

Aus dem Institut für Humangenetik
der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg
Direktor: Prof. Dr. med. M. Zenker

Neue Mutationen des *NFIX*-Gens beim Marshall-Smith-Syndrom und
NFIX-related-Overgrowth-Syndrom

Dissertation

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät
der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg

vorgelegt von
aus
Magdeburg

Dorothee Neubauer
Staßfurt
2017

Für meinen Onkel Dr. med. René Zacharias.

Dokumentationsblatt

Bibliographische Beschreibung:

Neubauer, Dorothee

Neue Mutationen des *NFIX*-Gens beim Marshall-Smith-Syndrom und *NFIX*-related-Overgrowth Syndrom.

- 2017. - 89 Bl.: 22 Abb., 17 Tab.

Kurzreferat

Im Jahr 2010 fanden Malan et al. heraus, dass Mutationen im *NFIX*-Gen verantwortlich sind für das sehr seltene Marshall-Smith-Syndrom (MSS), welches durch mentale Retardierung, dysharmonische Knochenreifung, Kleinwuchs, respiratorische Komplikationen, Kyphoskoliose sowie durch eine charakteristische Gesichtsmorphologie gekennzeichnet ist. Die Mutationen befinden sich hier innerhalb der C-terminalen CTF/NFI-Domäne des Gens für den Nuclear Factor I/X (*NFIX*). Außerdem konnten für eine Patientengruppe mit einem dem Sotos-Syndrom ähnelndem Phänotyp, im Folgenden *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom genannt, größere Deletionen, die das *NFIX*-Gen umfassen, und Mutationen in der N-terminalen DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne als genetische Ursache identifiziert werden. Dieses Syndrom wurde bisher auch als Sotos-like-Syndrom, Sotos-Syndrom 2 oder Malan-Syndrom bezeichnet. Es wurde vermutet, dass diesem Krankheitsbild eine Haploinsuffizienz und dem MSS ein dominant negativer Effekt der Mutationen im *NFIX*-Gen zu Grunde liegt.

Im Rahmen dieser Dissertation wurde eine *NFIX*-Mutationsanalyse bei elf MSS-Patienten und 35 Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp durchgeführt. Die angewandten Methoden zur Gen-Analyse umfassten hauptsächlich die DNA-Sequenzanalyse und eine im Rahmen der vorliegenden Arbeit etablierte Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA). Dabei wurden bei sieben MSS-Patienten Mutationen innerhalb der CTF/NFI-Domäne des *NFIX*-Gens, einschließlich einer neuen rekurrenten Deletion der *NFIX*-Exons 6 und 7 nachgewiesen sowie bei einem Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichen Phänotyp eine kausale Mutation in der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne.

Es wurde somit ein bisher unbekannter Mutationsmechanismus durch diese Arbeit aufgedeckt und dadurch eine neue Methode zur Diagnostik des MSS etabliert. Die Bruchpunkte der rekurrenten Exon 6-7-Deletion konnten genau kartiert und die Deletion dadurch auf Rekombinationsereignisse zwischen Alu-Y-Repeats zurückgeführt werden. Weiterhin konnte ein neuer Fall einer *NFIX*-Mutation bei einem Patienten mit Sotos-ähnlichem Phänotyp beschrieben werden. Zudem konnte durch die Phänotyp-Analyse dargelegt werden, dass es sich beim MSS und *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom am ehesten um ein kontinuierliches Spektrum eines Krankheitsbildes handelt.

Schlüsselworte: *NFIX*, *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom, Marshall-Smith-Syndrom, Haploinsuffizienz, dominant negativer Effekt, NMD (Nonsense-mediated mRNA decay)

Inhaltsverzeichnis

Widmung.....	I
Dokumentationsblatt	II
Inhaltsverzeichnis.....	III
Abkürzungsverzeichnis	V
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	VII
1. Einleitung.....	1
1.1 Das Marshall-Smith-Syndrom	1
1.1.1 Definition.....	1
1.1.2 Epidemiologie.....	1
1.1.3 Ätiopathogenese	2
1.1.4 Klinik.....	2
1.1.5 Diagnose	5
1.1.6 Differentialdiagnose	5
1.2 Das <i>NFIX</i> -related Overgrowth Syndrom.....	6
1.2.1 Das Großwuchssyndrome	6
1.2.2 Bisherige Mutationen bei Patienten mit <i>NFIX</i> -related-Overgrowth-Syndrom	6
1.2.3 Der Phänotyp des <i>NFIX</i> -related-Overgrowth-Syndroms.....	7
1.3 Das <i>NFIX</i> -Gen	10
1.3.1 Die <i>NFI</i> -Genfamilie.....	10
1.3.2 Der Aufbau der <i>NFI</i> -Gene.....	11
1.3.3 Die Funktion des <i>NFIX</i> -Gens	12
2. Zielsetzung.....	14
3. Material und Methoden.....	15
3.1 Die Patientenkohorte.....	15
3.2 Geräte und Chemikalien.....	16
3.2.1 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen.....	16
3.2.2 Lösungen und Chemikalien	18
3.2.3 Geräte und Ausrüstung	20
3.3 Software und Datenbanken	22
3.4 Primer- und Sondendesign	23
3.5 PCR (Polymerase Chain Reaction).....	24
3.6 Gelelektrophorese	25

3.7	Aufreinigung des PCR-Ansatzes	26
3.8	Sequenzier-Reaktion	26
3.9	Aufreinigung des Sequenzier-Ansatzes	27
3.10	Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen	27
3.11	MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)	28
4.	Ergebnisse.....	33
4.1	Ergebnisse für die Marshall-Smith-Syndrom-Patienten	33
4.1.1	DNA-Sequenzanalyse.....	33
4.1.2	MLPA-Analyse.....	37
4.2	Ergebnisse für die Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp	40
4.2.1	DNA-Sequenzanalyse.....	40
4.1.2	MLPA-Analyse.....	41
5.	Diskussion	42
5.1	Marshall-Smith-Syndrom.....	42
5.1.1	Der dominant negative Effekt als Ursache des Marshall-Smith-Syndroms	42
5.2.2	Die Homogenität des Marshall-Smith-Syndroms.....	47
5.1	<i>NFIX</i> -related-Overgrowth-Syndrom.....	48
5.1.1	Die Haploinsuffizienz von <i>NFIX</i> als Ursache des <i>NFIX</i> -related-Overgrowth-Syndroms	48
5.1.2	Die Heterogenität des „Sotos-like“-Phänotyps.....	53
5.1.2	Das <i>NFIX</i> -related-„Sotos-like“-Syndrom und das Marshall-Smith-Syndrom als kontinuierliches Spektrum eines Krankheitsbildes mit variierendem Schweregrad.....	54
6.	Zusammenfassung	57
7.	Anhang.....	59
8.	Literaturverzeichnis	68
	Danksagung	77
	Erklärung.....	78
	Lebenslauf	79
	Verzeichnis der bisherigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen	80

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
bp	Basenpaar(e)
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosidtriphosphat
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
IQ	Intelligenzquotient
dTTP	Desoxythymidintriphosphat
EA2	Episodische Ataxie Typ 2
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
F-Primer	Forward Primer (vorwärts gerichteter Primer)
FHM1	familiäre hemiplegische Migräne Typ 1
FISH	Fluoreszenz-in-situ-Hybridisierung
HCl	Chlorwasserstoff (Salzsäure)
k. M.	Kein Material vorhanden
Kap.	Kapitel
Kb	Kilobasenpaare
<i>KCNQ1OT1</i>	<i>KCNQ1</i> -Overlapping Transcript 1 (= <i>LIT1</i>)
L	Liter
LHS	Left Hybridizing Sequence (linke Hybridisierungssequenz)
LPO	Left Probe Oligonucleotide (linkes Sondenoligonukleotid)
LIT1	Long QT Intronic Transcript 1 (= <i>KCNQ1OT1</i>)
M	Mol
Mb	Megabasenpaare
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
miRNA	MicroRNA
ml	Milliliter
mM	Millimol

MLPA	Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification
mRNA	messenger RNA (Boten-RNA)
MSS	Marshall-Smith-Syndrom
NAHR	Nicht allelische homologe Rekombination
NaOH	Natriumhydroxid
<i>NFIX</i>	Nuclear Factor I/X
NMD	Nonsense-mediated mRNA decay
<i>NSD1</i>	Nuclear receptor binding SET domain protein 1
OFC	Occipitofrontal circumference (okzipitofrontaler Umfang)
PCR	Polymerase Chain Reaction (Polymerase Kettenreaktion)
pmol	Picomol
PTC	Premature termination codon (frühzeitiges Stopcodon)
RHS	Right Hybridizing Sequence (rechte Hybridisierungssequenz)
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	revolutions per minute (Umdrehungen pro Minute)
RPO	Right Probe Oligonucleotide (rechtes Sondenoligonukleotid)
R-Primer	Reverse Primer (rückwärts gerichteter Primer)
SINE	Short interspersed nuclear element (kurzes, eingestreutes Kernsequenzelement)
SNP	Single nucleotide polymorphism (Einzelnukleotid-Polymorphismus)
SRO	Smallest region of overlap (kleinste gemeinsame Region der Überlappung)
STK11	Serin/Threonin Kinase 11
TBE	Tris-Borat-EDTA
TE	Tris/HCL + EDTA
T_m	Melting temperature (Schmelztemperatur)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
UTR	Untranslated region (untranslatierte Region)
UV	ultraviolett
v.a.	vor allem
vgl.	vergleiche
z.B.	zum Beispiel
ZNS	zentrales Nervensystem
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. 1.1	S. 3	Typische faziale Dysmorphien und Skellettveränderungen bei MSS-Patienten.
Abb. 1.2	S. 9	Typischer Phänotyp der <i>NFIX</i> -related-Overgrowth-Patienten.
Abb. 1.3	S. 11	Allgemeiner Aufbau der NFI-Proteine.
Abb. 1.4	S. 14	<i>Nfix</i> -Defizienz im Mausmodell.
Abb. 3.1	S. 29	MLPA-Prinzip.
Abb. 3.2	S. 31	Lage der MLPA-Sonden innerhalb des <i>NFIX</i> -Gens.
Abb. 4.1	S. 33	Agarose-Gelelektrophorese.
Abb. 4.2	S. 35	Sequenzchromatogramm des MSS-Patienten P36.
Abb. 4.3	S. 35	Sequenzchromatogramm des MSS-Patienten P37.
Abb. 4.4	S. 36	Sequenzchromatogramm des MSS-Patienten P38.
Abb. 4.5	S. 36	Sequenzchromatogramm des MSS-Patienten P46.
Abb. 4.6	S. 37	Normaler MLPA-Dosis-Blot einer Kontroll-DNA.
Abb. 4.7	S. 38	Deletionen von Exon 6 und 7 im Standard-MLPA-Dosis-Blot.
Abb. 4.8	S. 39	Deletionen von Exon 6 und 7 sowie Intron 6 und 7 im modifizierten MLPA-Dosis-Blot.
Abb. 4.9	S. 40	Minimale und maximale Ausdehnung der Deletionen von Intron 5 bis Intron 7 des <i>NFIX</i> -Gens.
Abb. 4.10	S. 41	Sequenzchromatogramme der Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp.
Abb. 4.11	S. 41	MLPA-Dosis-Blot von Patient 5.
Abb. 5.1	S. 42	Lokalisation der Mutationen der MSS-Patienten.
Abb. 5.2	S. 45	Mutierte <i>NFIX</i> -Transkripte.
Abb. 5.3	S. 46	Lokalisation der Alu-Y-Repeats.
Abb. 5.4	S. 48	Bisher identifizierte <i>NFIX</i> -Mutationen bei MSS-Patienten.
Abb. 5.5	S. 53	Lokalisation der <i>NFIX</i> -Mutation von Patient 2.
Tabelle 4.1	S. 34	<i>NFIX</i> -Mutationen der MSS-Patienten.
Tabelle 7.1	S. 59	<i>NFIX</i> -related-Overgrowth-Syndrom-Patienten.
Tabelle 7.2	S. 60	MSS-Patienten.
Tabelle 7.3	S. 61	PCR-und Sequenzierungsprimer.
Tabelle 7.4	S. 62	MLPA-Sonden.
Tabelle 7.5	S. 63	Reagenzien für die PCR-Reaktion.
Tabelle 7.6	S. 63	Reagenzien für die Sequenzier-Reaktion.
Tabelle 7.7	S. 63	Reagenzien für den Hybridisierungs-Mastermix.

Tabelle 7.8	S. 64	Reagenzien für den Ligase-Mastermix.
Tabelle 7.9	S. 64	Reagenzien für den Polymerase-Mastermix.
Tabelle 7.10	S. 64	Reagenzien für den Lade-Mix.
Tabelle 7.11	S. 65	Probe-Mix 1.
Tabelle 7.12	S. 65	Probe-Mix 2.
Tabelle 7.13	S. 66	Thermocyclerprogramm „Erlangen 65“.
Tabelle 7.14	S. 66	Thermocycler-Programm „ABI SEQ 2 98C“.
Tabelle 7.15	S. 67	Thermocyclerprogramm „MLPA 1“.
Tabelle 7.16	S. 67	Thermocyclerprogramm „MLPA 2“.

1. Einleitung

1.1 Das Marshall-Smith-Syndrom

1.1.1 Definition

Im Jahr 1971 wurde das Marshall-Smith-Syndrom (MSS) (MIM 602535) erstmals von R.E. Marshall, C.B. Graham, C.R. Scott, und D.W. Smith beschrieben. Sie berichteten über zwei nicht verwandte männliche Kinder mit ungewöhnlichen Gesichtszügen, Gedeihstörung, Entwicklungsverzögerung und akzeleriertem Knochenalter (Marshall et al., 1971)

Das MSS wurde in die Klassifikation der Großwuchs-Syndrome einbezogen, da die betroffenen Kinder bei der Geburt in einigen Fällen eine erhöhte Körperlänge sowie konstant ein deutlich fortgeschrittenes Knochenalter zeigen. Postnatal tendieren sie eher zu Untergewicht und Gedeihstörung (Lapunzina et al., 2005). In der zweiten Lebensdekade weicht die Körperhöhe der Betroffenen dann immer mehr vom Referenzbereich der Normalbevölkerung nach unten ab. Die Endgröße der Patienten liegt mehr als sechs Standardabweichungen unter dem Durchschnitt (Shaw et al., 2010), weshalb die Einordnung zu den Großwuchssyndromen nunmehr fraglich erscheint.

1.1.2 Epidemiologie

Das Marshall-Smith-Syndrom ist ein sehr seltenes genetisch determiniertes Syndrom. Bis heute wurden ca. 50 Patienten mit dieser Entität weltweit publiziert (Schanze, Neubauer et al., 2014).

Alle eindeutigen Fälle traten sporadisch auf und es konnte weder familiär gehäuftes Auftreten noch parentale Konsanguinität nachgewiesen werden. Das Geschlechterverhältnis ist ungefähr gleich. Außerdem wurde bei den jeweiligen Elternpaaren der Patienten keine erhöhte Prävalenz von Subfertilität oder Spontanaborten festgestellt. Im Kollektiv von Shaw et al. lagen das mütterliche und väterliche Alter bei Geburt des betroffenen Kindes nicht über dem Durchschnitt der Allgemeinbevölkerung (Shaw et al., 2010).

1.1.3 Ätiopathogenese

Erst kurz vor dem Beginn dieser Arbeit konnten Mutationen im Gen für den Nuclear Factor I/X (*NFIX*, MIM 164005, siehe auch Kapitel 1.3) als molekulargenetische Ursache des MSS von der Arbeitsgruppe um Valérie Cormier-Daire aus Paris identifiziert werden (Malan et al., 2010). Ausgehend von einem Mausmodell mit *Nfix*-defizienten Tieren, in dessen Phänotyp die Wissenschaftler Ähnlichkeiten zum humanen MSS entdeckten, untersuchten sie neun MSS-Patienten auf Mutationen in diesem Gen. Durch DNA-Sequenzanalyse konnten sieben verschiedene heterozygote Frameshift-Mutationen und zwei unterschiedliche ebenfalls heterozygote Splice-Site-Mutationen aufgedeckt werden. Jede dieser Mutationen war *de novo* entstanden und konnte in 300 Kontrollen nicht nachgewiesen werden. Mit Hilfe einer RT-PCR an Fibroblasten-RNA zweier Patienten war es möglich das Wildtyp-Allel sowie die mutierte RNA aus Patientenzellen zu isolieren. Malan et al. postulierten, die mutierten RNAs würden dem Nonsense-mediated mRNA decay (NMD) entgehen und die mutierten Genprodukte wahrscheinlich einen dominant-negativen Effekt über das Wildtyp-Protein ausüben (Malan et al., 2010).

1.1.4 Klinik

Die wesentlichen klinischen Merkmale des MSS sind moderate bis schwere Entwicklungsverzögerung mit limitierter bis fehlender Sprachentwicklung, Gedeihstörung, dysharmonische Knochenreifung, respiratorische Beeinträchtigung, Kleinwuchs, typische faziale Dysmorphie, Kyphoskoliose und ungewöhnliche Verhaltensmuster (Adam et al., 2005; Shaw et al., 2010).

Die typischen Auffälligkeiten des Gesichts sind eine hohe vorgewölbte Stirn, flache Augenhöhlen, unterentwickeltes Mittelgesicht, prominente Prämaxilla sowie ein verkleinerter, nach dorsal verlagertes Unterkiefer. Die Nase ist zumeist kurz mit nach oben zeigender Spitze und nach vorn gerichteten Nasenlöchern (Abb. 1.1 a, b). Das Philtrum ist verlängert in der frühen Kindheit. Später wird es jedoch zunehmend kürzer und die vollen, evertierten Lippen entblößen die Gingivahypertrophie sowie die irregulär angeordneten Zähne. Einige der älteren Patienten zeigten außerdem eine vergrößerte, heraushängende Zunge (Shaw et al., 2010).

Die vergrößerten Augen in Kombination mit den abgeflachten Augenhöhlen führen zu einer auffälligen Proptosis. Oft leiden die Betroffenen unter ausgeprägter Myopie, wobei Sehhilfen zum Teil nicht toleriert werden, wodurch wiederum die visuelle Entwicklung Schaden nimmt. Etwa 30 % der Patienten weisen ein Glaukom auf, das durch anatomische Anomalien der Vorderkammer bzw. des Trabekelwerks entsteht. Mehrfach wurde auch eine Hypoplasie des Sehnervs beobachtet (Shaw et al., 2010).

Die häufig auftretenden, oftmals schwerwiegenden respiratorischen Einschränkungen resultieren aus einer Kombination von verschiedenen Pathologien, wie der oberen Atemwegsobstruktion durch Retrognathie, Choanalstenose und Larynxanomalien sowie Aspirationspneumonien hervorgerufen durch eine zumeist unterentwickelte Epiglottis und pharyngeale Dyskoordination (Shaw et al., 2010). Deshalb verstarben diese Patienten in der Vergangenheit zumeist bereits in der frühen Kindheit (Johnson et al., 1983; Yoder et al., 1988; Cullen et al., 1997; Chatel et al., 1998; Adam et al., 2005). Durch intensives Atemwegsmanagement kann heutzutage ein Überleben bis ins Erwachsenenalter ermöglicht werden (Diab et al., 2003; Adam et al., 2005). Mehrmals zeigten ältere Patienten, auch wenn sie nicht mehr auf Atemhilfen angewiesen waren, obstruktive Schlafapnoen (Shaw et al., 2010).

Geringfügige Anomalien des äußeren Ohrs sowie enge äußere Gehörgänge sind ein oft zu verzeichnendes Merkmal. Vielfach leiden die Patienten zudem unter sensoneurinaler und / oder Schallleitungsschwerhörigkeit (Adam et al., 2005; Shaw et al., 2010).

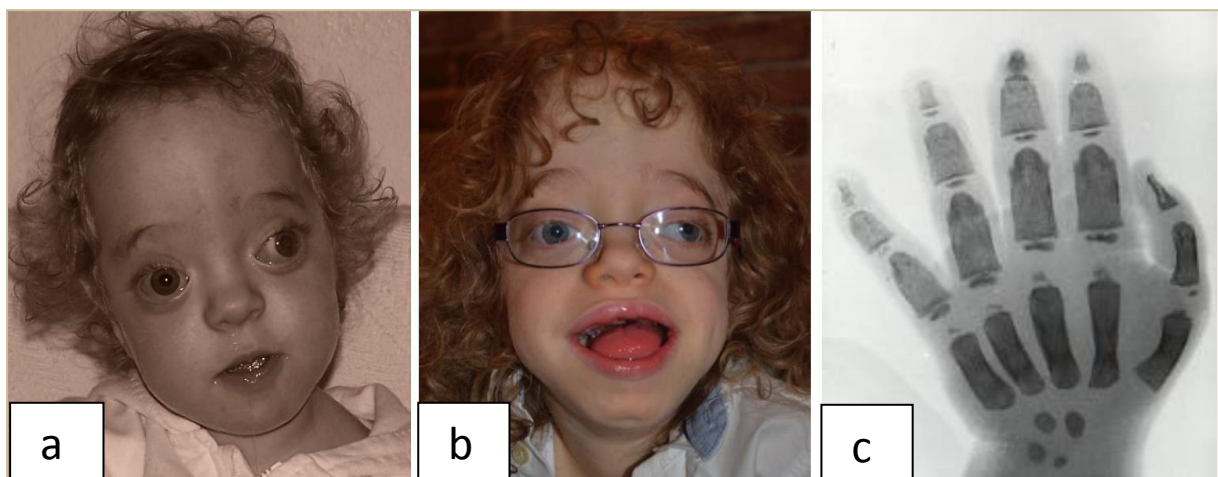


Abb. 1.1: Typische faziale Dismorphien und Skelettveränderungen bei MSS-Patienten. Dokumentation der Veränderung des fazialen Phänotyps einer Patientin im Alter von 2 Jahren (a) und 9 Jahren (b). c) Röntgenaufnahme der linken Hand eines Neugeborenen mit MSS: akzeleriertes Knochenalter der Handwurzelknochen (ca. 3 Jahre), Gewehrkegel-ähnliche Form der Phalangen.

Die Knochenreife wurde bei Geburt und in der Kindheit ausnahmslos als beschleunigt dargestellt (Butler et al., 2004; Adam et al., 2005; Shaw et al., 2010). Komplette Analysen des Skeletts zeigten jedoch, dass vor allem die Handwurzelknochen (Abb. 1.1 c) und auch in geringerem Ausmaß die Epiphysen der langen Röhrenknochen ein akzeleriertes Knochenalter aufwiesen, wohingegen der Rest weniger verändert erschien (Shaw et al., 2010). Dadurch scheint es eher gerechtfertigt, die Knochenreife als dysharmonisch zu beschreiben (Adam et al., 2005; Shaw et al., 2010). Shaw et al. schlugen in diesem Zusammenhang den Begriff der Dysostose (Shaw et al., 2010), Adam et al. den der Osteochondrodysplasie (Adam et al., 2005) vor. Typischerweise sind die proximalen und mittleren

Phalangealknochen verbreitert in Form einer Gewehrkegel („bullet shaped phalanges“). Die Kyphoskoliose manifestiert sich meist in der Kindheit, spätestens jedoch im Erwachsenenalter (Shaw et al., 2010). Außerdem wurde ein Fall mit einem Pectum excavatum beobachtet (Martinez et al., 2015). Einige Fälle wurden bekannt, bei denen es nach inadäquatem Trauma zu Frakturen kam (Diab et al., 2003; Butler et al., 2004; Adam et al., 2005). Zwei Drittel der Betroffenen haben durchscheinende, blau-graue Skleren und alle Patienten mit Frakturen nach inadäquatem Trauma zeigten diese Besonderheit. Weiterhin traten bei 30 % Umbilikalhernien auf. Obwohl die Haut wiederholt als weich und zart angegeben wurde, ist bisher keine Neigung zu Verletzungen bekannt (Shaw et al., 2010).

