcttggctctgag	378
8	tcagagccattcataactgagg	aacattgggagaagctgcat	459
9	tgggtacttaacagcctgacc	caggcatgacagcttataaagg	231
10a	cgtgtgcctgcccttact	caaagggtcggagatggt	482
10b	accggaacagctgaaggttt	accgcactatattgccttgc	451
11	aaacagggccaggagacag	gtccctttggcagaaactga	498
12a	attgctgaactggcacagg	ttcactgttcttggag	499
12b	ccctctggaggtgtggacta	acgatctcaacctcctggt	474
12c	agctgaagtccaagacagc	agagggtcagaattcctctctg	499
12d	ttgccagagccattctcta	agggtccaagttgagggaag	488
12e	agagcagcaaggagagttca	gctcctctccagaggctga	500
12f	ccttcatggtaaaatgtgc	ggggaaaggaggactgaataa	500
12g	aagcgcattgcagagacaga	aactgtgcctggaatatgg	499