MSS-Patienten zeigen regelhaft ein moderat bis schweres kognitives Defizit und bestimmte Verhaltensauffälligkeiten. Sie besitzen einen zumeist fröhlichen Charakter und genießen besonders sozialen Kontakt mit Freunden und Familie (van Balkom et al., 2011; Martinez et al., 2015). Eine Vorliebe für das stereotype Beschäftigen mit einem speziellen Spielzeug ist eine Eigenheit vieler Betroffener. Die Sprachentwicklung ist ausgesprochen verzögert und die Patienten können, wenn überhaupt, nur wenige Wörter sprechen. Auch die motorische Entwicklung ist stark eingeschränkt (van Balkom et al., 2011; Shaw et al., 2010).

Neurologische Auffälligkeiten sind trunkale Hypotonie und periphere Hypertonie mit lebhaften Reflexen. Zwei Patienten zeigten eine Tetraparese ausgelöst durch zervikale Rückenmarkskompression, die sich jedoch nach operativer Dekompressionstherapie vollständig zurückbildete. Ein Patient wies eine asymptomatische zervikale Spinalkanalstenose auf. In der neuroradiologischen Bildgebung ergaben sich vielfältige Befunde wie Hypoplasie des Corpus callosum, dilatiertes Ventrikelsystem und Pachygyrie (Shaw et al., 2010).

Bis heute wurde bei einem betroffenen Kind im Alter von vier Jahren ein Wilms-Tumor festgestellt (Shaw et al., 2010). Von keinem anderen Auftreten eines Malignoms bei MSS-Patienten wurde zuvor berichtet. Deshalb bedarf es keines speziellen Screening-Programms (Lapunzina et al., 2005). Allerdings gibt es bisher nur wenige Patienten, die das Erwachsenenalter erreicht haben. Es ist folglich abzuwarten welche neuen Erkenntnisse in den kommenden Studien zu älteren MSS-Patienten gewonnen werden (Shaw et al., 2010).

1.1.5 Diagnose

Die häufigsten Merkmale sind moderates bis schweres Intelligenzdefizit, schwere respiratorische Einschränkungen, typische faziale Dysmorphie (v.a. Proptosis, nach vorn gerichtete Nasenlöcher, Mittelgesichtshypoplasie, Retrognathie), dysharmonische Knochenreifung und Gedeihstörung. Shaw et al. schlugen diese Symptome und speziell die charakteristischen radiologischen Befunde als Diagnosekriterien vor (Shaw et al., 2010).

Außerdem kann seit Kurzem zur Bestätigung der Diagnose eine Mutationsanalyse des *NFIX*-Gens durchgeführt werden (Malan et al., 2010).

1.1.6 Differentialdiagnose

In der Literatur existierte lange eine Debatte darüber, ob das MSS und das Weaver-Syndrom die gleiche Entität darstellen, da beide Syndrome etwa zur gleichen Zeit mit dem Hauptsymptom der akzelerierten Knochenreife beschrieben wurden. Weitergehende Untersuchungen des Phänotyps mit besonderem Augenmerk auf die fazialen Besonderheiten, radiologischen Befunde sowie den Krankheitsverlauf erbrachten jedoch signifikante Unterschiede (Fitch et al., 1980; Shaw et al., 2010). Als Syndrome mit ähnlichem oder partiell überlappendem Phänotyp wurden das Rolland-Desbuquois-Syndrom, das Fine-Lubinsky-Syndrom, die Pyknodysostose, das Antley-Bixler-Syndrom, das Ehlers-Danlos-Syndrom Typ VII, der Galactosyltransferase-I-Mangel und der Lysylhydroxylase-3-Mangel beschrieben. Allerdings macht die Kombination aus charakteristischen radiologischen Befunden, typischer fazialer Dysmorphie und respiratorischen Problemen das MSS insgesamt zu einer leicht zu identifizierenden eigenständigen Entität (Shaw et al., 2010).

1.2. Das *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom

1.2.1 Großwuchssyndrome

Die Großwuchssyndrome sind durch eine abnorm erhöhte Körpergröße, häufig von Geburt an bestehend und bis ins Erwachsenenalter persistierend, charakterisiert. Von einer neonatalen Makrosomie spricht man bei einem Gewicht des Neugeborenen über der 97. Perzentile. Im Gegensatz dazu wird Großwuchs im Kindes- und Erwachsenenalter durch die Körpergröße bestimmt, die über der 97. Perzentile beziehungsweise über zwei Standardabweichungen über der Norm liegt (Neri et al., 2009). Dabei hat diese heterogene Gruppe der Großwuchssyndrome verschiedene weitere Merkmale in unterschiedlicher Zusammensetzung gemein, wie Makrozephalie, mentale Retardierung, faziale Dysmorphie, akzelerierte Knochenreife, Hemihyperplasie, Gefäßmissbildungen und Prädisposition zu Neoplasien (Neylon et al., 2012). Eines der häufigsten Syndrome dieser Gruppe ist das Sotos Syndrom (MIM 117550). Dieses wurde primär im Jahre 1964 von Sotos et al. als zerebraler Gigantismus beschrieben (Sotos et al., 1964). Definiert ist es als Kombination von Großwuchs, typischer fazialer Dysmorphie, mentaler Retardierung und/oder Makrozephalie (Leventopoulos et al., 2009). In der Kindheit ist das Gesicht rundlich mit disproportionierter prominenter Stirn. Im Jugend- und Erwachsenenalter wird das Gesicht dann zunehmend länglich und zeichnet sich durch ein markantes spitzes Kinn, eine hohe Stirnhaargrenze, Hypertelorismus, nach außen abfallende Lidachsen, nach vorn gerichtete Nasenlöcher, einen hohen Gaumen und vergrößerte Ohren aus (Baujat et al., 2007). Bei etwa 90 % der Sotos-Syndrom-Patienten konnten Mutationen im *NSDI*-Gen nachgewiesen werden (Tatton-Brown et al., 2007; Yoneda et al., 2012).

1.2.2 Bisherige Mutationen bei Patienten mit *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom

In der bereits oben zitierten Arbeit entdeckten Malan et al. bei drei Patienten mit einem neuen, klinisch ähnlichen Großwuchssyndrom, welches sowohl Merkmale des Sotos Syndroms als auch des MSS aufwies (Abb. 1.2.), zwei 19p13-Mikrodeletionen, die das Gen für den Nuclear Factor I/X (*NFIX*) einschlossen, sowie eine Nonsense-Mutation in eben diesem Gen {Malan 2010 #43}.

Danach folgten etliche Berichte von Patienten mit ähnlichem Phänotyp und Mikrodeletionen bzw. –duplikation im Bereich von 19p13.2 - 19p13.12 (Auvin et al., 2009; Lysy et al., 2009; Dolan et al., 2010; Bonaglia et al., 2010; Nimmakayalu et al., 2013; Natiq et al., 2014; Klaassens et al., 2015; Shimojima et al., 2015), Missense-Mutationen (Yoneda et al., 2012; Gurrieri et al., 2015), einer In-Frame-Mutation (Priolo et al., 2012), Frameshift-Mutationen (Gurrieri et al., 2015; Klaassens et al., 2015) und einer Nonsens-Mutation (Klaassens et al., 2015).

Insgesamt wurden somit bisher weltweit 31 Fälle von Patienten dieses Phänotyps kombiniert mit *NFIX*-Mutationen oder Deletionen des *NFIX*-Lokus berichtet. Diese neue Entität wurde als Sotos-like-Syndrom beschrieben (Klaassens et al., 2015; Natiq et al., 2014; Bonaglia et al., 2010; Gurrieri et al., 2015). Weiterhin wurden auch Begriffe wie Sotos Syndrom 2 (MIM 614753) (Sotos et al., 2014) und Malan-Syndrom (Klaassens et al., 2015; Gurrieri et al., 2015; Shimojima et al., 2015) bisher in der Literatur verwendet. Im Folgenden wird das Krankheitsbild als *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom bzw. *NFIX*-related-„Sotos-like“-Syndrom bezeichnet.

1.2.3 Der Phänotyp des *NFIX*-related-Overgrowth-Syndroms

Die Merkmale dieses Krankheitsbildes sind eine durchschnittliche Größe der Körperhöhe und des Kopfumfangs von im Mittel 2,0 bzw. 2,3 Standardabweichungen über dem Durchschnitt. Es bestehen Gemeinsamkeiten zum Sotos-Syndrom bezüglich der Gesichtsform, insbesondere sind hier das insgesamt längliche Gesicht, die prominente Stirn, der hohe Haaransatz, nach unten gerichtete Augenlider und ein ausgeprägtes Kinn zu nennen. Schwierigkeiten bei der Fütterung und Hypotonie in der Neonatalphase wurden bei etwa 30 % der Betroffenen berichtet. Die geistige Behinderung ist obligat und meistens von mildem bis moderatem Ausmaß. Ophthalmologische Manifestationen sind häufig und schließen Strabismus (65%), Nystagmus (25%) und die Abblassung bzw. Hypoplasie des Nervus opticus (25%) mit ein. Ebenso gehören Pectus excavatum (40%) und Skoliose (25%) zu den typischen Merkmalen (Klaassens et al., 2015). Unterschiede zum klassischen Sotos-Syndrom sind insbesondere der im Durchschnitt geringer ausgeprägte Großwuchs, das häufigere Vorhandensein von okulären Anomalien und Skoliose, sowie die im Durchschnitt stärkere mentale Retardierung im Vergleich zum Sotos-Syndrom, bei dem die Beeinträchtigung der intellektuellen Funktionen in der Regel milde ausgeprägt ist und etwa 10 – 15 % der Patienten auch gar keine mentale Retardierung aufweisen (Sotos et al., 2014). Die geistige Behinderung stellt jedoch ein konsistentes Merkmal der Patienten mit *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom dar. Außerdem weisen Patienten mit klassischem Sotos-Syndrom teilweise aggressive Charakterzüge mit der Tendenz zu Wutausbrüchen auf (Sotos et al., 2014), wohingegen Patienten mit *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom eher zu Ängstlichkeit und autistischen Verhaltensweisen tendieren. Weiterhin wurden bei Sotos-Patienten exzessiver Appetit und verstärktes Schwitzen berichtet (Sotos et al., 2014), welches bei *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom-Patienten bisher nicht beobachtet wurde. Auch zeigte sich bei Sotos-Patienten eine erhöhte Neigung zu verschiedenen Malignomen wie z. B. dem sacrococcygealem Teratom und akuter lymphozytärer Leukämie (Sotos et al., 2014). Von einer Tumor-Prädisposition der *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom-Patienten wurde bisher nicht berichtet (Klaassens et al., 2015). Jedoch ist die Anzahl der publizierten Fälle klein und viele der Patienten haben bisher noch kein höheres Alter erreicht, sodass weitere Studien eine solche noch aufdecken könnte.

Weiterhin wurden bei drei Patienten mit Mikrodeletion 19p13.2 eine Chiari-Malformation Typ 1 nachgewiesen (Shimajima et al., 2015). Diese war bisher noch nie bei einem *NSDI*-positiven Sotos-Patienten aufgefallen. Auch über marfanoide Züge wurde berichtet (Martinez et al., 2015), welche nicht typisch für klassische Sotos-Patienten sind.



Abb. 1.2: Typischer Phänotyp der *NFIX*-related-Overgrowth-Patienten. obere Reihe: Beachte besonders die längliche Gesichtsform, die prominente Stirn, den hohen Haarsatz, die nach unten gerichtete Augenlider und das ausgeprägtes Kinn; untere Reihe: auffällig ist der schlanke Habitus (Abbildung der Patienten A, B und C aus (Malan et al., 2010)).

1.3 Das *NFIX*-Gen

1.3.1 Die NFI-Genfamilie

Im Jahre 1982 wurden die NFI-Proteine als sequenzspezifische DNA-Bindungsproteine, die an Regulatorelementen des Lysozymgens des Huhns binden, identifiziert (Nowock et al., 1982; Driller et al., 2007). Anschließende Studien zeigten, dass diese Proteine als Aktivatoren bzw. Repressoren der Transkription von zellulären und viralen Genen arbeiten und außerdem als zelluläre Wirtsfaktoren bei der viralen Replikation involviert sind (Gronostajski et al., 2000; Driller et al., 2007). Weiterhin sind sie mit Veränderungen des Wachstumszustandes von Zellen sowie mit onkogenetischen Prozessen assoziiert (Gronostajski et al., 2000). Die Familie der Transkriptionsfaktoren vom NFI-Typ wird bei Wirbeltieren durch vier eng verwandte Gene kodiert: *NFIA*, *NFIB*, *NFIC* und *NFIX* (Rupp et al., 1990; Kruse et al., 1991; Plachez et al.; 2012). Diese haben eine hoch konservierte, N-terminale DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (Gounari et al., 1990) sowie eine C-terminale Transaktivierungs- und Repressionsdomäne gemein. Durch alternatives Spleißen gibt es für die NFI-Gene verschiedenen Isoformen, die sich in der C-terminalen Transaktivierungs- und Repressionsdomäne unterscheiden, was die funktionelle Variabilität der Genprodukte erhöht (Kruse et al., 1994; Driller et al., 2007). Die potentielle Rolle der NFI-Proteine bei der Regulation von Entwicklungsprozessen wurde von ihrem spezifischen Expressionsmuster während der embryonalen Entwicklung und von Studien an *Nfi*-defizienten Mäusen abgeleitet. Es konnte gezeigt werden, dass das Fehlen von *Nfia* zum Hydrozephalus und Agenesie des Corpus callosum führt. Eine *Nfib*-Defizienz hingegen führt im Mausmodell zu neurologischen Defekten und Lungenhypoplasie, die von *Nfic* zu spezifischen Zahndefekten (Driller et al., 2007). Weiterhin weisen Mäuse, denen das Gen für *Nfia*, *Nfib*, *Nfic* oder *Nfix* fehlt, Entwicklungsdefizite in verschiedenen Hirnregionen wie dem Kortex, Hippokampus, Pons und dem Zerebellum auf (Plachez et al., 2012).

Die Mitglieder der NFI-Familie können als Homo- und Heterodimere agieren (Kruse et al., 1994) und binden mit hoher Affinität an die palindromische Sequenz 5'-PyTGGCA-N₃-TGCCAPu-3' (Osada et al., 1996; Driller et al., 2007). NFI-Bindungssequenzen wurden in Promotoren von Genen entdeckt, die in fast jedem Organ, einschließlich Gehirn (Krohn et al., 1999), Lunge (Bachurski et al., 1997), Leber (Jackson et al., 1993), Darm (Xu et al., 2005), Muskeln (Spitz et al., 1997) sowie Bindegewebe und Skelett (Artlett et al., 1998; Christner et al., 2003; Pirok et al., 1997) exprimiert werden (Driller et al., 2007).

1.3.2 Der Aufbau der NFI-Gene

Als erstes konnte die genomische Struktur des menschlichen und des porcinen *NFIC*-Gens bestimmt werden. Hierbei fanden sich elf hoch konservierte Exons (Meisterernst et al., 1989; Gronostajski et al., 2000). Danach entschlüsselte man die Struktur des *Nfia*-Gens der Ratte. Auch hier konnten elf Exons identifiziert werden, die von der Länge größtenteils mit denen des *NFIC*-Gens übereinstimmten (Xu et al., 1997; Gronostajski et al., 2000). Kurz darauf wurde im Zuge des Humangenomprojekts auch der Aufbau des *NFIX*-Gens untersucht. Dessen längste Isoform besitzt ebenfalls elf Exons, die in ihrer Länge mit denen von *NFIC* und *Nfia* vergleichbar sind (Gronostajski et al., 2000). Die Abbildung 1.3 veranschaulicht den allgemeinen Aufbau der NFI-Proteine. Die N-terminale DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (DNA binding and dimerization) der NFI-Gene wird überwiegend durch ein relativ langes, ca. 500 Nukleotide umfassendes, zweites Exon kodiert. Innerhalb dieser Domäne befinden sich vier konservierte Cysteinreste (C), die für die DNA-Bindung benötigt werden, eine alphahelikale Domäne (Basic helix) und eine Ad-Pol-Bindungsdomäne (Ad Pol binding). Die C-terminale Transaktivierungs- und Repressionsdomäne (Transactivation and repression), auch CTF/NFI-Domäne genannt, beinhaltet eine prolinreiche Transaktivierungsdomäne (Proline-rich) (Gronostajski et al., 2000).

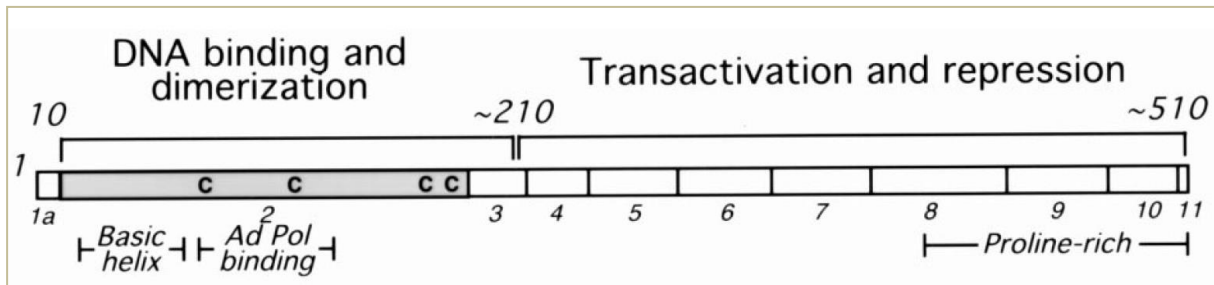


Abb. 1.3: Allgemeiner Aufbau der NFI-Proteine. Gezeigt sind die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (DNA binding and dimerization), sowie die Transaktivierungs- und Repressionsdomäne (Transactivation and repression); Zahlen überhalb des Balkens: Anzahl der Aminosäuren, Balken: NFI-Protein, C innerhalb des Balkens: Cysteinreste, Zahlen unterhalb des Balkens: Exonnummern, Basic helix: alphahelikale Subdomäne, Ad Pol binding: Ad Pol-binding-Domäne, Proline-rich: prolinreiche Transaktivierungsdomäne (Abbildung aus (Gronostajski et al., 2000)).

Deletionsanalysen haben gezeigt, dass die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne eine Länge von ungefähr 200 Aminosäuren umfasst und bei den vier NFI-Genen der Maus, des Huhns und des Menschen zu 90 % identisch ist. Diese N-terminale Domäne ist verantwortlich für die DNA-Bindungsaktivität, die Fähigkeit zur Dimerisierung und die Stimulation der DNA-Replikation von Adenoviren (Mermod et al., 1989; Gounari et al., 1990; Gronostajski et al., 2000). Vier Cysteinreste befinden sich in den C-terminalen Zweidritteln dieser Domäne, die eine Subdomäne, Ad Pol binding-Domäne genannt, bilden. Diese ermöglicht die Dimerisierung, die sequenzspezifische DNA-Bindung

mit geringer Affinität sowie die Interaktion mit der Adenoviruspolymerase, welche der Subdomäne ihren Namen gab (Dekker et al., 1996). Das N-terminale Drittel der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne ist hoch konserviert und scheint sich in eine stabile alpha-helikale Subdomäne zu falten, die unspezifisch an die DNA binden kann. Wenn sich diese N-terminale Subdomäne mit der C-terminalen Subdomäne vereinigt, erhöht sich die DNA-Bindungsaffinität um das 100-fache (Dekker et al., 1996; Gronostajski et al., 2000).

Die C-terminale Transaktivierungs- und Repressionsdomäne (CTF/NFI-Domäne) besitzt einen hohen Anteil (etwa 25 %) an Prolinresten. Wenn diese Domäne nun mit den beiden Subdomänen der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne verbunden ist, wird die Transkription von Zielgenen (Gronostajski et al., 2000), wie z. B. spezifischen fetalen Genen wie das Muskelkreatinkinase-Gen (*MCK*) oder das β -Enolase-Gen (Messina et al., 2010), in Säugetier- und Drosophilazellen um das fünf- bis zehn-fache gesteigert (Mermod et al., 1989; Gronostajski et al., 2000). Im Gegensatz dazu kann diese Domäne aber auch repressiv auf die Transkription bestimmter Gene wirken. Dabei handelt es sich beispielsweise um das Peripherin (Adams et al., 1995), das *PIT1/GHF1*- (Rajas et al., 1998) und das *GLUT4*-Gen (Cooke et al., 1999).

Da NFI-Proteine die Transkription zum einen aktivieren und zum anderen hemmen können, liegt es nahe anzunehmen, dass Aktivierung und Repression Zelltyp- beziehungsweise Promoter-spezifisch determiniert sind (Gronostajski et al., 2000).

1.3.3 Die Funktion des *NFIX*-Gens

Nachdem zuvor zu den drei Mitgliedern der *Nfi*-Familie *Nfia*, *Nfib* und *Nfic* jeweilige Experimente an Knockout-Mäusen durchgeführt worden waren, veröffentlichte die Arbeitsgruppe Driller et al. im Jahr 2007 die Ergebnisse ihrer Studien an Mäusen, bei denen sie das noch nicht im Mausmodell untersuchte *Nfix*-Gen inaktivierten. Dies erfolgte mittels Einbringen eines LacZ-Reportergens in den Leserahmen von Exon 2, wodurch die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne ausgeschaltet wurde. Tiere mit einer homozygoten Defizienz des *Nfix*-Gens (*Nfix*^{-/-}) zeigten im Vergleich zu ihren gesunden Artgenossen eine Wachstumsverzögerung und starben 21 bis 28 Tage postnatal (Abb. 1.8) (Driller et al., 2007). Außerdem ließ sich eine Erweiterung der lateralen und des dritten Ventrikels bei Hydrocephalus (Vidovic et al., 2015) sowie eine partielle Agenesie des Corpus callosum nachweisen (Driller et al., 2007). Weiterhin präsentierten die Mäuse eine kyphotische Deformation der Wirbelsäule und eine verminderte enchondrale Ossifikation in den Wirbelkörpern und im Femur. Die Expression von Tetranektin, einem Protein das in den Knochenmetabolismus involviert ist, war in Tieren mit homozygoter *Nfix*-Defizienz herunter reguliert (Driller et al., 2007). Heterozygote Tiere (*Nfix*^{+/-}) zeigten nur eine geringfügige Gewichtsreduktion, eine normale Lebenserwartung und keine

offensichtlichen Verhaltensauffälligkeiten oder anatomischen Besonderheiten (Driller et al., 2007). Kürzlich konnte jedoch ein schlechteres Abschneiden dieser Tiere im Vergleich zu Wildtypmäusen beim Morris-Water-Maze-Test, einem Testverfahren für Hippocampus-abhängige, räumliche Lern- und Merkfähigkeit, nachgewiesen werden (Harris et al., 2013). Weiterhin wurden analog zu den homozygoten Tieren eine etwas weniger ausgeprägte Erweiterung der lateralen und des dritten Ventrikels, eine partielle Agenesie des Corpus callosum (Driller et al., 2007) sowie verzögerte Entwicklung und abnorme Morphologie des Hippocampus beobachtet (Harris et al., 2013).

Da der homozygote *Nfix*-defiziente Mausphänotyp (*Nfix*^{-/-}) Ähnlichkeiten zum humanen MSS aufwies, untersuchte die Arbeitsgruppe Malan et al. Betroffene dieses Syndroms auf Mutationen im *NFIX*-Gen. Im Jahr 2010 veröffentlichten sie ihre Ergebnisse, die zeigten, dass *NFIX*-Mutationen kausal für die Entität des MSS und für einige Fälle eines Sotos Syndrom-ähnlichen Phänotyps waren (Malan et al., 2010). Derzeit bleibt die spezifische Funktion des *NFIX*-Gens noch weitestgehend ungeklärt, aber es scheint eine wichtige Rolle in der ZNS-, Skelett- (Driller et al., 2007; van Balkom et al., 2011) und Muskelentwicklung (Pistocchi et al., 2013) zu spielen. In Bezug auf die Entwicklung des zentralen Nervensystems kommt dem *NFIX*-Gen eine besonders bedeutsame Rolle bei der normalen Ausbildung des Rückenmarks, des Kleinhirns, des Corpus callosum sowie des Hippocampus, insbesondere des Gyrus dentatus zu (Harris et al., 2013; Heng et al., 2012).

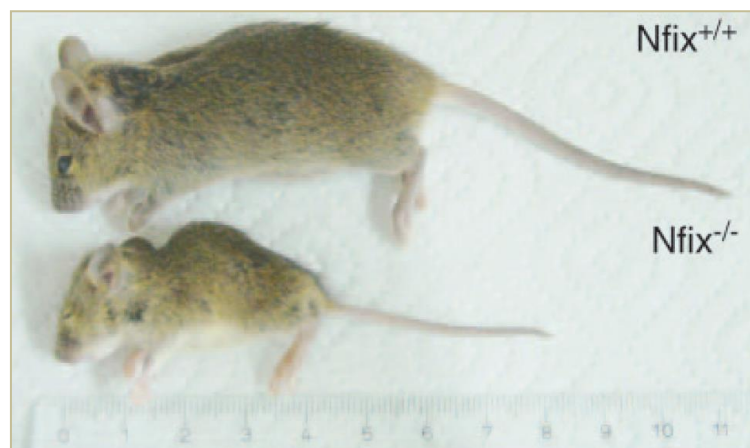


Abb. 1.4: *Nfix*-Defizienz im Mausmodell. Zu sehen sind eine Wildtypmaus (*Nfix*^{+/+}) und eine Knockout-Maus (*Nfix*^{-/-}) am 24. Lebenstag (Abbildung aus (Driller et al., 2007)).

Weiterhin kann eine Modifikation der Genprodukte durch alternatives Spleißen von Exon 1, 7 und 9 erfolgen (Martinez et al., 1991). Die exakte Funktion der verschiedenen Spleißvariationen liegt aktuell jedoch noch weitestgehend im Dunkeln und bedarf weiterer Erforschung.

2. Zielsetzung

Die vorliegende Arbeit hatte zum Ziel elf MSS-Patienten sowie 35 Patienten mit Sotos-Syndrom-ähnlichem Phänotyp auf das Vorhandensein einer Mutation im *NFIX*-Gens zu untersuchen, um die Bedeutung von *NFIX*-Mutationen in den beiden phänotypischen Kategorien zu überprüfen, das Mutationsspektrum zu definieren, und die diskutierten molekulargenetischen Pathomechanismen, die zu den beiden Krankheitsbildern führen sollen, zu bestärken beziehungsweise zu entkräften.

Die angewandten Methoden zur Gen-Analyse konzentrierten sich dabei vorwiegend auf die DNA-Sequenzanalyse sowie eine selbst etablierte MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) zur Detektion größerer genomischer Deletionen oder Duplikationen.

3. Material und Methoden

3.1. Die Patientenkohorte

Das Patientenkollektiv setzte sich aus einer heterogenen Gruppe von 35 Individuen mit phänotypischen Merkmalen des Sotos-Syndroms, sowie 11 Patienten mit der spezifischen klinischen Diagnose MSS zusammen. Von diesen 11 MSS-Patienten waren bereits 5 Individuen von der Arbeitsgruppe von Valérie Malan und Valérie Cormier-Daire durch Sequenzierung des *NFIX*-Gens voruntersucht, wobei keine Mutation gefunden worden war. Die DNA wurde aus Bluteukozyten isoliert und größtenteils aus kollaborierenden Instituten eingeschendet. Alle Patienten beziehungsweise deren rechtliche Vertreter hatten schriftlich die Zustimmung zur genetischen Untersuchung im Rahmen wissenschaftlicher Studien gegeben.

Die Einschlusskriterien für die Patientengruppe mit "Sotos-like"-Syndrom (siehe Kap. 7.1, Tabelle 7.1) waren variable mentale Retardierung in Verbindung mit Makrozephalie und/oder Makrosomie.

Die klinischen Daten aller MSS-Patienten (siehe Kap. 7.1, Tabelle 7.2.) wurden von erfahrenen klinischen Experten für Dysmorphologie (Prof. Dr. med. M. Zenker, Institut für Humangenetik, Universitätsklinikum Magdeburg; Prof. Dr. med. R. C. M. Hennekam, Departement für Pädiatrie, Akademisch-Medizisches Zentrum der Universität von Amsterdam, Die Niederlande) überprüft. Gestellt wurde die klinische Diagnose anhand des Vorhandenseins der typischen kraniofazialen Dysmorphologie, den charakteristischen radiologischen Veränderungen und moderater bis schwerer mentaler Retardierung als minimalen Einschlusskriterien. Sämtliche Patienten besaßen zudem weitere Merkmale, die die Diagnose stützten. Das Auftreten der Fälle war in allen Fällen sporadisch, ohne Anhalt auf parentale Konsanguinität. Außerdem zeigten die Betroffenen einen bemerkenswert ähnlichen Phänotyp, welcher sich allmählich mit der Zeit veränderte. Eine gewisse Ausnahme stellte hierbei Patient 38 dar, bei dem die fazialen und skelettalen Anomalien weniger stark ausgeprägt waren, der aber dennoch aufgrund der klinischen Gesichtspunkte als MSS klassifiziert worden war.

3.2. Geräte und Chemikalien

3.2.1 Zusammensetzung von Puffern und Lösungen

dNTP-Mix (2 mM): für 5 ml

- je 100 µl dCTPs, dTTPs, dGTPs, dATPs (100 mM)
- aufgefüllt auf 5 ml mit Millipore-Wasser

Ladepuffer: für 50 ml

- 7,5g Ficoll 400
- 1 ml EDTA
- mit Millipore-Wasser auf 50 ml aufgefüllt
- zur besseren Löslichkeit für 20 min ins Wasserbad
- 2 g Orange G zugefügt
- zentrifugiert für 5 min bei 3000 rpm
- Nutzung des Überstandes

TBE-Puffer: für 1 L

- 54 g Tris
- 27,5 g Borsäure
- 20 ml EDTA (0,5 M)
- mit Millipore-Wasser auf 1 L aufgefüllt

TE-Puffer: für 1 L

- 10 ml Tris/HCL (1 M, pH = 8,0)
- 2 ml EDTA (0,5 M, pH = 8,0)
- mit Millipore-Wasser auf 1 L aufgefüllt

Tris/HCl (1 M) für 1 L:

- 121,14 g Tris
- 600 ml Millipore-Wasser
- mit konzentrierter HCl auf pH = 8,0 eingestellt
- mit Millipore-Wasser auf 1 L aufgefüllt

EDTA (0,5 M) für 1 L:

- 186,12 g EDTA
- 600 ml Millipore-Wasser
- mit NaOH auf pH = 8,0 eingestellt
- mit Millipore-Wasser auf 1 L aufgefüllt

3.2.2 Lösungen und Chemikalien

Material	Bezeichnung	Hersteller
100 bp Größenstandard für die Gelelektrophorese	100 bp DNA ladder	Invitrogen, Carlsbad, USA
Agarose	UltraPure™ Agarose	Invitrogen, Carlsbad, USA
Betaine 5 M		Sigma Life Science, St. Louis, USA
Borsäure 100 %		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
DMSO 5 %		Sigma Life Science, St. Louis, USA
DNA-Aufreinigungs-Kit mit 50 QIAamp Mini Spin Columns, QIAGEN Protease, Reagenzien, Puffer, Tubes (2 ml)	QIAamp DNA Blood Mini Kit (50)	QIAGEN GmbH, Hilden, Germany
dNTPs	100 mM dNTP Set	Invitrogen, Carlsbad, USA
EDTA (≥99,9 %)	EDTA Dinatriumsalz Dihydrat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Ethanol 100 %		Zentralapotheke, Universitätsklinik Magdeburg, Deutschland
Ethidiumbromid		Roche, Basel, Schweiz
Ficoll 400		Pharmacia Fine Chemicals, Uppsala, Schweden
Formamid (100 %)	Hi-Di™ Formamide	Applied Biosystems, Foster City, USA
Konzentrierte HCl	HCl 37 %	Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

Material	Bezeichnung	Hersteller
LIZ 500 Größenstandard	Gene Scan™-500 LIZ™ Size Standard	Applied Biosystems, Foster City, USA
MLPA-Kit mit SALSA MLPA- Puffer, Ligase-65, Ligase-65 Puffer A, Ligase-65 Puffer B, SALSA PCR Primer-Mix: Mix aus zwei PCR-Primern, dNTPs, SALSA Polymerase	SALSA MLPA reagent kit	MRC Holland, Amsterdam, Niederlande
Orange G		Chemapol, Prag, Tschechische Republik
PCR-Aufreinigungsbeads	Agencourt AMPure®- reagent	Beckman Coulter, Brea, USA
PCR-Kit mit Taq DNA Polymerase, Rxn Puffer, and MgCl ₂ 50 Mm	Taq DNA Polymerase Recombinant	Invitrogen, Carlsbad, USA
Sequenzierungsaufreinigungs- beads	Agencourt CleanSEQ- reagent	Beckman Coulter, Brea, USA
Sequenzierungs-Kit mit Big Dye und Sequenzierpuffer	Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems, Foster City, USA
Tris (≥99,9 %)		Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Deutschland

3.2.3 Geräte und Ausrüstung:

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
8-Kanal-Pipette	0,5-10 µl	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
96-Well-Silikonmatte	Thermowell Sealing Mat 96 well	Corning Inc., Corning, USA
96-Well-Platte Fast für Sequenzierreaktion	96 well Multiply Fast- PCR plate	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
96-Well-Platte für Nutzung im Sequenziergerät	MicroAmp Optical 96 well-reaction plate	Applied Biosystems, Foster City, USA
96-Well-Platte für PCR	96 Multiply PCR plate	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Drucker für Gelbilder	Digital Monochrome Printer P93D	Mitsubishi, Tokyo, Japan
Elektrophoresekammer, Gelträger, Abstandshalter, Kämme für Probereservoir	Horizon 11-14/20-25 Horizontal Gel Electrophoresis Apparatus	Life Technologies, Carlsbad, USA
Elektrophoresestrom- versorgungsgerät	Consort Mini Electrophoresis Power Supply E143	Sigma Life Science, St. Louis, USA
Gel-Analyse-Gerät	DeVision DBOX with UV Transilluminator	Decon ScienceTec, Hohengandern, Deutschland
Magnetisches Rühr- und Heizgerät	RCT basic IKAMAG®	IKA, Staufen, Deutschland
Magnetplatte für PCR- und Sequenzieraufreinigungen	Agencourt SPRIPlate®	Beckman Coulter, Brea, USA
Mikrowelle	R-939 IN-A, 900 W, 40 L	Sharp, Osaka, Japan

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Mikrozentrifuge	Heraus PICO17 Centrifuge	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Mischgerät	Vortex Genie® 2	Scientific Industries, Bohemia, USA
Multipipette	Multipipette® stream	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Multipipette Spitzen	Combitips plus® 0,2 ml	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
PCR-Thermocycler	VWR Duo cycler	VWR, Radnor, USA
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl, 1000 µl		Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Pipetten 0,2-2 µl, 2-20 µl, 20-200 µl, 100-1000 µl	PIPETMAN	Gilson, Middleton, USA
Pipettierroboter für automatische Aufreinigungen von PCR- und Sequenzierreaktionen	Biomek NXp® Laboratory Automation Workstation	Beckman Coulter, Brea, USA
Plattenabdeckfolie	Adhesive Plate Seals	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA
Reaktionstubes 0,2 ml	PCR SoftTubes 0,2 ml	Biozym Scientific GmbH, Hessisch Oldendorf, Deutschland
Reaktionstubes 1,5 ml, 2 ml	SafeSeal 1,5 ml, 2 ml	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Schwenkmischer	Desaga SM1 Universal Schwenkmischer	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Sequenziergerät	24-capillary 3500xL Genetic Analyzer	Applied Biosystems, Foster City, USA

Gerät	Bezeichnung	Hersteller
Thermocycler für MLPA-Reaktion	iCycler™ Thermalcycler	Bio-Rad, Hercules, USA
Thermocycler für Sequenzierreaktion	Veriti 96 well Fast Thermal Cycler	Applied Biosystems, Foster City, USA
Thermomixer	Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Wasseraufbereitungsanlage	Milli Q Reference Ultrapure Water Purification System	Merck Millipore, Darmstadt, Deutschland
Zentrifuge für Einzeltubes	miniSpin	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Zentrifuge für Multiwell-Platten	Heraeus Labofuge 400	Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA

3.3. Software und Datenbanken

3500 Data Collection Software: Applied Biosystems

Berkeley Drosophila Genome Project: <http://www.fruitfly.org/>

Biomek® Software: Beckman Coulter

Center for Biological Sequence Analysis: <http://www.cbs.dtu.dk/>

Ensembl: <http://www.ensembl.org/index.html>

Genetics Home Reference: <http://ghr.nlm.nih.gov/>

NCBI: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>

OMIM: <http://www.omim.org/>

Primer3 (v. 0.4.0): <http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>

RaW_Probe: XRatel Software

SEQUENCE Pilot: JSI medical systems GmbH

UCSC: <http://genome.ucsc.edu/>

3.4. Primer- und Sondendesign

PCR und Sequenzierung: Bei Primern handelt es sich um Oligonukleotide, die spezifisch an eine Zielsequenz binden und 18 bis 27 Nukleotide umfassen. Sie fungieren als Starter-Moleküle für die Taq-Polymerase bei der PCR. Die Ermittlung geeigneter Primersequenzen für die elf Exons des *NFIX*-Gens sowie der flankierenden intronischen Regionen erfolgte mit dem Online-Programm „Primer3 (v. 0.4.0)“ (<http://frodo.wi.mit.edu/primer3/>). Wichtige Parameter, die Beachtung finden mussten waren die Schmelztemperatur (T_m) der Primer, die zwischen 57 und 63°C liegen, die Fragmentgröße, die bei maximal 550 bp liegen sowie der GC-Gehalt, der zwischen 20-80 % betragen sollte. Außerdem sollte die „Max Poly X“ nicht mehr als 4 ergeben, das heißt, dass nicht mehr als 4 gleiche Basen aufeinander folgen dürfen. Eine weitere wichtige Einflussgröße ist der „CG-Clamp“, der bei 1 bis 2 liegen sollte. Das bedeutet, dass am 3`Ende der Primersequenz Regionen mit Guanin und Cytosin liegen, sodass der Primer hier aufgrund der stärkeren Wasserstoffbrückenbindung eine stabilere Bindung mit der Zielsequenz eingehen kann. Weiterhin ist es optimal, wenn sich der Primer nicht auf einem SNP oder Repeat befindet und lokusspezifisch ist. Um dies zu gewährleisten wurden die Primer online über eine Blat-Software auf der UCSC-Website kontrolliert. Die ermittelten Oligonukleotide wurden bei der Firma „Thermo Scientific“ zur Synthese in Auftrag gegeben. Die gelieferten Primer wurden sie mit Millipore-Wasser nach Herstellerangabe zu einer Stocklösung von 100 pmol/μl verdünnt, für etwa acht Stunden auf dem Schwenkmischer platziert und danach bei -20 °C gelagert. Aus dieser Stocklösung wurde die Gebrauchslösung hergestellt, die wiederum mit Millipore-Wasser auf 2,5 pmol/μl verdünnt und bei 4 °C aufbewahrt wurde.

Zunächst wurden die Primer an einer Kontroll-DNA getestet und die PCR-Produkte gelelektrophoretisch aufgetrennt, um den Erfolg der Amplifikation zu beurteilen. Es stellte sich heraus, dass die Primerpaare für Exon 1 und Exon 5 nicht funktionierten. Daraufhin wurden für diese Exons neue Primer erstellt, die sich als zuverlässiger herausstellten. Die neuen Primer für Exon 1 (*NFIX e1nf* und *NFIX e1nr*) erfüllten die oben beschriebenen Kriterien hinsichtlich der Fragmentlänge nicht, da sie mehr als 550 bp beinhalteten. Allerdings wurden sie nur in der PCR eingesetzt. Bei der Sequenzierung fanden die ursprünglichen Exon1-Primer Einsatz im Sinne einer nested-PCR (siehe Kap. 7.2, Tabelle 7.3).

MLPA: Auch die Sonden für die MLPA (siehe Kap. 7.3, Tabelle 7.4) wurden selbst erstellt nach einem Protokoll von MRC Holland (MRC Holland 2012). Eine Sonde besteht dabei allgemein aus zwei Oligonukleotiden, dem RPO (right probe oligo) und dem dem LPO (left probe oligo), die spezifisch direkt nebeneinander an die DNA binden und im Ligationsschritt miteinander verbunden werden können. Bei der Erstellung der Sonden mussten der GC-Gehalt und die T_m besondere

Beachtung finden. Der Gehalt an Guanin und Cytosin sollte bei ungefähr 50 % liegen, darf aber 40 % nicht unterschreiten sowie 65 % nicht überschreiten. Die T_m sollte bei über 70 °C liegen. Dies konnte mit Hilfe des Programmes „RaW_Probe“ überprüft werden. Die MLPA-Sonden bestanden nur aus den Hybridisierungssequenzen und den Primerbindungssequenzen. Stuffersequenzen wurden nicht genutzt. Ihre Länge unterschied sich ausschließlich durch unterschiedlich lang gewählte Hybridisierungssequenzen. Zur Kontrolle auf SNPs oder Repeats im Bereich der Hybridisierungssequenzen wurden sie auf der UCSC-Homepage mittels eines Blat-Programmes überprüft.

Vorab wurden auch die MLPA-Sonden an einer Kontroll-DNA getestet. Dabei zeigten sich wieder Probleme für die Exon1-Sonde, vermutlich aufgrund des hohen GC-Gehalts dieses Exons. Deshalb wurde eine neue Sonde für dieses Exon angefertigt, welche etwa 660 bp vor dem Exon lag und mit „Prom“ bezeichnet wurde. Diese Sonde stellte sich in der erneuten Testung mit einer Kontroll-DNA als zuverlässig heraus. Alle weiteren Sonden sind in den entsprechenden Exons lokalisiert. Weiterführend wurden zur exakteren Bestimmung der Deletionen auch Intron 6 und 7 untersucht und entsprechende Sonden für diese Regionen designt.

3.5. PCR (Polymerase Chain Reaction)

Prinzip: Die von Kary Banks Mullis entwickelte PCR ist ein in vitro Verfahren mit dem man gezielt DNA-Sequenzen vervielfältigen kann. Der zu amplifizierende Abschnitt wird durch Oligonukleotid-Primer flankiert, die spezifisch an eine definierte Sequenz binden. Die Reaktion verläuft in drei Schritten, die sich zyklisch wiederholen. Zuerst wird durch starkes Erhitzen auf 93 bis 95°C (Denaturierung) eine Auftrennung der komplementären DNA-Stränge erreicht. Beim zweiten Schritt, dem Annealing, binden die Primer bei einer Temperatur von 50 bis 70°C an die DNA. Schließlich beginnt durch die hitzestabile Taq-Polymerase am 3'OH-Ende der Primer den Kettenaufbau durch den Einbau der im Überschuss vorhandenen dNTPs. Dieser Schritt findet bei ca. 80 °C statt und wird als Elongation bezeichnet. Bei dem entstehenden PCR-Produkt handelt es sich um stark vervielfältigte doppelsträngige DNA, deren Größe der Distanz zwischen dem Primerpaar entspricht.

Durchführung: Vor der Herstellung des PCR-Ansatzes wurden alle Reagenzien (siehe Kap. 7.4, Tabelle 7.5) außer der Taq-Polymerase durchmischt mit dem Vortex Genie®. Zuerst erfolgte das Einfüllen der F- und R-Primer in eine 96-Well-Platte auf Eis. Die restlichen Bestandteile, außer der DNA wurden zu einem Mastermix vermengt und zu den Primern pipettiert. Anschließend wurde noch die DNA zugefügt und die gesamte Platte kurz zentrifugiert. Danach lief die PCR-Reaktion im Thermocycler mit dem Programm „Erlangen65“ (siehe Kap. 7.6, Tabelle 7.13) ab.

3.6. Gelelektrophorese

Prinzip: Die Gelelektrophorese mittels Agarose ist ein Verfahren zur Trennung von Nukleinsäuren. Die elektrisch negativ geladenen DNA-Moleküle wandern in einem elektrischen Feld Richtung Anode. Je nach Molekülgröße wandern die Fragmente unterschiedlich schnell und somit unterschiedlich weit durch die Poren des Gels. Die PCR-Fragmente können durch UV-Licht sichtbar gemacht werden und stellen sich als Banden dar. Ermöglicht wird dies durch die Zugabe von Ethidiumbromid zum Ansatz des Gels und dessen Komplexbildung mit der DNA, die zu einer starken Fluoreszenz führt. Die Fragmentgrößen können nun im Vergleich zum Längenstandard bestimmt und eine erfolgreiche Amplifikation der Zielsequenz beurteilt werden.

Durchführung: Zur Herstellung eines 2 %igen Agarosegels wurden zunächst 2 g Agarose in einem Kolben abgewogen und mit 1xTBE-Puffer auf 100 ml aufgefüllt. Dann wurde dieser Ansatz bis zur vollständigen Auflösung der Agarose in der Mikrowelle aufgeköcht. Darauf folgte die Zugabe von 10 µl Ethidiumbromid sowie eine 10-minütige Abkühlungsphase unter gleichzeitiger Durchmischung auf dem Rührgerät. Anschließend wurde das Gemisch in eine Gelkammer gegossen, mit Kämmen für die Probereservoirs versehen und für etwa 30 Minuten zur Aushärtung stehen gelassen. Das verfestigte Gel wurde nach dem Entfernen der Kämmen und der Abstandhalter in eine Elektrophoresekammer verbracht und mit 1xTBE-Puffer überschichtet. Zunächst wurden 3 µl des Ladepuffers mit jeweils 5 µl des Längenstandards (100 bp) gemischt und in die erste Geltasche pipettiert. Danach wurden auf die gleiche Weise je 5 µl der PCR-Proben mit dem Ladepuffer vermengt und in die folgenden Taschen gefüllt. Bei einer angelegten Spannung von 120 V betrug die Laufzeit des Gels 30 bis 35 Minuten. Nach Beendigung der Elektrophorese schloss sich die Fotografie des Gels auf einem UV-Lichttisch an.

3.7. Aufreinigung des PCR-Ansatzes

Prinzip: Um die PCR-Produkte sequenzieren zu können, müssen sie vorher von Reagenzien, die in der PCR-Reaktion nicht verbraucht wurden, befreit werden. Dabei handelt es sich um übrig gebliebene Primer, dNTPs und Puffer. Dies wurde mit Hilfe der Magnetplatte und des Pipettierroboters ausgeführt. Bei dieser Methode werden die PCR-Produkte an magnetische Kügelchen (Beads) gebunden und durch Zugabe von Ethanol von den störenden Reagenzien getrennt. Danach werden die Produkte durch Elution mit Millipore-Wasser von den Beads getrennt. Während die Beads durch Anziehung der Magnetplatte in der Ursprungsplatte verbleiben werden die PCR-Amplikons in eine neue Platte überführt (Beckman Coulter 2009).

Durchführung: In das Aufreinigungsgerät wurden die PCR-Platte, eine Zwischenplatte sowie eine Endplatte, Pipettierspitzen sowie Reservoirs mit Millipore-Wasser, Ethanol (70 %) und den AMPure®-Beads platziert. Der dafür notwendige Ethanol wurde dazu selbst hergestellt indem in einem Kolben zu 140 ml Ethanol (100 %) 60 ml Millipore-Wasser gegeben wurden. Die Aufreinigung erfolgte automatisch über die „Biomek® Software“ und das entsprechende Programm „AGCT AMPure 96 Magdeburg_no dilution“.

3.8. Sequenzier-Reaktion

Prinzip: Die Sequenzierung ist ein Verfahren mit dem man die Nukleotidabfolge einer DNA ermitteln kann. Das hier genutzte Verfahren ist der Didesoxymethode nach Sanger und Coulson angelehnt (Sanger et al., 1977).

Die Abfolge der Sequenzier-Reaktion ähnelt der PCR, auch hier gibt es die drei Schritte Denaturierung, Annealing und Elongation. Nach der Denaturierung liegt die DNA als Einzelstrang vor und dient als Matrize für eine DNA-Polymerase. Im Unterschied zur PCR-Reaktion findet hier nur jeweils einer der beiden Primer Verwendung, entweder der vorwärts oder der rückwärts orientierte. Dadurch ist der Zuwachs der Produkte linear, statt wie bei der PCR exponentiell. Im Reaktionsansatz befinden sich nicht nur die vier dNTPs, sondern auch eine kleinere Menge der analogen Didesoxyribonukleotide (ddNTPs). Diese sind mit vier unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen markiert. Bei den ddNTPs ist im Gegensatz zu den dNTPs die Ribose an Position 3' desoxidiert. Somit fehlt am 3'-Kohlenstoff-Atom die Hydroxylgruppe, die notwendig ist um ein weiteres Nukleotid anzuhängen. Wird ein ddNTP in den Strang eingebaut kommt es zum Abbruch der Synthese. So entstehen unterschiedlich lange Fragmente, die zwar dasselbe 5'-Ende besitzen, sich jedoch durch verschiedene 3'-Enden unterscheiden.

Durchführung: Es wurden vor der Anfertigung des Ansatzes zunächst alle Bestandteile (siehe Kap. 7.4, Tabelle 7.6) durchmischt mit dem Vortex Genie® 2. Dann wurden zuerst die Primer in eine 96-Well-Platte auf Eis pipettiert. Danach wurden die weiteren Reagenzien, ausgenommen die PCR-Produkte, zu einem Mastermix vermennt und zu den Primern zugefügt. Nach Zugabe der aufgereinigten PCR-Produkte wurde die Platte kurz zentrifugiert, in den Thermocycler eingebracht und das Programm „ABI SEQ 2 98C“ (siehe Kap. 7.6, Tabelle 7.14) eingestellt.

3.9. Aufreinigung des Sequenzier-Ansatzes

Prinzip: Auch der Sequenzier-Ansatz muss vor der automatischen Sequenzierung von Reagenzien, die in der Sequenzier-Reaktion nicht verbraucht wurden, befreit werden. Hierbei sind besonders die fluoreszenzmarkierten ddNTPs zu erwähnen, die die nachfolgende Reaktion erheblich stören könnten. Die Aufreinigung der Sequenzier-Produkte unterscheidet sich von der der PCR-Produkte (siehe Kapitel 3.7) nur durch den Einsatz von 85 %igem Ethanol statt des 70 %igen und der CleanSEQ-Beads statt der AMPure®-Beads.

Durchführung: Auch hier wurde der Ethanol selbst hergestellt indem in einem Kolben 170 ml Ethanol (100 %) mit 30 ml Millipore-Wasser vermennt wurden. Außerdem wurde für den automatischen Reinigungsprozess die „Biomex® Software“ und das Programm „AGCT CleanSEQ Magdeburg No Transfer“ verwendet. Ansonsten wurde das gleiche Gerät benutzt und auch die restlichen Materialien entsprechen den unter 3.7. aufgeführten.

3.10. Sequenzierung und Auswertung der Sequenzen

Prinzip: Bei der automatischen Sequenzierung werden die Produkte der Sequenzier-Reaktion mittels einer Kapillarelektrophorese der Länge nach aufgetrennt. Die fluoreszenzmarkierten DNA-Moleküle wandern mit unterschiedlicher Geschwindigkeit durch ein POP-7-Polymer-Gel. Während der Elektrophorese regt ein Laserstrahl, der rechtwinklig zur Bewegungsrichtung positioniert ist, die Fragmente zur Lichtemission an. Dieses Licht wird wiederum von Photosensoren detektiert, elektronisch abgespeichert und kann mit einer entsprechenden Software später graphisch dargestellt und ausgewertet werden. Die Sequenzinformation ergibt sich aus der Abfolge der detektierten Nukleotide.

Durchführung: Die automatische Sequenzierung wurde unter Verwendung des BigDye Terminator v1.1 mit dem Sequenziergerät „3500xL Genetic Analyzer“ der Firma Applied Biosystems und unter der Nutzung der Software „3500 Data Collection Software“ durchgeführt. Nach Beendigung der Sequenzierung wurden die Daten in das Programm „SEQUENCE Pilot“ des Unternehmens JSI medical systems geladen und im Vergleich mit der Referenzsequenz ENST00000592199 (<http://www.ensembl.org/index.html>) ausgewertet. Die Bezeichnung der Mutationen folgen den Leitlinien der Human Genome Variation Society (<http://www.hgvs.org/mutnomen/>). Alle genomischen Positionen beziehen sich auf GRCh37/hg19.

3.11. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

Einführung: Die MLPA ist eine neue PCR-basierte Methode zur DNA-Untersuchung. Zuerst wurde sie im Jahr 2002 von Jan P. Schouten beschrieben (Schouten et al., 2002). Es handelt sich hier um ein sensitives Verfahren zur relativen, quantitativen Bestimmung von Sequenzkopien. Genutzt wird die MLPA überwiegend zur Detektion von kleinen Kopienzahlveränderungen von DNA- und RNA-Sequenzen. Man kann hiermit vor allem Exon-Deletionen und –Duplikationen in Genen aufdecken, die mit PCR und Sequenzierung nicht nachgewiesen werden können (MRC-Holland 2011).

Prinzip: Eine MLPA-Sonde besteht aus zwei Oligonukleotiden. Ist die Sequenz in der zu untersuchenden, denaturierten DNA vorhanden, hybridisieren diese an benachbarter Stelle. Im nächsten Schritt verbindet eine thermostabile Ligase die beiden Oligonukleotide miteinander. Nur die verbundenen Sonden können nun mittels PCR amplifiziert werden. Da die Generierung der PCR-Fragmente aus den ligierten Sonden verschiedener Loci in einer Reaktion erfolgt, handelt es sich bei diesem Verfahren um eine Multiplex-PCR. Die Tatsache, dass die Amplifikation aller Fragmente mit ein und demselben Primerpaar erfolgt, macht den quantitativen Vergleich möglich. Die Länge der Produkte kann zwischen 130 bis 490 Nukleotide betragen. Zum Schluss werden die mit Fluoreszenzfarbstoffen versehenen MLPA-Produkte durch Kapillarelektrophorese aufgetrennt und die Lichtsignale detektiert und elektronisch gespeichert (vgl. Abb. 3.1). In der Elektrophorese läuft außerdem der Größenstandard „LIZ500 size standard“ mit, der es in der Auswertung ermöglicht, die Fragmente ihren jeweiligen Größen zuzuordnen. Da die Lichtintensität in Abhängigkeit von der Menge der Produkte variiert, können später durch die Software unterschiedlich hohe Signalintensitäten errechnet werden. Bei der Auswertung ist es wichtig die Patientenprobe immer mit einer Referenzprobe zu vergleichen. Die Unterschiede in der Kopiezahl der durch die MLPA-Sonden definierten DNA-Abschnitte im Ausgangsmaterial zeigen sich durch Differenzen in den relativen Signalintensitäten von Patienten im Vergleich zur Kontrollprobe.

Für eine heterozygote Deletion liegt die erwartete Signalstärke um 50 % und für eine heterozygote Duplikation bei um 150 %. Werte unterhalb von 75 % bzw. über 125 % werden als auffällig bewertet (MRC-Holland 2011).

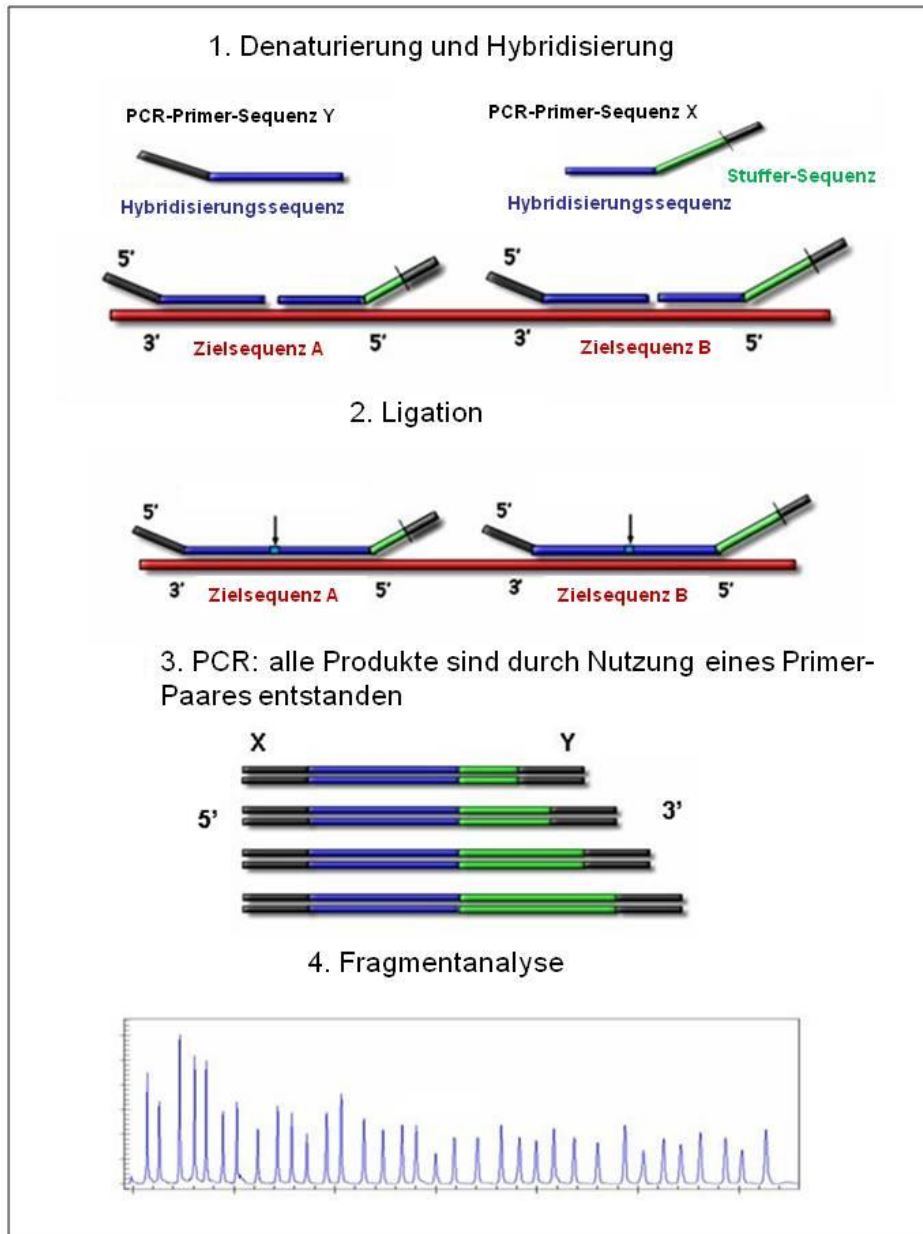


Abb.3.1: MLPA-Prinzip. Dargestellt sind die einzelnen MLPA-Schritte (modifiziert nach (MRC-Holland 2011)).

Durchführung: Zunächst wurde der Probemix 1 aus den selbst entworfenen Sonden für alle Exons des *NFIX*-Gens erstellt. Dabei wurde je Sonde eine bestimmte Menge (siehe Kap. 7.5, Tabelle 7.11) der Oligonukleotidlösungen (1 pmol/μl) mit TE auf 200 μl in einem 1,5 ml-Reaktionsgefäß aufgefüllt. Dieser Probemix wurde bei 4 °C gelagert und für die MLPA-Analyse verwendet.

Später wurde der Probe-Mix 2 (siehe Kapitel 7.5, Tabelle 7.12) hergestellt, in dem auch die Kontrollsonden CTH und ERCC6 Einsatz fanden. Dies sind Sonden für willkürlich gewählte Loci, die sich in vorherigen Analysen in unserem Labor als besonders stabil erwiesen hatten. Auch dieser Probe-Mix wurde auf die gleiche Weise erstellt und bei 4 °C gelagert. Die Lage der MLPA-Sonden innerhalb des *NFIX*-Gens ist in Abb. 3.2 dargestellt

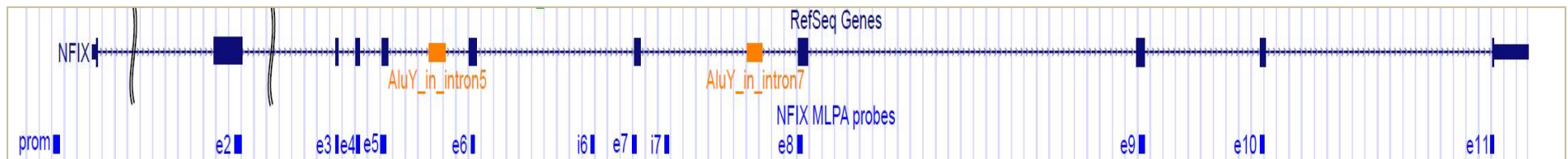


Abb. 3.2: Lage der MLPA-Sonden innerhalb des *NFIX*-Gens. Dargestellt ist oben) das *NFIX*-Gen mit seinen 11 Exons (dunkelblaue Rechtecke) und der Lage von Alu-Y-repeats in Intron 5 und 7 (orange Rechtecke) sowie unten). Blaue Rechtecke bezeichnen exakte physikalische Lage der MLPA-Sonden innerhalb des Gens (prom = Sonde für Exon 1, e2 – e11 = Sonden für Exon 2 – 11, i6 und i7 = Sonden für Intron 6 und 7; Abb. wurde mit Hilfe des UCSC Genom Browsers (<http://genome.ucsc.edu/>) erstellt.)

Die weiteren Schritte der MLPA haben sich auf drei Tage verteilt. Am ersten Tag wurden zuerst 5 µl einer 20 ng/µl-Verdünnung der DNA in 0,2 ml-Reaktionsgefäße vorgelegt, in einen Thermocycler gestellt und für 5 Minuten bei 98 °C mit dem Programm „MLPA1“ (siehe Kap. 7.6, Tabelle 7.15) denaturiert. Nun wurde der Hybridisierungs-Mastermix (siehe Kap. 7.4, Tabelle 7.7) angesetzt und gut gemischt mit dem Vortex Genie® 2. Bei 25 °C wurden je 3 µl in die noch im Cycler befindlichen Reaktionsgefäße pipettiert. Dann konnte das Programm „MLPA1“ für 16 bis 18 Stunden fortgesetzt werden.

Am zweiten Tag wurde dann zuerst der Ligase-Mastermix (siehe Kap. 7.4, Tabelle 7.8) angefertigt. Dabei wurden zunächst der Ligase-Puffer A, der Ligase-Puffer B und Millipore-Wasser zusammengegeben und gemischt mit dem Vortex Genie® 2. Dann wurde die Ligase hinzugefügt und durch Schütteln gemischt. Bei einer Temperatur von 54 °C wurden 32 µl des Ligase-Mastermixes in die noch im Thermocycler stehenden Reaktionsgefäße gegeben. Danach wurden in neue 0,2 ml-Reaktionsgefäße je 26 µl Millipore-Wasser und 4 µl PCR-Puffer pipettiert. Sobald der Cycler eine Temperatur von 15 °C erreicht hatte wurden die Proben entnommen. Nun wurden 10 µl der Ligationsreaktion in die vorbereiteten Reaktionsgefäße gegeben und mit deren Inhalt vermischt. Nachfolgend wurde der Thermocycler auf das Programm „MLPA2“ (siehe Kap. 7.6, Tabelle 7.16) umgestellt, woraufhin sich dieser auf 60 °C aufheizte. Bei Erreichen dieser Temperatur wurden die neuen Reaktionsgefäße in das Gerät gestellt und das Programm lief weiter. Als Nächstes wurde der Polymerase-Mastermix (siehe Kap. 7.4, Tabelle 7.9) hergestellt, gemischt und zu 10 µl zu den Proben im Cycler zugeteilt. Danach konnte das Programm fortgesetzt werden.

Am dritten Tag wurde mit dem Ansetzen des Lade-Mixes (siehe Kap. 7.4, Tabelle 7.10) begonnen. In diesem befand sich der zur späteren Auswertung wichtige Größenstandard „LIZ500 size standard“. Dann wurde 1 µl der Proben zu 10 µl des Lade-Mixes in eine 96-Well-Platte gegeben. Diese wurde für zwei Minuten bei 80°C zum Denaturieren im Thermocycler platziert. Darauffolgend wurde sie zum Abkühlen auf Eis gestellt. Schließlich wurde die Platte zur Fragmentanalyse in das Sequenziergerät gestellt. Die anschließende Auswertung erfolgte unter Nutzung des MLPA-Moduls im Programm „SEQUENCE Pilot“ des Unternehmens JSI medical systems.

4.4. Ergebnisse

4.1. Ergebnisse für die Marshall-Smith-Syndrom-Patienten

4.1.1 DNA-Sequenzanalyse

Bevor die DNA-Sequenzanalyse durchgeführt werden konnte, erfolgte zuerst die Polymerasekettenreaktion. Vor der ersten PCR mit den Patientenproben wurden die Primer an einer Kontroll-DNA getestet und die Produkte auf ein Agarosegel aufgetragen. Dies wird in der Abbildung 4.1. exemplarisch verdeutlicht. Weiterhin wurden nach jeder PCR einige Produkte stichprobenartig auf die gleiche Weise kontrolliert.

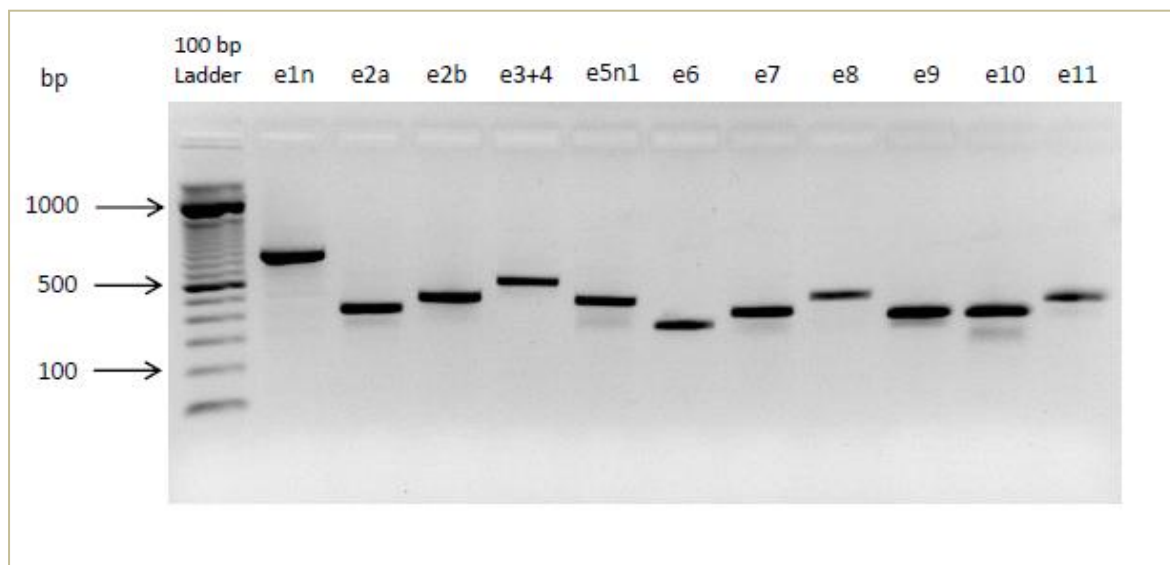


Abb. 4.1: Agarose-Gelelektrophorese. Zu sehen sind die PCR-Produkte für alle Exons des *NFIX*-Gens an einer Kontroll-DNA. Das große Exon 2 wird in zwei überlappenden Amplikons amplifiziert (e2a und e2b). Die relativ kleinen und eng beieinander liegenden Exons 3 und 4 sind in einem PCR-Amplikon (e3+4) zusammengefasst. Für Exons 1 und 5 mussten neue Primer bestellt werden, um eine effiziente Amplifikation zu erreichen (e1n, e5n1).

Von den insgesamt elf MSS-Patienten wurde bei sechs Individuen die DNA-Sequenzanalyse auf Mutationen im *NFIX*-Gen durchgeführt. Bei den restlichen fünf Patienten, die dem Kollektiv aus Frankreich entstammten (Kooperationspartner V. Malan und V. Cormier-Daire), war dieses Verfahren bereits dort mit negativem Ergebnis angewandt worden.

Von den sechs untersuchten Patientenproben konnten mit Hilfe der Sequenzierung in vier Fällen Mutationen identifiziert werden (Tabelle 4.1).

Alle Varianten wurden in den Exons 8 bis 10 detektiert. Beim Patienten P36 führte eine Duplikation der Purinbase Guanin im Exon 8 zum Frameshift und Stopcodon nach 59 Aminosäuren (c.1090dupG, p.(A364Gfs*59)) (Abb. 4.2). Ebenfalls im Exon 8 gelegen war die Mutation beim Patienten P37 (Abb. 4.3). Hier handelte es sich um eine 14 bp-Deletion, die zu einem Frameshift und zu einem Stopcodon nach 35 Aminosäuren führte (c.1146_1159del, p.(Y383Dfs*35)). Beim Patienten P38 handelte es sich um eine komplexe Duplikation am Übergang von Exon 9 zum Intron 9 (Abb. 4.4). Dabei wurden die elf letzten Basenpaare aus dem Exon 9 und die 32 angrenzenden Basenpaare aus dem Intron 9 dupliziert, wobei ebenfalls ein Frameshift mit einem Stopcodon nach neun Aminosäuren entstand (c.1392_1402+32dup, p.(S468Ffs*9)). Die vierte Variante war eine Mutation im Exon 10 beim Patienten P46 (Abb. 4.5). Hier führte eine Deletion der Pyrimidinbase Cytosin zum Frameshift und zum vorzeitigen Translationsstop nach 6 Aminosäuren (c.1456delC, p.(R486Gfs*6)). Für sämtliche Patienten, von denen DNA-Proben der Eltern vorhanden waren, wurde der entsprechende Abschnitt in der Eltern-DNA sequenziert, um die Neumutation nachzuweisen (Tabelle 4.1., Abb. 4.2 – Abb. 4.5)

Tabelle 4.1: *NFIX*-Mutationen der MSS-Patienten. Dargestellt sind die Mutationen von P36, P37, P38, P46 auf Exon-, cDNA- und Proteinebene sowie der De-novo-Status (k. M. = kein Material vorhanden).

Patient	Exon	Mutation		
		c-DNA	Protein	Status
P36	8	c.1090dupG	p.(A364Gfs*59)	De novo
P37	8	c.1146_1159del	p.(Y383Dfs*35)	k. M.
P38	9	c.1392_1402+32dup	p.(S468Ffs*9)	De novo
P46	10	c.1456delC	p.(R486Gfs*6)	De novo

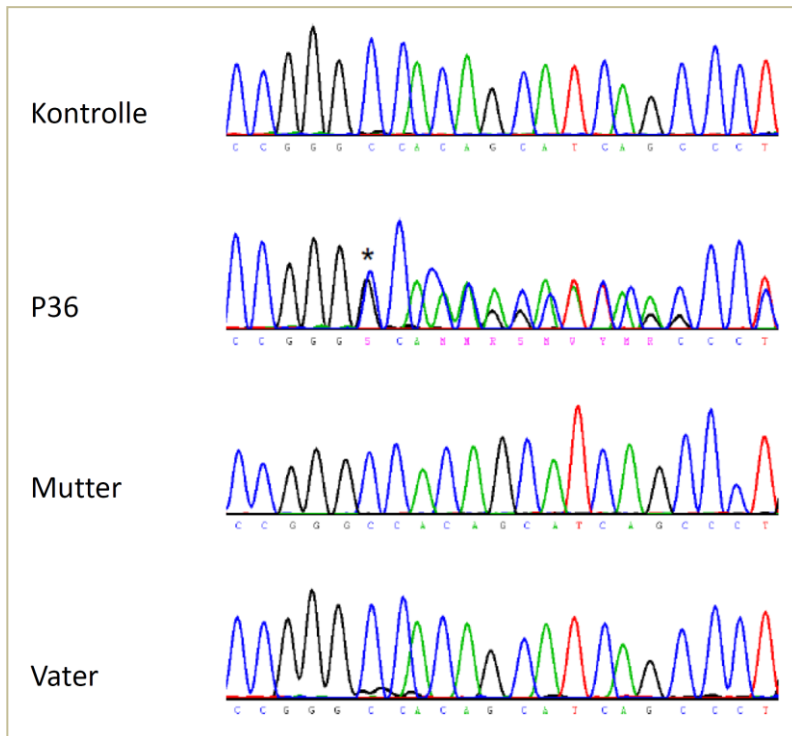


Abb. 4.2: Sequenzchromatogramm des MSS-Patienten P36. Dargestellt ist 2. Reihe: die Mutation des Patienten 36 (c.1090dupG), markiert durch * im Exon 8 im Vergleich zu 1. Reihe: einer gesunden Kontrollperson sowie 3. und 4. Reihe: die Sequenzchromatogramme der Eltern.

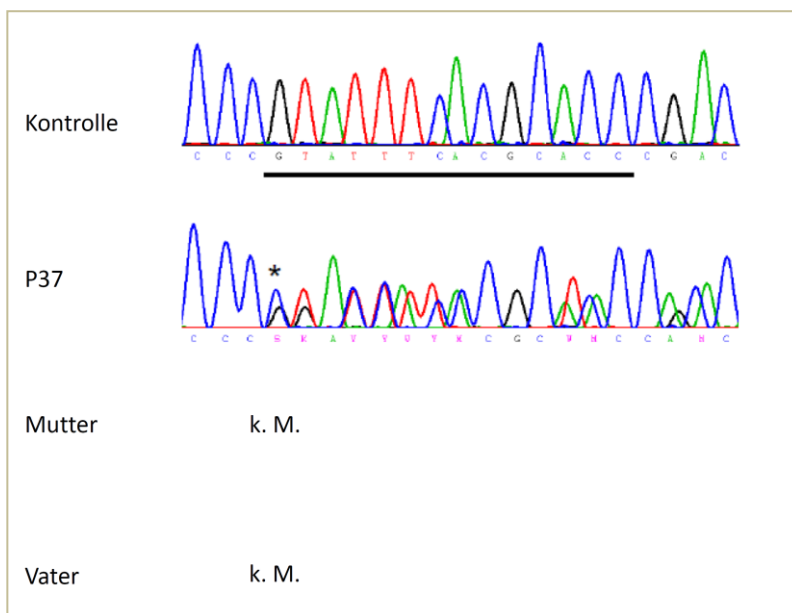


Abb. 4.3: Sequenzchromatogramm des MSS-Patienten P37. Dargestellt ist 2. Reihe: die Mutation des Patienten 37 (c.1146_1159del), markiert durch * im Exon 8 im Vergleich zu 1. Reihe: einer gesunden Kontrollperson, 3. und 4. Reihe: von den Eltern war kein Material vorhanden (= k. M.).

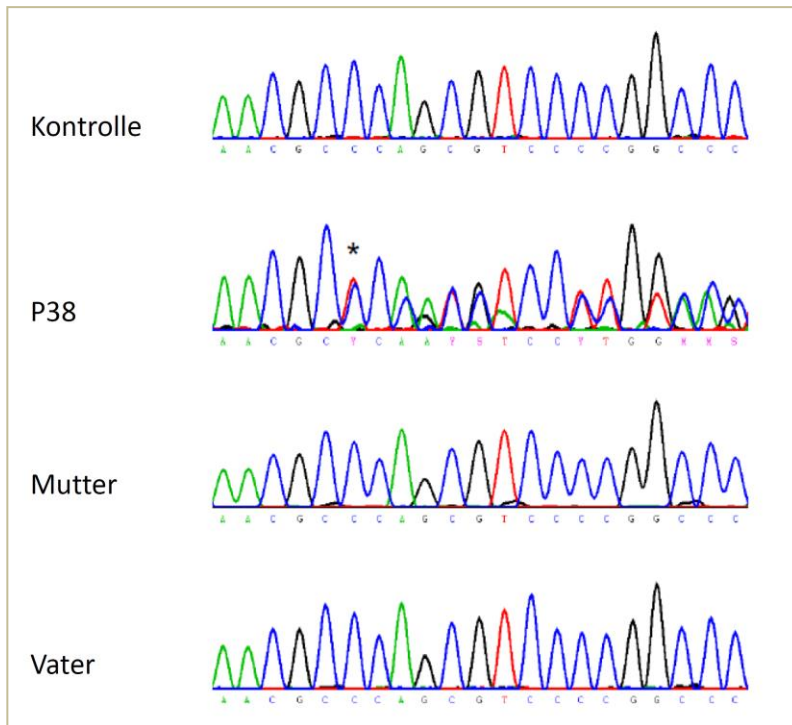


Abb. 4.4: Sequenzchromatogramm des MSS-Patienten P38. Dargestellt ist 2. Reihe: die Mutation des Patienten 38 (c.1392_1402+32dup), markiert durch * im Exon 9 im Vergleich zu 1. Reihe: einer gesunden Kontrollperson sowie 3. und 4. Reihe: die Sequenzchromatogramme der Eltern.

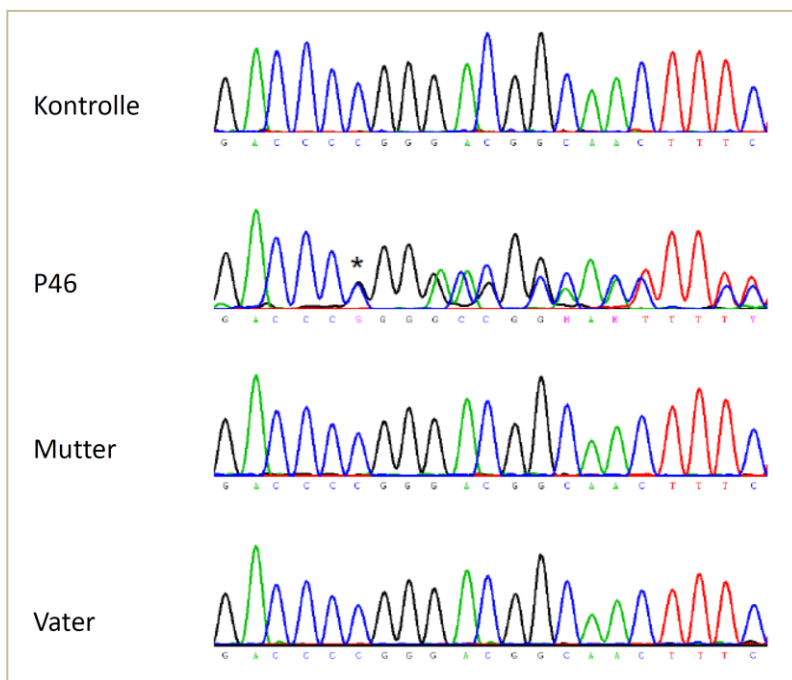


Abb. 4.5: Sequenzchromatogramm des MSS-Patienten P46. Dargestellt ist 2. Reihe: die Mutation des Patienten 46 (c.1456delC), markiert durch * im Exon 10 im Vergleich zu 1. Reihe: einer gesunden Kontrollperson sowie 3. und 4. Reihe: die Sequenzchromatogramme der Eltern.

4.1.2 MLPA-Analyse

Vor Anwendung der selbst etablierten MLPA-Analyse an der Patienten-DNA wurden auch hier die Sonden an einer Kontroll-DNA getestet. Da die Sonde für das Exon 1 aufgrund des hohen GC-Gehalts nicht stabil funktionierte, wurde eine neue Sonde entworfen, die die Bezeichnung „Prom“ erhielt und dem Exon 1 etwa 660 bp vorgelagert war (hypothetische Promotor-Region; Abb. 4.6, siehe auch Kapitel 3.4). Die restlichen Sonden zeigten eine gute Funktionalität.

Die Abbildung 4.6 zeigt einen MLPA-Dosis-Blot. Beim oberen Diagramm beschreibt die Abszisse die Fragmentgröße der Sonden und die Ordinate die Signalintensität der Sondenkopien. Die violetten Balken stellen drei gegeneinander gemittelte weibliche Kontrollen und deren Standardabweichung dar. Die grünen Balken bilden den untersuchten Patienten ab (Abb. 4.6 a). Im unteren Diagramm ist der Grad der Abweichung der Signalintensität der Sondenkopien des Patienten im Vergleich zu den Kontrollen abgebildet. Die Kontrollen entsprechen dabei 100 % (Abb. 4.6 b)

Es handelt sich dann um eine heterozygote Deletion des DNA-Abschnitts im Zielbereich der Sonde, wenn die relative Signalintensität um 50% liegt (Grenze bei 75 %). Eine homozygote Deletion wäre bei einem Wert von 0% nachgewiesen, da hier keine DNA-Kopie vorhanden wäre, an der eine Sonde binden könnte. Weiterhin spricht eine Erhöhung der Gendosis auf um 150 % für eine Duplikation einer Genkopie. Werte zwischen 75% und 125% liegen im normalen Streubereich.

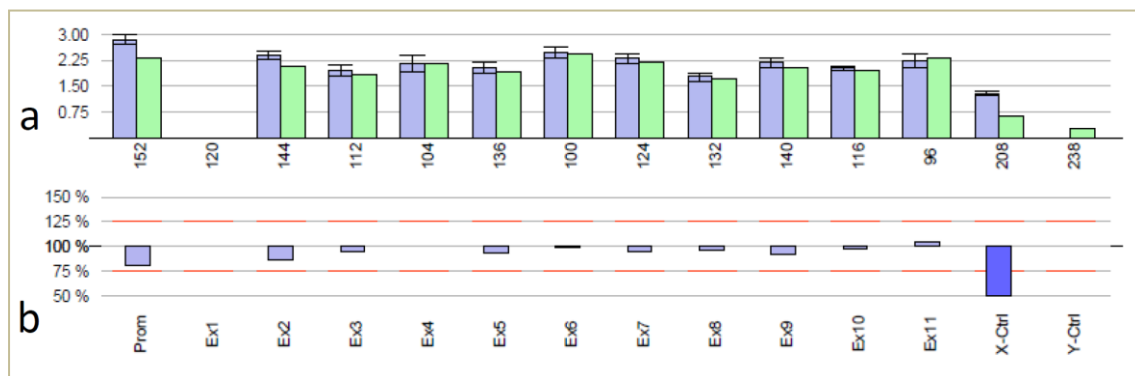


Abb. 4.6: Normaler MLPA-Dosis-Blot einer Kontroll-DNA. Gezeigt ist der *NFIX*-Standard-Ansatz (Probe-Mix 1) mit quantitativer Darstellung der Sondenkopien der 11 Exons des *NFIX*-Gens sowie der Kontrollsonden (Ctrl) auf dem X- und Y-Chromosom bei einer männlichen Probanden-DNA und weiblichen Referenz-DNAs (50% Dosis für die X-chromosomale Kontrollsonde).

Die sieben Patienten, die unauffällige Befunde in der Sequenzierung zeigten (5 voruntersucht bei den französischen Kooperationspartnern und 2 aus der eigenen Kohorte), wurden nun mittels selbst designtem MLPA-Assay auf exonische Deletionen oder Duplikationen untersucht. Die Auswertung

der Patienten erfolgte immer im Vergleich zu drei weiblichen Kontrollen. Hier fanden sich bei drei Patienten (P39, P40, P43) Dosisunterschiede im Vergleich zu den Kontrollen (Abb. 4.7 und 4.9), ein Patient zeigte einen unauffälligen Befund und drei Patienten (zugeschickte DNA-Proben) konnten aufgrund unzureichender DNA-Qualität nicht ausgewertet werden.

Bei den detektierten Dosisunterschieden der drei Patienten handelte es sich um Dosisverminderungen auf etwa 50% für die Sonden für Exon 6 und 7 (Abb. 4.7 A-C, jeweils b, blaue Balken für Exon 6 und 7) und folglich um heterozygote Deletionen. Bei den Patienten P39 und P43 handelte es sich um weibliche Patienten, bei Patient P40 um einen männlichen. Dies war der Grund für die Dosisverminderung der Kontrollsonde für das X-Chromosom bei letzterem (Abb. 4.7 B).

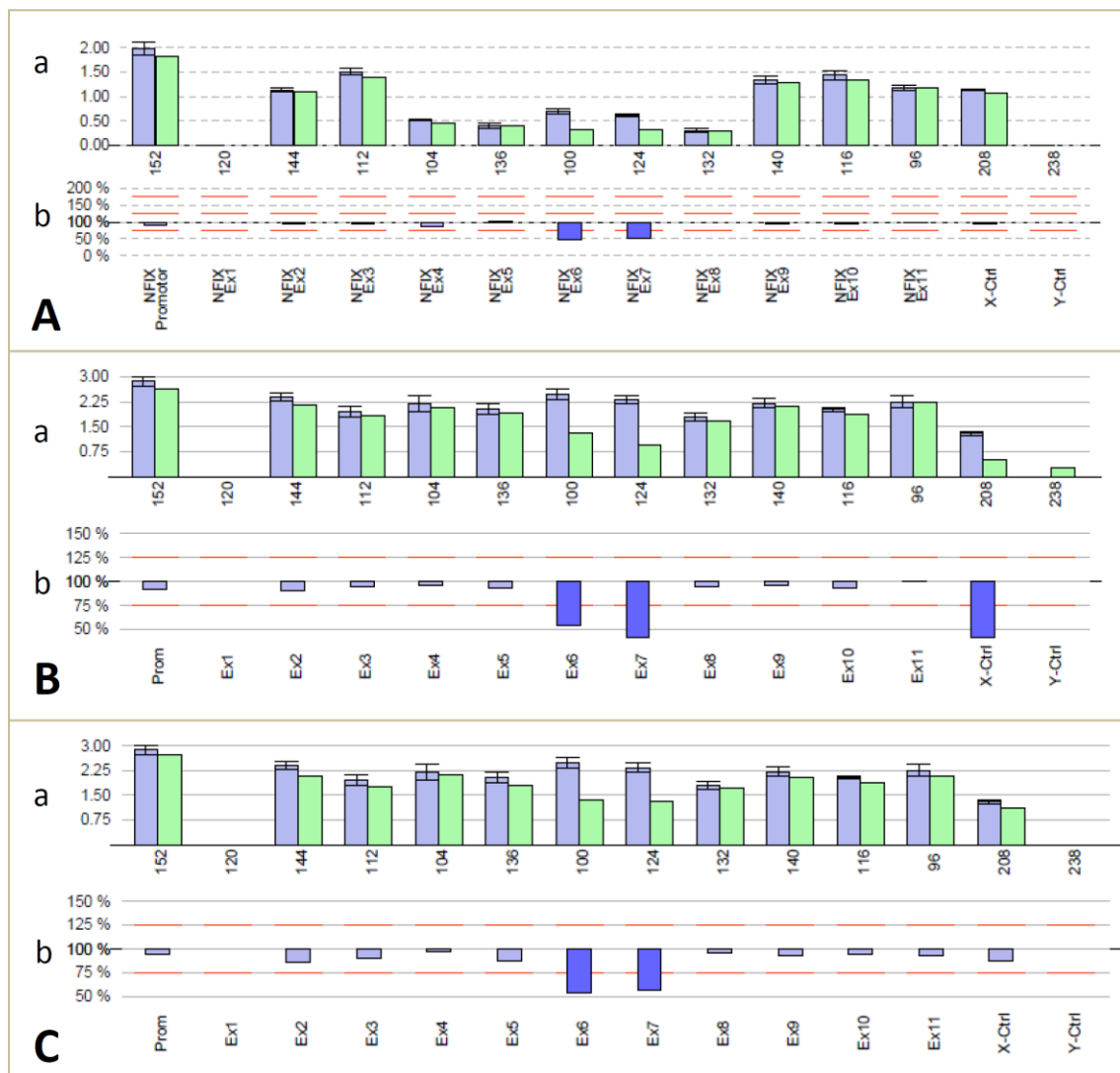


Abb. 4.7: Deletionen von Exon 6 und 7 im Standard-MLPA-Dosis-Blot. Gezeigt ist die quantitative Darstellung der Sondenkopien der 11 Exons des *NFIX*-Gens sowie der Kontrollsonden (Ctrl) auf dem X- und Y-Chromosom. Beachte besonders die heterozygote Deletion der Sonden für Exon 6 und 7 (A: P39, B: P40, C: P43).

Um diese Ergebnisse zu bestätigen und die Ausdehnung der Deletionen genauer eingrenzen zu können, wurde eine erneute MLPA mit einem modifiziertem Satz an Sonden (Probe-Mix 2) angefertigt (siehe Kap. 7.5, Tabelle 7.12). In diesem befanden sich neben zwei neuen Sonden für Intron 6 und Intron 7, die Sonden für Exon 4 bis Exon 9 sowie die zwei gut etablierten Referenzsonden CTH und ERCC6. Diese Referenzsonden haben bei vorher durchgeführten MLPAs gleichmäßige Ergebnisse erbracht und wurden hier genutzt, um zu beurteilen, ob die MLPA-Reaktion erwartungsgemäß funktioniert hatte.

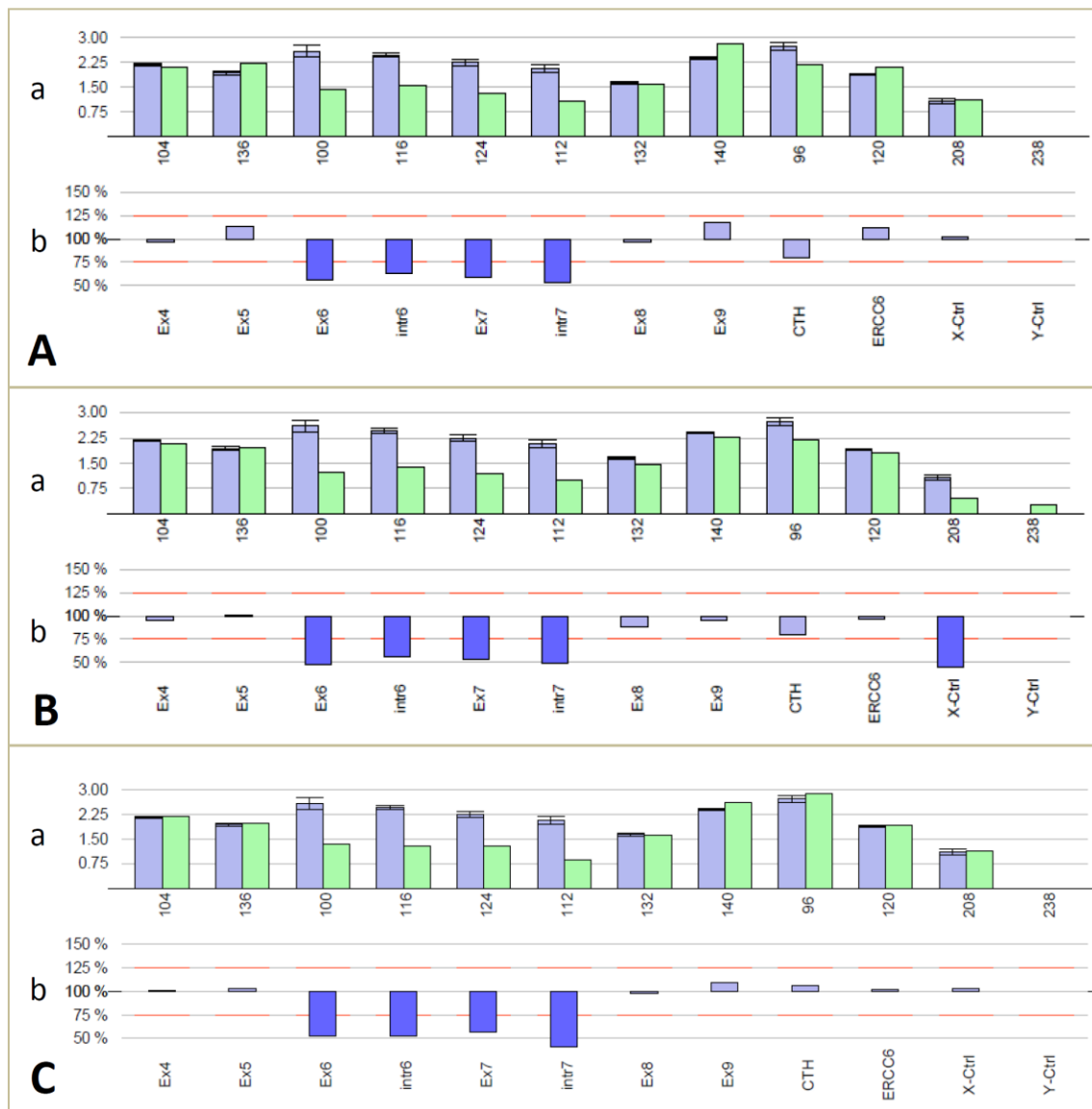


Abb. 4.8: Deletionen von Exon 6 und 7 sowie Intron 6 und 7 im modifizierten MLPA-Dosis-Blot. Zu sehen ist die quantitative Darstellung der Sondenkopien der Exons 4 bis 9 und der Introns 6 und 7 des *NFIX*-Gens sowie der Kontrollsonden CTH und ERCC6 und der Kontrollsonden (Ctrl) auf dem X- und Y-Chromosom. Beachte die heterozygote Deletion der Sonden für Exon 6 und 7 sowie Intron 6 und 7 (A: P39, B: P40, C: P43).

Die Ergebnisse der MLPA-Analyse mit dem modifizierten Ansatz (Probe-Mix 2) zeigten Dosisverminderungen der Sonden für Exon 6 und 7 sowie Intron 6 und 7 um 50% bei den Patienten P39, P40 und P43 (Abb. 4.8 A-C, jeweils b, blaue Balken für die Sonden Exon 6 und 7 sowie Intron 6 und 7). Somit konnte die Lokalisation der Bruchpunkte der Deletionen eingegrenzt werden auf einen Bereich zum einen innerhalb von Intron 5 und zum anderen im Intron 7 distal der entsprechenden MLPA-Sonde (siehe Abb. 4.9).

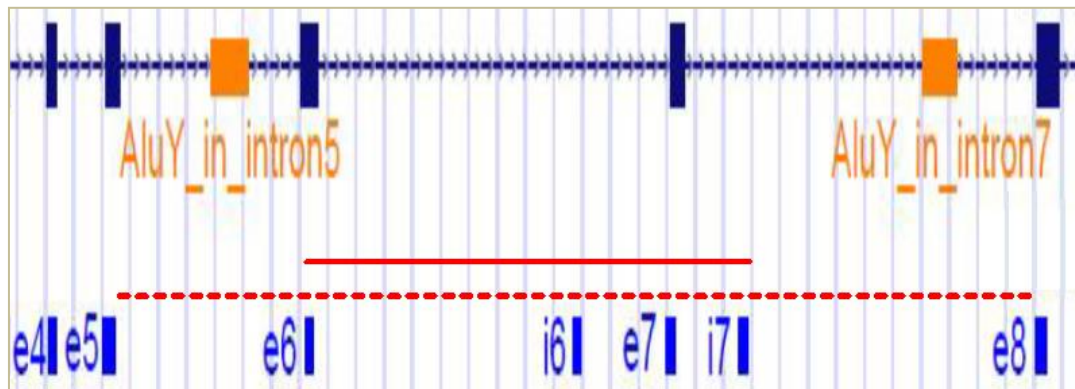


Abb. 4.9: Minimale und maximale Ausdehnung der Deletionen von Intron 5 bis Intron 7 abgeleitet durch die MLPA-Untersuchung. Ausschnitt aus Abb. 3.2: Positionen der MLPA-Sonden zwischen Exon 4 und Exon 8 sind in der unteren Reihe angegeben. Aus den Ergebnissen für diese Sonden ergibt sich die minimale (rote Linie) bzw. maximale (rot gestrichelte Linie) Ausdehnung der Deletionen.

4.2. Ergebnisse für die Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp

4.2.1 DNA-Sequenzanalyse

Die DNA-Sequenzanalyse sämtlicher kodierender Exons von *NFIX* sowie den angrenzenden intronischen Regionen wurde bei allen 35 Patienten mit Sotos-Syndrom-ähnlichem Phänotyp durchgeführt. Hierbei fanden sich bei drei Patienten Varianten. Diese traten in den Exons 2, 8 und 11 auf. Die Mutation im zweiten Exon wurde bei dem Patienten P2 detektiert. Es handelte sich um eine Punktmutation, die zu einem Austausch von Guanin zu Thymin führte. Durch diese Transversion kam es im Codon GAG zu einer Änderung nach TAG (c.187G>T, p.(E63*)) und demzufolge zu einem vorzeitigen Stopcodon (Abb. 4.10 A). Die Variante im Exon 8, welche beim Patienten P14 detektiert wurde, stellt einen Austausch von Guanin durch Adenin (c.1140G>A, p.(S380S)) dar, der allerdings nicht zu einem Aminosäureaustausch auf Proteinebene führt (Abb. 4.10 B). Beim Patienten P29 wurde eine Transversion von Guanin zu Adenin im 3'-UTR-Bereich (c.*239G>A) festgestellt (Abb. 4.10 C).

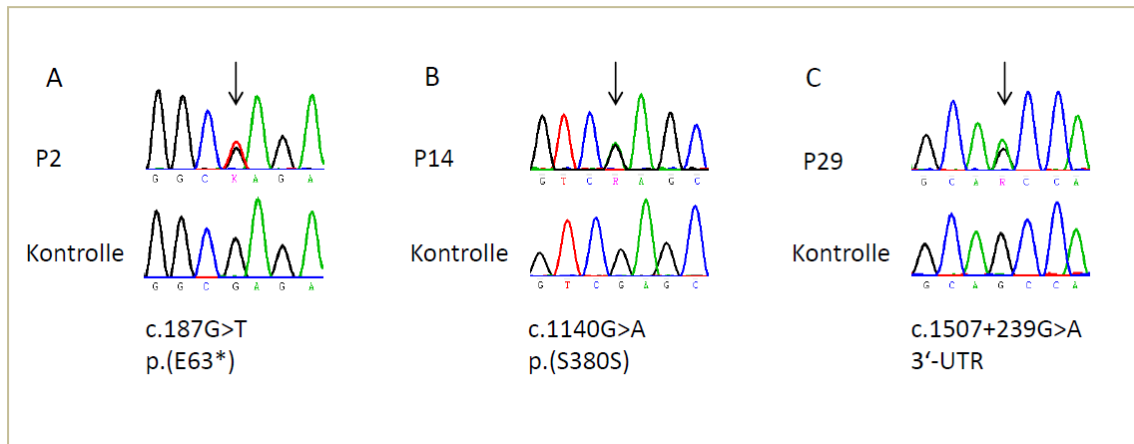


Abb. 4.10: Sequenzchromatogramme der Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp. Dargestellt sind die Punktmutationen im *NFIX*-Gen der Patienten A: P2, Guanin-Thymin-Transversion an Position 187 von Exon 2, B: P14 Guanin-Adenin-Transversion an Position 1140 von Exon 8 und C: P29 Guanin-Adenin-Transversion an Position 239 im 3'-UTR-Bereich von Exon 11; jeweils im Vergleich zu einer gesunden Kontrollperson.

4.2.2 MLPA-Analyse

Bei elf Patienten der Kohorte mit Sotos-Syndrom-ähnlichem Phänotyp wurde die MLPA-Analyse auf exonische Deletionen oder Duplikationen durchgeführt. Diese zeigte bei all diesen Patienten einen Normalbefund. Stellvertretend ist in Abbildung 4.11 der unauffällige MLPA-Dosis-Blot von Patient P5 dargestellt. Bei dem Patienten P2 wurde aufgrund der bereits zuvor nachgewiesenen Mutation im Exon 2 auf eine MLPA-Analyse verzichtet. Die restlichen 23 Patienten, die allesamt zum Kollektiv eines Kooperationspartners aus Dresden gehörten, waren dort vorher mittels Mikroarray voruntersucht, wobei keine Kopienzahlabberationen im Bereich des *NFIX*-Lokus detektiert werden konnte. Aus diesem Grund und wegen der geringen zur Verfügung stehenden DNA-Mengen wurde die MLPA an diesen Proben nicht durchgeführt.

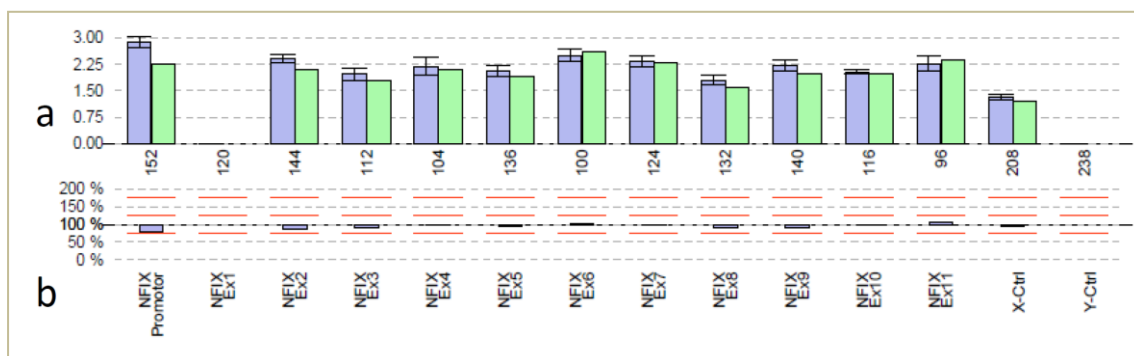


Abb. 4.11: MLPA-Dosis-Blot von Patient 5. Zu sehen ist der *NFIX*-Standard-Ansatz (Probe-Mix 1) mit quantitativer Darstellung der Sondenkopien der 11 Exons des *NFIX*-Gens sowie der Kontrollsonden (Ctrl) auf dem X- und Y-Chromosom; Patient weiblich, Normalbefund.

5. Diskussion

5.1. Marshall-Smith-Syndrom

5.1.1 Der dominant negative Effekt als Ursache des Marshall-Smith-Syndroms

Im Rahmen dieser Dissertation konnten insgesamt vier Frameshift-Mutationen, welche alle in den Exons 8 bis 10 des *NFIX*-Gens lokalisiert waren, sowie in drei Fällen die gleiche Mikrodeletion von Exon 6 bis 7 nachgewiesen werden (Abb.5.1).

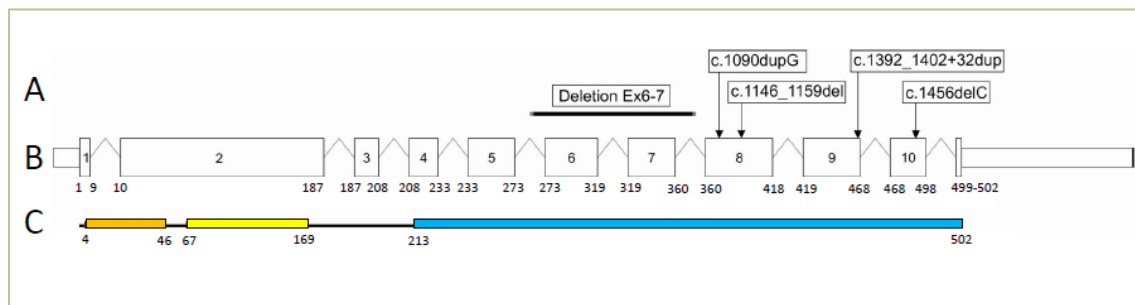


Abb. 5.1: Lokalisation der Mutationen der MSS-Patienten. Dargestellt sind die A: Mutationen der Patienten P39* P40*, P43* (*Deletion Ex6-7), P36, P37, P38 und P46 (v.l.) innerhalb der B: Exon-Intron-Abfolge des *NFIX*-Gens (Exons = Rechtecke, Introns = Linien) sowie C: Darstellung des *NFIX*-Wildtypproteins (oranger Balken: alpha-helikale Domäne, gelber Balken: Ad-Pol-Bindungsdomäne, blauer Balken: CTF/NFI-Domäne).

Im Jahr 2010 gelang es der Arbeitsgruppe Malan et al. erstmals eine genetische Ursache des MSS zu identifizieren. Ähnlichkeiten des Phänotyps von *Nfix*-defizienten Mäusen (*Nfix*^{-/-}) mit dem humanen MSS führten zu der Überlegung, *NFIX* als Kandidatengen für dieses Krankheitsbild in Betracht zu ziehen. Daraufhin wurden mittels DNA-Sequenzanalyse mehrere MSS-Patienten untersucht. Dabei wurden bei sieben Patienten Frameshift- und bei zwei Patienten Splice-Site-Mutationen aufgedeckt. Alle der sieben Frameshift-Mutationen befanden sich im Exon 7 bis Exon 8 und waren *de novo* entstanden. Die zwei Splice-Site-Mutationen waren in der Donor-Splice-Site von Exon 6 lokalisiert und ebenfalls *de novo* entstanden. Sie führten zu einem partiellen Einschluss von Intron 6 und somit zum Frameshift. Somit befanden sich alle Mutationen innerhalb der CTF/NFI-Domäne (vgl. Kapitel 1.3.2). In dieser Arbeit wurde auch durch RT-PCR-Analysen gezeigt, dass beim MSS die mutierten mRNAs dem NMD entgehen im Gegensatz zu einer Nonsense-Mutation in Exon 3, die bei einem Patienten mit dem Sotos-Syndrom-ähnlichen Phänotyp gefunden wurde. Hierfür wurde zum einen RNA aus Fibroblasten vom Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp und Punktmutation in Exon 3 und zum anderen RNA aus Fibroblasten von zwei MSS-Patienten untersucht. Dabei konnte

festgestellt werden, dass in den Fibroblasten des *NFIX*-related-Overgrowth-Patienten ausschließlich die mRNA des Wildtyp-Allels exprimiert wurde, wobei bei den MSS-Patienten neben der normalen auch die mutierte mRNA existierte. Das daraus entstehende Protein steht im Verdacht einen dominant negativen Effekt über das *NFIX*-Gen auszuüben, der zu dem im Vergleich zum *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom schwereren Krankheitsbild des MSS führt (Malan et al., 2010).

Im Jahr 2015 identifizierten Martinez et al. drei weitere MSS-Patienten mit *NFIX*-Mutationen. Dabei handelte es sich wiederum um zwei Frameshift-Mutationen und eine Donor-Splice-Site-Mutation. Die Donor-Splice-Site-Mutation von Intron 6 (c.955+1G>T) wurde bereits zuvor bei zwei Patienten von Malan et al. berichtet (siehe oben). Ein anderer Patient zeigte eine Deletion von 2 Basenpaaren in Exon 7 (c.1074_1075delGCG), welche zu einer Leserasterverschiebung und einem vorzeitigen Stopcodon führte. Insgesamt sind bei allen drei Patienten von Martinez et al. die Mutationen ebenso in der CTF/NFI-Domäne gelegen, was den Schluss nahe legt, dass auch hier ein dominant-negativen Effekt über das *NFIX*-Gen ausgeübt wird. Die meisten Mutationen finden sich zudem im Exon 7, das somit als Mutationshotspot betrachtet werden kann (Martinez et al., 2015).

Auch alle im Rahmen dieser Dissertation identifizierten Mutationen der MSS-Patienten befanden sich in den Exons 8-10, die für die CTF/NFI-Domäne kodieren. Damit sind sie ähnlich zu den Mutationen innerhalb dieser Domäne, für die Malan et al. postulierten, dass die entstehenden Genprodukte dem NMD entgehen und einen dominant negativen Effekt ausüben.

Der NMD ist ein Eliminationssystem, das typischerweise fehlerhafte mRNAs mit frühzeitigen Stopcodons (premature termination codons = PTCs) beseitigt. Dadurch wird die Translation aberranter Transkripte verhindert. Solche fehlerhaften mRNAs entstehen auch unter physiologischen Bedingungen, z.B. durch fehlerhaftes Spleißen. Der NMD hat somit die physiologische Funktion einer „Qualitätssicherung“ der mRNA. Auch bei PTCs aufgrund von Genmutationen im Kontext genetisch bedingter Erkrankungen führt der NMD häufig dazu, dass die mutierte mRNA nicht translatiert sondern rasch degradiert wird. Jedoch ist der NMD, insbesondere bei PTCs im 3'-Bereich von Genen nicht lückenlos. Entgehen mRNAs dem NMD, so kann es zur Bildung von abnormen Proteinen kommen, die schädigende Auswirkung mit sich bringen können, indem sie zu dominant negativen beziehungsweise zu Gain-of-Function-Effekten führen (Khajavi et al., 2006). Bei Gain-of-Function-Effekten entstehen Genprodukte mit gesteigerten oder neuen, abnormen Funktionen, welche häufig zu dominanten Phänotypen führen. Von einem dominant negativen Effekt spricht man, wenn ein Genprodukt nicht nur seine eigentliche Funktion verliert, sondern auch noch zusätzlich die Funktion des Genproduktes des normalen Allels beeinträchtigt. Vor allem bei Proteinen, die als Dimere oder Multimere agieren, treten dominant negative Effekte auf (Siegenthaler et al., 2006). Auch das Genprodukt des *NFIX*-Gens, der Transkriptionfaktor Nuclear Factor I/X, arbeitet als Homo- beziehungsweise Heterodimer (Kruse et al., 1994). Normalerweise entkommen nur mRNAs mit PTCs, die sich im letzten Exon oder im vorletzten innerhalb der letzten 55 Basenpaare befinden

(„~ 55 bp rule“), dem NMD (Khajavi et al., 2006). Dies ist bei den hier nachgewiesenen Mutationen allerdings nur bei der Mutation von Patient P46 der Fall, für die sich folglich durch diese Theorie ein „Escape from NMD“ erklären ließe. Es ist bis heute ungeklärt und Gegenstand weiterer Forschung wie es den mRNAs, die dieser Regel nicht entsprechen, gelingt, dem NMD zu entkommen. Leider war es aufgrund des Mangels an geeignetem Patientenmaterial (RNA-Proben) im Rahmen dieser Dissertation nicht möglich, den experimentellen Nachweis zu führen, dass die mRNAs mit den identifizierten Mutationen dem NMD tatsächlich entgehen. Diese Annahmen basieren vielmehr auf der Analogie zu den bei Malan et al. publizierten Mutationen, für die ein solcher Nachweis geführt wurde (Malan et al., 2010).

Die vorhergesagten abnormen Proteine ungleicher Länge der MSS-Patienten P39, P40, P43, P36, P37, P38 und P46 sind in der Abbildung 5.2 dargestellt. Aus den mutierten mRNAs der Patienten P39, P40, P43 (Abb. 5.2 C) wird ein Protein gebildet, in dem Exon 6 und Exon 7 fehlen. Danach beginnt ein Frameshift, der bei dem spezifischen Protein nach einer gewissen Distanz ein PTC bedingt. Die Genprodukte der Patienten P36, P37, P38 und P46 (Abb. 5.2 D-G) entsprechen bis zur jeweiligen Mutation dem Wildtyp, danach setzt jedoch ein Frameshift ein, der nach unterschiedlicher Länge zu einem PTC führt. Demzufolge trunkieren die MSS-assoziierten Mutationen nicht einfach den C'-terminalen Teil der Genprodukte, sondern führen zu einer großen Vielfalt der Größe und der Aminosäuresequenz der entstehenden mutanten Proteine (Schanze, Neubauer et al., 2014). Diese Variabilität der MSS-assoziierten mutanten Proteine spricht dafür, dass es die Kombination einer intakten DNA-Bindungs- und Dimerisierungs-Domäne mit einer auf unterschiedliche Weise abnormen CTF/NFI-Domäne ist, die den spezifischen Effekt der MSS-assoziierten Mutationen ausmacht. Diese aberranten Proteine haben vermutlich dadurch Eigenschaften, die auch die Funktion des normalen Transkriptionsfaktors Nuclear factor I/X (exprimiert vom intakten Allel) oder gar die Funktion anderer NFIs behindern (dominant-negative Effekte). Eine Möglichkeit einer solchen Behinderung wäre beispielsweise die Konkurrenz um die Bindungsstelle an der DNA, da die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne bei diesen mutanten Proteinen noch vorhanden ist. Weiterhin vorstellbar ist eine nachteilige Auswirkung bei der Bildung eines Mutanten-Wildtyp-Heterodimers auf die Funktion des ganzen Komplexes (Schanze, Neubauer et al., 2014). Zur Aufdeckung des genauen Effekts dieser mutierten Proteine werden weitere Forschungen notwendig sein. Beachtenswerterweise ist der Phänotyp der Patienten trotz der Verschiedenheit der mutierten Proteine sehr übereinstimmend ohne erkennbare Korrelation zwischen Phänotyp und spezifischen Alterationen des C-terminalen Anteils. Nur Patient 38 zeigte eine merklich mildere Ausprägung des Phänotyps im Vergleich zu den anderen MSS-Patienten in unserer Kohorte. Bei der Mutation dieses Patienten entstand eine ektopische Donor-Splice-Site von Exon 9, welche jedoch möglicherweise die ursprüngliche Donor-Splice-Site nicht komplett außer Funktion setzt. Die Produktion einer normal gespleißten mRNA vom mutierten Allel könnte die Krankheitsausprägung abzumildern durch Änderung des stöchiometrischen Verhältnisses zwischen mutiertem und Wildtyp-Genprodukt

zugunsten des letzteren. Folglich könnten auch spezifische *NFIX*-Mutationen existieren, die die Lücke zwischen dem klassischen MSS und dem Sotos Syndrom-ähnlichen Phänotyp, der durch *NFIX*-Haploinsuffizienz entsteht, zu schließen vermögen (Schanze, Neubauer et al., 2014).

Das hypothetische, deutlich verkürzte mutante Protein des *NFIX*-related-Overgrowth-Patienten P2 (Abb. 5.2 H) mit der Nonsense-Mutation (c.187G>T, p.(E63*)) ist höchstwahrscheinlich nicht existent, da die mRNA vermutlich vom NMD eliminiert wird. Leider war die experimentelle Bestätigung einer Degradation der mutierten mRNA durch NMD auch bei diesem Patienten mangels einer RNA-Probe nicht möglich.

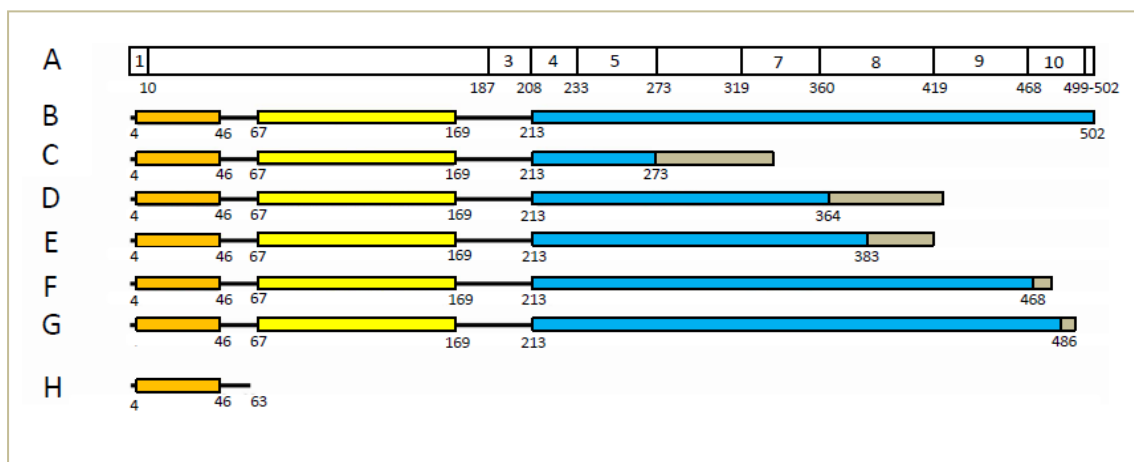


Abb. 5.2: Mutierte *NFIX*-Transkripte. Gezeigt sind A: die Exon-Abfolge des *NFIX*-Gens sowie die jeweilige Aminosäureanzahl, B: das Wildtypprotein sowie die mutierten Proteine der Patienten C: P39, P40, P43; D: P36, E: P37, F: P38, G: P46 und H: P2 (oranjer Balken: N-terminale alpha-helikale DNA-Bindungsdomäne, gelber Balken: Ad-Pol-Bindungsdomäne, blauer Balken: C-terminale Transaktivierungs- und Repressionsdomäne CTF/NFI, grauer Balken: variable Aminosäuresequenzen, die sich vom Wildtypallel unterscheiden).

Während die in dieser Arbeit entdeckten Frameshift-Mutationen alle noch nicht beschrieben waren, und bisher überhaupt nur zwei Punktmutationen (c.955+1G>A und c.955+1G>T) bei MSS je zweimal beobachtet wurden (Malan et al., 2010; Martinez et al., 2015; Schanze, Neubauer et al., 2014), handelt es sich bei der nachgewiesenen Mikrodeletion von Exon 6 bis 7 um ein offenbar rekurrentes Ereignis. Gleich drei Fälle mit dieser Deletion wurden in im Rahmen dieser Dissertation indentifiziert; nachfolgend wurden im Labor des Instituts für Humangenetik am Universitätsklinikum Magdeburg noch 2 weitere Fälle nachgewiesen, die gemeinsam mit den Fällen aus dieser Dissertation publiziert wurden (Schanze, Neubauer et al., 2014). Für solche rekurrenten Deletionen mit gleichen Deletionsintervallen besteht häufig eine strukturelle Prädisposition aufgrund der spezifischen genomischen Architektur. Dies konnte die im Anschluss durchgeführte molekulare Bruchpunktanalyse, die nicht mehr Bestandteil dieser Dissertation war, tatsächlich zeigen. Die Bruchpunkte (Abb 5.3) befanden sich in Intron 5 und 7 innerhalb sogenannter Alu-Y-Repeats

(Schanze, Neubauer et al., 2014). Solche repetitiven DNA-Sequenzen können die Entstehung von Deletionen oder Duplikationen durch nicht allelische homologe Rekombination (NAHR) begünstigen (Shaw et al., 2005).

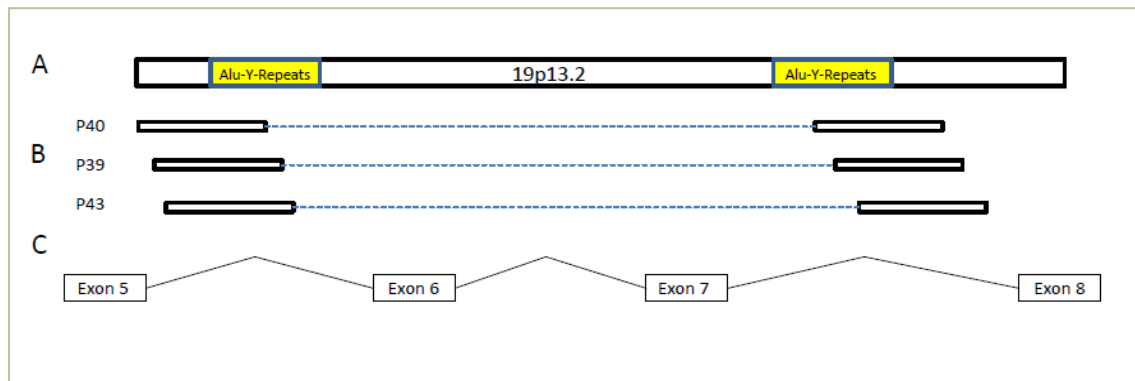


Abb. 5.3: Lokalisation der Alu-Y-Repeats. Veranschaulicht sind A: ein Ausschnitt der Chromosomenbande 19p13.2 mit Alu-Y-Repeat-Regionen, B: Deletionen der Patienten P40, P39 und P43 (weiße Balken: mRNA vor und nach dem Bruchpunkt, blau gestrichelte Linie: deletierte Region des Gens, Übergang weißer Balken/gestrichelte Linie entspricht Bruchpunkt) und C: die Exon-Intron-Abfolge des *NFIX*-Gens (Exons = Rechtecke, Introns = Linien, Abb. nicht maßstäblich). Die Deletions-Bruchpunkte bei den Patienten P40, P39 und P43 lagen alle innerhalb dieser Alu-Y-Repeats und unterschieden sich nur um wenige Basen.

Alu-Elemente gehören zu den kurzen, eingestreuten Kernsequenzelementen (SINEs = short interspersed nuclear elements), welche repetitiv und relativ frei verteilt im menschlichen Genom vorkommen. Sie sind ungefähr 300 bp lang und befinden sich in Introns, 3'-UTR-Bereichen von Genen und intergenischen Regionen. Die Alu-Repeats sind mit circa einer Millionen Kopien als häufigste Art der SINEs bekannt. Der hohe GC-Gehalt (62,7%) sowie die bemerkenswert hohe Sequenzübereinstimmung (70 – 100%) zwischen den Alu-Unterfamilien kann die Rekombination zwischen Alu-Repeats begünstigen. Diese wird als nicht allelische homologe Rekombination, kurz NAHR, bezeichnet und kann wiederum zu Deletionen und Duplikationen führen (Batzer et al., 2002; Zhang et al., 2009). Etwa 0,3 % aller menschlichen genetischen Erkrankungen gehen auf diesen Mechanismus zurück (Deininger et al., 1999), hier vor allem monogenetische Erkrankungen wie das Lynch-Syndrom (Li et al., 2006), hereditärer Brust- und Ovarialkrebs (Mazoyer et al., 2005), von Hippel-Lindau-Krankheit (Franke et al., 2009), hereditäre, spastische Paraplegie (Boone et al., 2011) und viele andere. Entgegen der Beobachtung von Malan et al., dass alle Mutationen der Marshall-Smith-Patienten auf Frameshift- und Splice-Site-Mutationen beruhen, konnte im Rahmen dieser Dissertation durch die MLPA erstmals ein neuer Mutationsmechanismus aufgedeckt werden, da dieses Verfahren fähig ist, im Gegensatz zur Sequenzierung, Kopienzahländerungen einzelner Exons aufzuzeigen. Die rekurrente Deletion konnte auch in durch NFIX-Sequenzierung voruntersuchten

Patienten aus der Malan-Kohorte gefunden werden. Getriggert durch „bruchsensible“ Stellen, den Alu-Y-Repeats, entstand die rekurrente Deletion von Exon 6 und 7 bei drei der insgesamt elf Marshall-Smith-Patienten. In den dieser Dissertation nachfolgenden Untersuchungen konnten zudem zwei weitere Deletionen von Exon 6 und 7 sowie zwei Deletionen von Exon 6 identifiziert werden, die dann zusammen mit den Ergebnissen dieser Dissertation publiziert wurden (Schanze, Neubauer et al., 2014). Somit entspricht der Anteil der Patientengruppe mit exonischen Deletionen an der Gesamtheit der *NFIX*-positiven MSS-Patienten (eigene und Kohorten anderer Gruppen) insgesamt annähernd einem Viertel (Schanze, Neubauer et al., 2014). Ein zuvor ungeklärter, aber signifikanter Anteil der MSS-Fälle, bei denen die Sequenzierung keine Veränderung im *NFIX*-Gen zeigte, konnte somit durch das Deletionsscreening mittels MLPA nun gelöst werden. Daraus ergibt sich zudem eine neue Möglichkeit bei der Diagnostik des MSS.

5.1.2 Die Homogenität des Marshall-Smith-Syndroms

Das MSS stellt ein klinisch relativ homogenes genetisches Syndrom dar und ist, wie die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, auch genetisch homogen. Einzig und allein das Gen für den Transkriptionsfaktor Nuclear Factor I/X (*NFIX*) konnte bisher als kausales Gen für diese Entität identifiziert werden. Die in den vorhergehenden Arbeiten von Malan et al. und Martinez et al. sowie der eigenen Publikation beschriebenen Fälle umfassen achtzehn Patienten mit Frameshift-Mutationen in den Exons 7 bis 10, vier Patienten mit Splice-Site-Mutationen im Exon 6, fünf heterozygote Deletionen von Exon 6 und 7 sowie zwei heterozygote Deletionen von Exon 6 (Malan et al., 2010; Schanze, Neubauer et al., 2014; Martinez et al., 2015). Im Kollektiv dieser Dissertation, welches den größeren Teil der Patienten in der Publikation Schanze und Neubauer et al. umfasst, wurden vier Patienten mit Frameshift-Mutationen in den Exons 8 bis 10 und drei rekurrente Deletionen von Exon 6 und 7 aufgezeigt. Insgesamt konnten somit einschließlich der vorliegenden Studie weltweit 29 MSS-Patienten positiv auf Mutationen im *NFIX*-Gen getestet werden. Davon konnten zusammenfassend 18 kleinere Insertionen/Deletionen (62%), vier Splice-Site-Mutationen (14%) und sieben größere exonische Deletionen (24%) nachgewiesen werden. Die bisher identifizierten *NFIX*-Mutationen bei MSS-Patienten sind in der Abb. 5.4 dargestellt.

Allerdings konnten von vier Patienten im Rahmen dieser Arbeit, die in der Sequenzierung einen negativen Befund zeigten, drei aufgrund unzureichender DNA-Qualität in der MLPA nicht ausgewertet werden (P41, P44, P45) und ein Patient (P42) zeigte einen negativen MLPA-Befund. Gründe für das Fehlen einer mittels MLPA oder Sequenzierung detektierbaren Veränderung im *NFIX*-Gen bei Patient 42 könnten zum einen eine nicht eindeutige klinische Zuordnung des Patienten zum MSS und zum anderen eine intronische Mutation sein, die mit diesen Methoden unentdeckt geblieben wäre. Es ist auch nicht völlig auszuschließen, dass noch ein weiteres Gen für das MSS

ursächlich sein könnte. Dies herauszufinden bedarf weitergehender Untersuchungen an Patienten mit eindeutigem MSS-Phänotyp, bei denen eine NFIX-Mutation mit allen zur Verfügung stehenden Mitteln ausgeschlossen wurde.

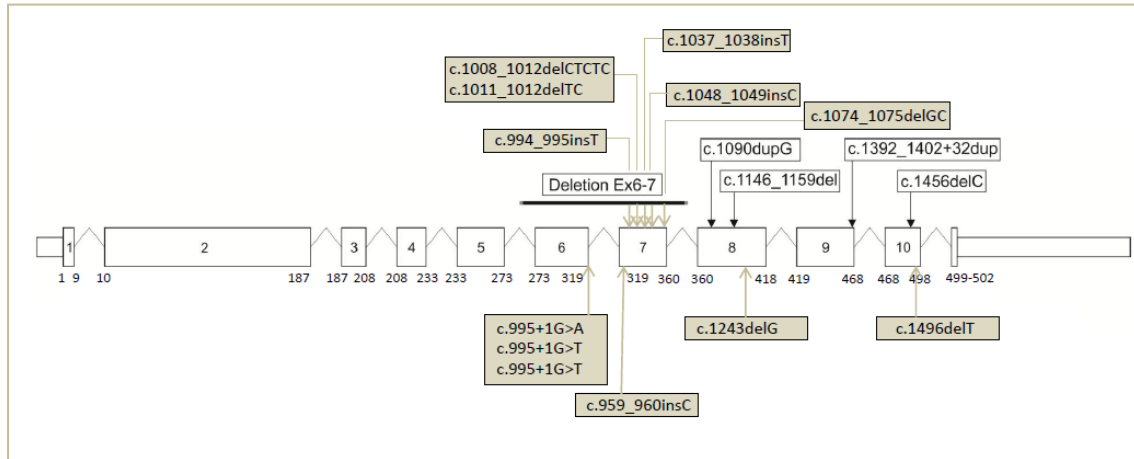


Abb. 5.4: Bisher identifizierte NFIX-Mutationen bei MSS-Patienten. Die weißen Kästen veranschaulichen Mutationen des eigenen Kollektivs, die grauen Kästen zeigen Mutationen des Kollektivs von Malan et al. und Martinez et al.

5.2. NFIX-related-Overgrowth-Syndrom

5.2.1 Die Haploinsuffizienz von NFIX als Ursache des NFIX-related-Overgrowth-Syndroms

In der untersuchten Kohorte von 35 Patienten mit Sotos-like Phänotyp ließ sich nur eine kausale Mutation für den Patienten P2 nachweisen, die im Exon 2 des NFIX-Gens (c.187G>T, p.(E63*)) lokalisiert ist (Abb.5.5). Diese Veränderung ist weder krankheitsverursachende Mutation noch als Polymorphismus bisher beschrieben. Die Art der Veränderung (Nonsense-Mutation) und ihre Lage passen zu den bisher beschriebenen Mutationen bei NFIX-related-Overgrowth-Syndrom und der Annahme einer Haploinsuffizienz von NFIX als pathogenetische Grundlage {Malan 2010 #43}. Die NFIX-Variante im Exon 8 beim Patienten P14 (c.1140G>A, p.(S380S)) führt dagegen nicht zum Aminosäureaustausch. Sie tritt mit einer globalen Frequenz von 0,002% auf (<http://exac.broadinstitute.org/>, Zugriff 14.01.2016). Außerdem wurde diese Variante durch zwei verschiedene Spleiß-Vorhersage-Programme (<http://www.fruitfly.org/>, Zugriff 26.09.2012; <http://www.cbs.dtu.dk/>, Zugriff 26.09.2012) auf neu entstandene Spleiß-Akzeptor- und Spleiß-Donorstellen getestet, da diese Form der Mutation trotz gleicher Aminosäureabfolge zu einer Veränderung im Spleißen und somit zu einer veränderten mRNA führen könnte. Dabei konnte kein Hinweis auf Auswirkungen auf das Spleißen der RNA gefunden werden. Somit handelt es sich bei

dieser Variante nicht um die als kausal zu betrachtende Genveränderung für den Sotos Syndrom-ähnlichen Phänotyp dieses Patienten. Bei der beim Patienten P29 detektierten Punktmutation im 3'-UTR-Bereich von Exon 11 (c.*239G>A) handelt es sich ebenfalls mit hoher Wahrscheinlichkeit nicht um die krankheitsauslösende Mutation, da sie sich relativ weit entfernt vom codierenden Bereich befindet. Es ist allerdings nicht restlos auszuschließen, dass sich in der hier betroffenen Region eine Bindungsstelle für Transkriptionsfaktoren oder miRNAs (microRNAs = nicht kodierende RNAs mit einer Größe von 20 – 24 Nukleotiden) befindet. Beides könnte zu einer Modifizierung der Genregulation des *NFIX*-Gens führen. Leider sind zurzeit noch keine zuverlässigen Prädiktionsprogramme für die Vorhersage von Auswirkungen auf die transkriptionelle Regulation verfügbar, sodass diese Frage letztlich offen bleibt. Elterliche DNAs für den Nachweis ob es sich um vererbte oder neu entstandene Varianten handelte, standen leider nicht zur Verfügung. Alle weiteren Patienten zeigten unauffällige Befunde.

Malan et al. konnten erstmals durch die Array-CGH bei zwei von 18 Patienten mit Sotos-ähnlichem Erscheinungsbild kleine Deletionen nachweisen, die das *NFIX*-Gen einschlossen, und durch die nachfolgende DNA-Sequenzanalyse bei 76 Patienten mit syndromalem Großwuchs in einem Fall eine Nonsense-Mutation im *NFIX*-Gen nachweisen. Bei den Deletionen handelte es sich um *de novo* entstandene Monosomien in der Region 19p13.2, die das *NFIX*-Gen als einzige bekannte Erbanlage einschlossen. Die Nonsense-Mutation wurde im Exon 3 (c.568C>T, p.(Q190*)) detektiert. Für alle drei Varianten wurde der Funktionsverlust einer Kopie des *NFIX*-Gens und somit Haploinsuffizienz als pathogenetischer Mechanismus angenommen. Für die Nonsense-Mutation wurde gezeigt, dass die mutierte *NFIX*-mRNA kaum nachweisbar ist, weil sie offenbar dem NMD unterliegt. In dieser Arbeit wird daher diskutiert, dass – im Gegensatz zu dominant-negativ wirkenden Mutationen beim MSS - eine Haploinsuffizienz von *NFIX* zu einem dem Sotos-Syndrom-ähnlichen Krankheitsbild führt (Malan et al., 2010).

Ebenfalls im Jahr 2010 erschien ein Artikel von Dolan et al., die ein 19p13.13 Mikrodeletions/Mikroduplikationssyndrom beschrieben. Hier detektierte man bei vier Patienten mit ähnlichem Phänotyp verschiedene Mikrodeletionen auf Chromosom 19p13.13. Dieser Phänotyp hob sich vor allem durch mentale Retardierung, Großwuchs, Makrozephalie sowie ophthalmologische und intestinale Manifestationen hervor. Die ersten drei Merkmale finden sich auch beim Sotos-Syndrom. Bei zwei Patienten war auch das Sotos-Syndrom vermutet worden, weshalb zunächst das *NSDI*-Gen untersucht wurde. Es konnten allerdings keine Mutationen in diesem Gen detektiert werden. Im Gegensatz zu den Deletionspatienten stellte der Phänotyp eines Patienten mit einer Duplikation in diesem Bereich deutlich unterschiedlich dar mit mentaler Retardierung, Kleinwuchs und Mikrozephalie. In der kleinsten gemeinsamen Region der Überlappung der Deletionen beziehungsweise der Duplikation (SRO = smallest region of overlap), die sich über rund 311 Kb erstreckte, befanden sich 16 Gene. Unter diesen Genen befand sich auch das *NFIX*-Gen. *NFIX* wurde

neben dem *MAST1*-Gen von den Autoren als Kandidatengen für wesentliche Teile des Phänotyps vorgeschlagen, da es eine wichtige Rolle in der Hirnentwicklung spielt (Dolan et al., 2010). Diese Beobachtungen passen zu der Annahme, dass die Haploinsuffizienz des *NFIX*-Gens zu einem Sotos-Syndrom-ähnlichen Phänotyp führt.

Außerdem veröffentlichten Bonaglia et al. 2010 den Fall eines Patienten mit 19p13.12 – p13.13-Mikrodeletion, die die Gene für *NFIX* und *CACNA1A* umfasste. Dieser war zwar nicht durch Großwuchs auffällig, zeigte jedoch einige Merkmale des Sotos Syndrom-ähnlichen Phänotyps und MSS wie moderat bis schwere mentale Retardierung, eine ausgeprägte sprachliche und motorische Entwicklungsstörung, Skoliose, Pectus excavatum, Hypotonie, Hyperaktivität sowie ähnliche faziale Anomalien wie hohe Stirn, antevertierte Nasenlöcher, langes Philtrum und irregulär angeordnete Zähne. Weiterhin fielen Krampfanfälle auf, für die ein Einfluss der gleichzeitigen Haploinsuffizienz von *CACNA1A* diskutiert wurde (Bonaglia et al., 2010). Das *CACNA1A*-Gen (MIM 601011) kodiert für eine Untereinheit eines spannungsabhängigen Kalziumionenkanals und befindet sich in der Nähe des *NFIX*-Gens. Haploinsuffizienz von *CACNA1A* durch Deletionen oder eine trunkierende Mutationen bedingt das Krankheitsbild der episodischen Ataxie Typ 2 (EA2, MIM 108500) oder bei Missense-Mutation die familiäre hemiplegische Migräne Typ 1 (FHM1, MIM 141500) (Klaassens et al., 2015). Außerdem wurde das Gen in Zusammenhang gebracht mit Epilepsie und Entwicklungsstörungen (Auvin et al., 2009).

Zwei Jahre später gelang es Yoneda et al. zwei heterozygote Missense-Mutationen im *NFIX*-Gen zu identifizieren. Ihre untersuchte Kohorte bestand aus 48 Patienten, bei denen das Sotos-Syndrom vermutet wurde. Allerdings wiesen diese Patienten keine Mutationen im *NSDI*-Gen auf. Die beiden detektierten Missense-Mutationen befanden sich jeweils im Exon 2 des *NFIX*-Gens. Bei einer handelte es sich um eine Transition von Thymin zu Cytosin (c.179T>C, p.(L60P)) und bei der anderen um eine Transversion von Guanin zu Cytosin (c.362G>C, p.(R121P)). Für beide Mutationen wurde ein Verlust der DNA-Bindungseigenschaften angenommen und damit eine funktionelle Auswirkung vergleichbar mit den Deletionen und Nonsense-Mutationen, die zur Haploinsuffizienz führen. Bemerkenswert ist, dass die letztere Mutation auch bei der fraglich betroffenen Mutter des Patienten nachgewiesen werden konnte (Yoneda et al., 2012).

Ebenfalls im Jahr 2012 beschrieben Priolo et al. einen weiteren Fall einer *NFIX*-Mutation bei einem Patienten mit Sotos-ähnlichem Erscheinungsbild. Hier handelte es sich um eine 21 Nukleotide umfassende In-Frame-Deletion im Exon 2 (c.157_177delGAGCGGGCGGTGAAGGACGAG), die zum Verlust von sieben evolutionär hoch konservierten Aminosäuren in der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne führte. Auch für diese Mutation wurde ein Funktionsverlust des mutierten *NFIX*-Proteins angenommen (Priolo et al., 2012).

Wiederum zwei Jahre später beschrieben Klaassens et al. sechs weitere Patienten, von denen vier Mikrodeletionen im Bereich von Chromosom 19p13.2, ein weiterer eine Frameshift-Mutation im Exon 2 (c.90_99del) sowie einer eine Nonsense-Mutation in Exon 7 des *NFIX*-Gens (c.1012C>T; p.(Q338*)) zeigten. Die letztere Mutation liegt in einem Abschnitt des Gens, wo auch Mutationen beim Marshall-Smith-Syndrom (CTF/NFI-Domäne) angesiedelt sind, für die ein dominant-negativer Effekt vermutet wird. Aufgrund des Phänotyps des Patienten wurde von den Autoren dennoch ein Loss-of-function-Effekt (Haploinsuffizienz) für diese Nonsense-Mutation postuliert. Eine Untersuchung hinsichtlich NMD konnte nicht durchgeführt werden (Klaassens et al., 2015). Diese Beobachtung zeigt, dass nicht alleine die Position der Mutationen entscheidend ist für die phänotypische Expression (MMS versus Malan-Syndrom).

Weiterhin schlossen die Autoren insgesamt neun vorher publizierte Patienten mit 19p13.13 Mikrodeletionen (Dolan et al., 2010; Auvin et al., 2009; Nimmakayalu et al., 2013) bzw. Mikrodeletionen von 19p13.2 – 19p13.13 (Lysy et al., 2009) in die Diskussion des *NFIX*-related-„Sotos-like“-Syndroms ein.

Im Jahr 2014 berichteten Natiq et al. über eine Patientin mit einer Mikrodeletion 19p13.2 – 19p13.12 mit Großwuchs und schwerer mentaler Retardierung. Erwähnenswert sind die Konsanguinität 1. Grades der Eltern, sowie das höhere Alter bei der Geburt (Mutter 44 Jahre, Vater 55 Jahre). Des Weiteren wurde die Mutter wegen chronisch-myeloischer Leukämie mit Imatinib 400 mg/d behandelt. Die ursprünglich mit Verdacht auf Angelman-Syndrom der genetischen Untersuchung zugeführte Patientin war bei Geburt mikrosom und mikrozephal. Weiterhin zeigten sich Hypotonie, eine markante Stirn, nach unten gerichtete Augenlider, nach vorn gerichtete Nasenlöcher, Mikrostomie, ein langes Philtrum, Prognathie, unten ansetzende Ohren, kurzer Hals und beidseitige Klinodaktylie des 5. Fingers. Im Alter von 2 Jahren und 3 Monaten konnte sie weder sprechen noch den Kopf halten oder sitzen. Außerdem war eine akzelerierte Knochenreife nachweisbar, und es bestanden Krampfanfälle seit Geburt. Die Mikrodeletion schloss das *CACNA1A*-Gen mit ein, welches möglicherweise für die Krampfanfälle verantwortlich zu machen ist (Natiq et al., 2014).

Erst kürzlich wurden drei weitere Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp und *NFIX*-Mutationen publiziert. Hierbei handelte es sich um zwei Missense-Mutationen (c.347G>C, p.R116P) (c.373A>G, p.K125E) und eine Frameshift-Mutation (c.191delA) mit einem vorzeitigen Stopp-Codon nach 30 Aminosäuren (p.K64Sfs*30), welche jeweils im Exon 2 lokalisiert waren. Verschiedene Prädiktionsprogramme sagten in Bezug auf die Missense-Mutationen einen schädigenden Effekt auf das Protein voraus, da die betroffenen Aminosäuren evolutionär hoch konserviert sind. Auch hier führen die genannten Mutationen folglich zur Haploinsuffizienz des *NFIX*-Gens (Gurrieri et al., 2015).

Außerdem wurde ebenfalls kürzlich über drei weitere Patientinnen mit 19p13.2-Mikrodeletionen und Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp berichtet. Erwähnenswert ist hier, dass zwei der Patientinnen unter einer Chiari-Malformation Typ 1 litten. Dies kam bereits bei einem Patienten im Kollektiv von Dolan et al. vor, wodurch diese Anomalie in einen Anteil von 15,8 % der bisher beschriebenen Patienten mit einer Mikrodeletion vorkommt. Diese Fehlbildung ist bisher noch nie bei Sotos-Patienten mit *NSDI*-Mutation nachgewiesen worden und könnte einen Beitrag zur weiteren Differenzierung zwischen klassischem Sotos-Syndrom und *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom leisten. Allerdings wurde diskutiert, dass die Chiari-Malformation Typ 1 ein heterogenes Krankheitsbild darstellt und neben dem in der Deletion eingeschlossenen *NFIX*-Gen auch das *MAST1*-Gens eine Rolle bei der Entstehung spielen könnte, da es für eine Mikrotubuli-assoziierte Serin-Threoninkinase kodiert, die vorwiegend im Gehirn exprimiert wird. Alle drei Probanden besaßen ebenfalls eine Deletion des *CACNA1A*-Gens, wobei bei zwei Patienten epileptische Anfälle verzeichnet wurden. Bei einem Patienten handelte es sich jedoch um Fieberkrämpfe. Weiterhin konnte bei einer Betroffenen gezeigt werden, dass das mutierte Gen eine Neumutation auf dem paternalen Allel war (Shimajima et al., 2015).

Gleichfalls berichteten Martinez et al. 2015 über zwei Patienten mit Sotos-ähnlichen Merkmalen und Missense-Mutationen im Exon 2 des *NFIX*-Gens (c.136C>T, p.(R46C); c.185G>C, p.(R62P)). Beide Mutationen betrafen wiederum hoch konservierte Aminosäuren. Die Autoren postulierten, dass diese zum Funktionsverlust führen. Erwähnenswert bei diesen Fällen ist außerdem, dass sie einen marfanoiden Habitus mit einer großen, schlanken Erscheinung, leichter Hyperlaxizität der Gelenke und Arachnodaktylie aufwiesen. Die Autoren konstatierten, dass auch Patienten in früheren Publikationen (Patient A – C von (Malan et al., 2010)) marfanoide Merkmale zeigten, und postulierten, dass sich eine marfanoide Erscheinung erst mit höheren Alter der Patienten herausbilden könnte (Martinez et al., 2015).

Alle oben genannten Mutationen waren *de novo* entstanden (Malan et al., 2010; Priolo et al., 2012; Dolan et al., 2010; Auvin et al., 2009; Lysy et al., 2009; Klaassens et al., 2015; Natiq et al., 2014; Gurrieri et al., 2015), bis auf einen Patienten, dessen Mutation von der fraglich betroffenen Mutter vererbt wurde, welche von großer Statur war (weitere klinische Daten waren in dieser Studie nicht verfügbar) (Yoneda et al., 2012) und zwei betroffenen Schwestern, bei deren Eltern ein Vererbung über ein Keimzellmosaik vermutet wurde (Nimmakayalu et al., 2013).

Insgesamt zeigten außerdem acht von den 15 berichteten Patienten mit kombinierter Deletion von *NFIX* und *CACNA1A* aufgrund einer Mikrodeletion Epilepsien und zwei Fieberkrämpfe (Auvin et al., 2009; Dolan et al., 2010; Lysy et al., 2009; Nimmakayalu et al., 2013; Klaassens et al., 2015; Bonaglia et al., 2010; Natiq et al., 2014).

Aus den oben genannten Beobachtungen ist ersichtlich, dass die Mehrheit der bis dato nachgewiesenen Mutationen bei Patienten mit Sotos-ähnlichem Krankheitsbild, welches bisher in der Literatur auch als Sotos-like-Syndrom, Sotos Syndrom 2 oder Malan-Syndrom bezeichnet wurde, im Exon 2 und Exon 3 lokalisiert waren oder auf Deletionen des gesamten Gens beruhten. Die beiden Exons 2 und 3 kodieren für die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (siehe Kapitel 1.3). Ist diese Domäne nicht mehr funktionsfähig, kann das gesamte Protein, selbst wenn die die mutanten Proteine gebildet werden, nicht mehr an die DNA binden. Somit kommt es zum Funktionsverlust und zur Haploinsuffizienz, die nach der Hypothese von Malan et al. zum Sotos Syndrom-ähnlichen Phänotyp führt (Malan et al., 2010; Yoneda et al., 2012; Priolo et al., 2012). Die Haploinsuffizienz ist definiert als dominanter Phänotyp bei diploiden Organismen, die heterozygot für ein Loss-of-Function-Allel sind. Hier führt also der Verlust einer Genkopie zu einer Reduktion der Konzentration funktionsfähigen Genprodukts und damit zu einem abnormen Phänotyp. Beim Menschen wurden haploinsuffiziente Mutationen vor allem bei Transkriptionsfaktoren beobachtet (Deutschbauer et al., 2005). Dass passt zu der Tatsache, dass auch das *NFIX*-Gen für einen Transkriptionsfaktor kodiert.

Die im Rahmen dieser Dissertation dokumentierte Mutation ist eine Nonsense-Mutation im Exon 2. Die Mutation lag genau wie die Mehrzahl der bereits publizierten mit *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom assoziierten Punktmutationen in der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (Abb.5.5). Dadurch wäre ein möglicherweise entstehendes „trunkiertes“ Protein nicht im Stande an die DNA zu binden. Höchstwahrscheinlich kann es aber gar nicht erst zur Entstehung des Proteins kommen, da die Mutation sehr nahe am 5'-Ende lokalisiert war und vermutlich durch das NMD eliminiert werden würde. Leider stand eine RNA-Probe des Patienten nicht zur Verfügung, um dies experimentell nachzuweisen. Insgesamt kann man auch hier sehr wahrscheinlich von einer Haploinsuffizienz des Gens ausgehen, welche den Sotos Syndrom-ähnlichen Phänotyp unseres Patienten erklären würde. Diese Tatsache bestätigt somit die gängige Hypothese.

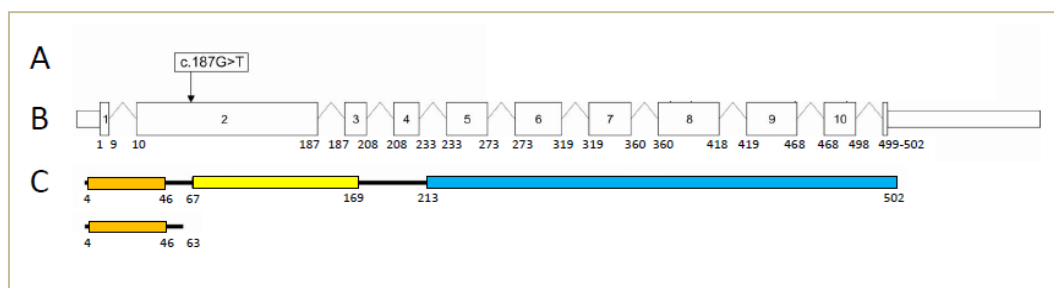


Abb. 5.5: Lokalisation der *NFIX*-Mutation von Patient 2. Veranschaulicht ist A: die Mutation auf c-DNA-Ebene; B: Lage der Mutation innerhalb der Exon-Intron-Abfolge (Exons = Rechtecke, Introns = Linien) sowie C: Darstellung des Wildtypproteins (oben) und des fiktiven mutierten Proteins von P2 (unten); (oranger Balken: N-terminale alpha-helikale DNA-Bindungsdomäne, gelber Balken: Ad-Pol-Bindungsdomäne, blauer Balken: C-terminale Transaktivierungs- und Repressionsdomäne CTF/NFI)

5.2.2 Die Heterogenität des „Sotos-like“-Phänotyps

Im Rahmen dieser Dissertation ließ sich lediglich einer von 35 Fällen mit Sotos Syndrom-ähnlichen Phänotyp durch eine *NFIX*-Mutation erklären. Zwei weitere *NFIX*-Varianten in der Kohorte stuften wir als sehr wahrscheinlich nicht pathogen ein. Auch in den bereits publizierten Studien konnte nur für einen geringen Teil der Patienten mit Sotos-Syndrom-ähnlichen Merkmalen eine Veränderung im *NFIX*-Gen nachgewiesen werden. Bei Malan et al. waren es zwei von Patienten mit 18 Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp mit einer Deletion ($\approx 11,1\%$) und einer von 76 Patienten mit syndromalem Großwuchs mit einer Punktmutation ($\approx 1,3\%$) (Malan et al., 2010). Der Arbeit von Yoneda et al. standen 48 Patienten zur Verfügung von denen lediglich zwei eine Missense-Mutation aufwiesen ($\approx 4,2\%$) (Yoneda et al., 2012). In den weiteren Veröffentlichungen wurden nur ausgesuchte Patienten berichtet (Priolo et al., 2012; Dolan et al., 2010; Klaassens et al., 2015; Gurrieri et al., 2015; Auvin et al., 2009; Nimmakayalu et al., 2013; Lysy et al., 2009; Natiq et al., 2014; Shimojima et al., 2015; Martinez et al., 2015), wodurch sich in diesen Fällen leider keine Aussage über die Häufigkeit des Auftretens einer *NFIX*-Mutation bei Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp treffen lässt.

Neben *NSDI*-Mutationen, welche die genetische Hauptursache für das Sotos-Syndrom darstellen, wurde eine Reihe von Mutationen in weiteren Genen als Auslöser für einen Sotos-ähnlichen Phänotyp beschrieben. Hier ist eine Familie mit fünf Mitgliedern, die Sotos-ähnliche Merkmale zeigten, mit einer 1.9 Mb umfassenden Duplikation auf Chromosom 19p13.2, welche das *NFIX*-Gen nicht einschloss, zu nennen (Lehman et al., 2012). Des Weiteren wurde ein Patient mit einer Mutation im *STK11*-Gen (Chromosom 19) beschrieben (Baynam et al., 2011), die von dessen Mutter mit Peutz-Jeghers-Syndrom vererbt wurde, sowie ein anderer Patient mit einer *de novo* entstandenen Hypomethylierung der *KvDMR1*-Region des *KCNQ1OT1*-Gens auf Chromosom 11 (Mayo et al., 2012).

Die Ähnlichkeiten zwischen *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom und Sotos-Syndrom könnten an einer bisher nicht nachgewiesenen Verknüpfung der Funktion von *NFIX*- und *NSDI*-Genprodukten liegen. Bisher konnte diesbezüglich jedoch noch kein Zusammenhang hergestellt werden (Shimojima et al., 2015) und weitere Forschungen bleiben in dieser Hinsicht abzuwarten. Andererseits sind die Merkmale Großwuchs, Makrozephalie und Entwicklungsretardierung auch wenig spezifisch, was die beobachtete Heterogenität und den großen Teil ungelöster Fälle mit diesen Merkmalen erklären könnte.

5.2.3 Das *NFIX*-related-„Sotos-like-Syndrom“ und das Marshall-Smith-Syndrom als kontinuierliches Spektrum eines Krankheitsbildes mit variierendem Schweregrad

Die kritische Analyse der eigenen und bisher veröffentlichten Fälle von MSS und *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom legt nahe, dass es sich nicht um völlig unterschiedliche Erkrankungen handelt. Patienten mit dem auch als „Sotos-Syndrom 2“ bezeichneten *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom weisen außerdem einige Unterschiede zum „klassischen“ durch *NSD1*-Mutationen bedingten Sotos-Syndrom auf. Vielmehr lassen die kraniofazialen Anomalien der Patienten mit „Sotos 2“ in abgeschwächter Form Ähnlichkeiten mit dem MSS erkennen. Die beschleunigte Knochenreifung führt zu einer normalen bis erhöhten Körpergröße in den ersten Lebensjahren. Der Großwuchs ist dabei weniger stark ausgeprägt wie beim klassischen Sotos-Syndrom (Klaassens et al., 2015). Ähnliche Veränderungen der Skelettreifung sind typisch für das MSS, nur dort noch stärker ausgeprägt mit rascherem Abfallen der Wachstumskurve unter den Normbereich. Eine mentale Retardierung ist bei beiden Syndromen obligat, beim MSS jedoch meist noch stärker ausgeprägt. Weiterhin zeigt sich bei beiden Krankheitsbildern ein gehäuftes Auftreten von Skoliose. Kürzlich beschrieben auch Gurrieri et al. Merkmale bei Patienten mit *NFIX*-related Overgrowth Syndrom, die eher an das MSS erinnern, wie typische Hirnmalformationen im Sinne von Corpus callosum-Hypoplasien und dilatierte Ventrikel; akzelerierte Knochenreife mit z. T. gewehrkuelförmigen Phalangen; Prädispositionen zu Atemwegsinfektionen; visuellen Einschränkungen; blauen Skleren; moderater sensoneurinaler Schwerhörigkeit; neonatale Hypotonie und autistische Verhaltensauffälligkeiten wie Ängstlichkeit, Neigung zu repetitivem Verhalten und Hyperaktivität (Gurrieri et al., 2015). Die Phänotypen des *NFIX*-related Overgrowth-Syndroms (Haploinsuffizienz) und des MSS (dominant-negative Mutationen) scheinen demnach weiter zu überlappen als vorher geahnt.

Es wurde außerdem über intermediäre Fälle berichtet. Hierbei ist zum einen einer unserer Patienten zu nennen, der einen weniger stark ausgeprägten MSS-Phänotyp zeigte. Die Mutation (c.1392_1402+32dup) lag in diesem Fall im Exon 9 und führte zu einer ektopten Donor-Spleißstelle, ohne die ursprüngliche Spleißstelle außer Kraft zu setzen. Die Produktion einer normal gespleißten mRNA könnte durch Änderung der Stöchiometrie zugunsten des Wildtypproteins den Phänotyp abmildern (Schanze, Neubauer et al., 2014). Weiterhin fiel ein Patient auf, der unter der Rubrik *NFIX*-related-„Sotos-like“-Syndrom mit schwerer Ausprägung im Kollektiv von Gurrieri geführt wurde. Bei diesem Patienten wurde eine Nonsense-Mutation p.Gln338* in Exon 7 nachgewiesen (Gurrieri et al., 2015), welche in der Nähe zweier zuvor berichteter MSS-Mutationen (c.1011_1012delTC und c.1008_1012delCTCTC (Malan et al., 2010)) liegt. Zudem gibt es verschiedene alternative Spleißprodukte des *NFIX*-Gens, die einen Einfluss auf die verschiedenen Ausprägungsgrade beider Syndrome haben könnten und in diesem Fall zu einer Abmilderung des MSS-Phänotyps geführt haben könnten (Klaassens et al., 2015). Einige Mutationen liegen demnach

in Exons, die nicht in allen Isoformen enthalten sind. Dann wäre es möglich, dass diese Isoformen noch intakt gebildet werden. Möglicherweise führt die Mutation p.Gln338* jedoch auch zu einer Haploinsuffizienz des Gens (Gurrieri et al., 2015). Eine RT-PCR wurde in diesem Fall nicht durchgeführt, sodass nicht geklärt werden kann, ob die entstandenen m-RNAs dem NMD entgehen. Des Weiteren sind zwei intermediäre Fälle von *NFIX*-related-Overgrowth-Patienten mit schwererem Krankheitsbild berichtet worden. In der Publikation von Priolo et al. wurde ein Patient mit einer 21-Nukleotide-umfassenden In-Frame-Deletion in der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (c. 157_177delGAGCGGGCGGTGAAGGACGAG) beschrieben. Dieser zeigte ein Sotos Syndrom-ähnliches Phänotyp mit milden Symptomen des MSS wie Schlafapnoe und MSS-typischen radiologischen Veränderungen der Phalangen. Die In-Frame-Mutation bewirkt vermutlich eine starke Änderung der Proteinkonformation. Denkbar wäre, dass auch in diesen Fall ein mutiertes Protein entsteht, dem sieben Aminosäuren fehlen und welches die Homodimerisation sowie die Interaktion mit anderen Proteinen behindern könnte und zu einem milderem dominant-negativen Effekt führt (Gurrieri et al., 2015).

Auch im Kollektiv von Gurrieri et al. wurde ein Patient mit einer Frameshift-Mutation in der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne (c.191delA, p.K64Sfs*30) beschrieben, der ein schwereres Krankheitsbild und mehrere Merkmale des MSS, wie neonatale Hypotonie, ebenso MSS-typischen radiologischen Veränderungen der Phalangen und blaue Skleren, aufwies (Gurrieri et al., 2015).

Diese Beobachtungen legen demzufolge nahe, dass das *NFIX*-related „Sotos-like-Syndrom“ und das MSS eher ein kontinuierliches Spektrum an Krankheitsbildern mit variierendem Schweregrad und zwei Haupt-Kategorien darstellen. Dieses Konzept steht im Einklang mit einem Mutationsmechanismus, der von Haploinsuffizienz bis zu verschiedenen Ausprägungen von dominant-negativ agierenden mutierten Proteinen reicht. In Zusammenschau der Ergebnisse scheint die Bezeichnung *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom treffender zu sein, als Sotos-like-Syndrom, Sotos Syndrom 2 oder Malan-Syndrom.

6. Zusammenfassung

Das Marshall-Smith-Syndrom (MSS) zeichnet sich durch moderate bis schwere mentale Retardierung, abnorme Verhaltensmuster, dysharmonische Knochenreifung, respiratorische Beeinträchtigung, Kleinwuchs, Kyphoskoliose und typische Gesichtsmerkmale aus.

In der Literatur wurden bisher außerdem Patienten mit einem dem Sotos-Syndrom-ähnlichen Krankheitsbild beschrieben, die Merkmale wie Makrosomie und/oder Makrozephalie, mentale Retardierung und typische kraniofaziale Anomalien zeigten. Dieses Syndrom wurde auch als Sotos-like-Syndrom, Sotos Syndrom 2 oder Malan Syndrom beschrieben. Im Rahmen dieser Dissertation wurde der Begriff NFIX-related-Overgrowth-Syndrom verwendet.

Im Jahre 2010 gelang es Malan et al. erstmals, das Gen für den Nuclear factor I/X (NFIX) als kausales Gen sowohl für das MSS als auch für einige Fälle von Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp zu identifizieren. Auf der Basis von Untersuchungen auf mRNA-Ebene stellten sie die Hypothese auf, dass der Sotos-ähnliche Phänotyp durch eine Haploinsuffizienz des *NFIX*-Gens bedingt ist. Das schwerere Krankheitsbild des MSS hingegen wird durch Mutationen weiter C-terminal von der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne verursacht, die zu einem dominant negativen Effekt führen.

Im Rahmen dieser Dissertation wurden elf MSS-Patienten und 35 Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp auf das Vorhandensein von Mutationen im *NFIX*-Gen untersucht. Dabei stand neben der konventionellen DNA-Sequenzanalyse eine selbst entworfene MLPA-Analyse als neue und ergänzende Methode zur Mutationsanalyse zur Verfügung. Unter den elf MSS-Patienten befanden sich vier mit Frameshift-Mutationen. Bei drei Patienten ohne nachweisbare Mutation in der Sequenzierung fand sich eine Deletion der Exons 6 bis 7. Die Entstehung dieser rekurrenten Deletion konnte auf fehlerhafte Rekombinationsereignisse zurückgeführt werden, die durch Alu-Y-Elemente in den Introns 5 und 7 getriggert werden. Alle diese Veränderungen betreffen nur Abschnitte die für die CTF/NFI-Domäne von NFIX kodieren. Bei einem von 35 Patienten mit Sotos-ähnlichem Phänotyp konnte eine Nonsense-Mutation in dem für die DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne kodierenden Exon 2 des *NFIX*-Gens nachgewiesen werden.

Es konnten somit insgesamt ein neuer Fall einer *NFIX*-Mutation in der DNA-Bindungs- und Dimerisierungsdomäne bei einem Patienten mit Sotos Syndrom-ähnlichem Phänotyp nachgewiesen und *NFIX* als bisher einziges kausales Gen für das MSS belegt werden. Außerdem wurde ein signifikanter Teil der bisher genetisch ungeklärten MSS-Patienten durch Entdeckung eines neuen Mutationsmechanismus, der rekurrenten Deletion von Exon 6 und 7, durch die selbst entwickelte MLPA geklärt. Dadurch wurde auch eine neue Methode zur Diagnostik des MSS etabliert. Die

beobachteten Mutationen und assoziierten Phänotypen unterstützen die etablierten Genotyp-Phänotyp-Korrelationen. Allerdings zeigt die kritische Beurteilung des Phänotyps von Patienten mit Sotos-Syndrom-ähnlichem Phänotyp und Mutationen im *NFIX*-Gen auch einige Ähnlichkeiten zum MSS, so dass eher von einem kontinuierlichen Spektrum einer Krankheitsausprägung mit variierendem Schweregrad auszugehen ist.

7. Anhang

7.1 Patientenkollektive

Tabelle 7.1: NFIX-related-Overgrowth-Syndrom-Patienten. Gezeigt sind Patienten- und DNA-Identifikationsnummern sowie die Probeneinsender.

Patienten-ID	DNA-ID	Einsender	Patienten-ID	DNA-ID	Einsender
P1	1262-11	Frankreich	P13	696-11	Dresden
P2	1263-11		P14	697-11	
P3	1264-11		P15	698-11	
P4	1265-11		P16	699-11	
P5	331-11	Kanada	P17	700-11	
P6	310-11		P18	701-11	
P7	232-11		P19	702-11	
P8	525-11	Eigene (Magdeburg)	P20	703-11	
P9	538-11		P21	704-11	
P10	559-11		P22	705-11	
P11	125-11	Lübeck	P23	708-11	
P12	906-11		P24	709-11	

Tabelle 7.1 Fortsetzung

Patienten-ID	DNA-ID	Einsender
P25	710-11	Dresden
P26	711-11	
P27	712-11	
P28	713-11	
P29	714-11	
P30	715-11	
P31	716-11	
P32	717-11	
P33	718-11	
P34	720-11	
P35	721-11	

Tabelle 7.2: MSS-Patienten. Gezeigt sind Patienten- und DNA-Identifikationsnummern sowie Probeneinsender.

Patienten-ID	DNA-ID	Einsender
P36	1090-10	Erlangen
P37	1088-10	
P38	726-09	
P39	1087-10	
P40	47726	
P41	1281-10	Frankreich
P42	1282-10	
P43	1283-10	
P44	1284-10	
P45	1285-10	
P46	1009-10	Japan

7.2 PCR- und Sequenzierungsprimer

Tabelle 7.3: PCR- und Sequenzierungsprimer. Dargestellt sind Forward- und Reverse-Primersequenzen für die einzelnen Exons des *NFIX*-Gens.

Exon	Forward-Sequenz	Reverse-Sequenz
NFIX e1nf	gccgcttccaaactttgtc	cacctcttgccactctgtc
NFIX e1f*	ggcggcatggagtagacg	ggaacccccaaaaggagtc
NFIX e2af	ccccttctaacgctgctttt	ggatcttgcccttctggtc
NFIX e2bf	atcaagcagaagtgggcatc	acgggcatacaccagttagg
NFIX e3+4f	aatgcttggctggctgttat	cattaggaggacatcccatga
NFIX e5n1f	ctgtctccagtctccattgc	gagagaggtgacattctgaagc
NFIX e6f	agtgagtcccagaaatgct	ggtgaactgagaaggggaca
NFIX e7f	ctggtagaagcacccttg	gccagctgcccctagatact
NFIX e8f	atcctcaggacctctgacc	cctctccggaccatgataga
NFIX e9f	tacacctcaccatcctgt	ggggaaggcttttcttttg
NFIX e10f	gtgagaggatgagggtgtcc	caggctcttcctaacacca
NFIX e11f	gccaggtaggagtgagatgg	ttcagaattgtgctggttgc

* Primer wurde ausschließlich für die PCR genutzt

7.4 Protokolle

Tabelle 7.5: Reagenzien für die PCR-Reaktion. Dargestellt sind die Mengen der Reagenzien für einen Einzelansatz.

Reagenzien	Einzelansatz
Aqua	5,6 µl
dNTPs	2,0 µl
Puffer	2,0 µl
MgCl ₂ (50 mmol)	0,6 µl
DMSO (5%)	1,0 µl
Betaine 5M	4,0 µl
Taq-Polymerase	0,1 µl
Primer F	2,0 µl
Primer R	2,0 µl
DNA	0,7 µl
Gesamt	20,0 µl

Tabelle 7.6: Reagenzien für die Sequenzier-Reaktion. Gezeigt sind die Mengen der Reagenzien für einen Einzelansatz.

Reagenzien	Einzelansatz
Primer (F oder R)	0,6 µl
Aqua	2,4 µl
Big-Dye	0,25 µl
Sequenzierpuffer	1,0 µl
DMSO	0,25 µl
aufgereinigtes PCR-Produkt	0,5 µl
Gesamt	5,0 µl

Tabelle 7.7: Reagenzien für den Hybridisierungs-Mastermix. Aufgeführt sind die Mengen der Reagenzien für einen Einzelansatz.

Reagenzien	Einzelansatz
Reference-Probemix P300	1,0 µl
eigener Probemix	0,5 µl
MLPA-Puffer	1,5 µl

Tabelle 7.8: Reagenzien für den Ligase-Mastermix. Aufgelistet sind die Mengen der Reagenzien für einen Einzelansatz.

Reagenzien	Einzelansatz
Ligase-Puffer A	3,0 µl
Ligase-Puffer B	3,0 µl
Ampuwa	25,0 µl
Ligase	1,0 µl

Tabelle 7.9: Reagenzien für den Polymerase-Mastermix. Dargestellt sind die Mengen der Reagenzien für einen Einzelansatz.

Reagenzien	Einzelansatz
SALSA PCR-Primer	2,0 µl
SALSA Enzyme Dilution Buffer	2,0 µl
Ampuwa	5,5 µl
SALSA Polymerase	0,5 µl

Tabelle 7.10: Reagenzien für den Lade-Mix. Zu sehen sind die Mengen der Reagenzien für einen Einzelansatz.

Reagenzien	Einzelansatz
LIZ500 size standard	0,1 µl
Hi-Di Formamid	10,0 µl

7.5 MLPA-Probe-Mixe

Tabelle 7.11: Probe-Mix 1. Aufgeführt ist die eingesetzte Menge der MLPA-Sonden.

MLPA-Sonde (jeweils F und R)	Menge
Ex1 (Prom)	2,5 µl
Ex2	0,8 µl
Ex3	0,5 µl
Ex4	0,4 µl
Ex5	0,7 µl
Ex6	0,4 µl
Ex7	0,5 µl
Ex8	0,8 µl
Ex9	0,8 µl
Ex10	0,6 µl
Ex11	0,3 µl

Tabelle 7.12: Probe-Mix 2. Aufgelistet ist die eingesetzte Menge der MLPA-Sonden.

MLPA-Sonde (jeweils F und R)	Menge
Ex4	0,8 µl
Ex5	0,8 µl
Ex6	0,8 µl
intr6	0,8 µl
Ex7	0,8 µl
intr7	0,8 µl
Ex8	0,8 µl
Ex9	0,8 µl
CTH	0,8 µl
ERCC6	0,8 µl

7.6 Programme

Tabelle 7.13: Thermocyclerprogramm „Erlangen 65“. Dargestellt sind die einzelnen Schritte des Programmes mit Temperatur und Dauer.

Schritt	Temperatur	Dauer
Heated Lid	110°C 94°C	5:00 min
Start Cycle 2x		
Denaturation	94°C	0:30 min
Annealing	65°C	0:45 min
Elongation	72°C	0:45 min
End Cycle		
Start Cycle 2x		
Denaturation	94°C	0:30 min
Annealing	61°C	0:45 min
Elongation	72°C	0:45 min
End Cycle		
Start Cycle 31x		
Denaturation	94°C	0:30 min
Annealing	55°C	0:45 min
Elongation	72°C	0:45 min
End Cycle		
Elongation	72°C	10:00 min
Store	10°C	unbegrenzt

Tabelle 7.14: Thermocycler-Programm „ABI SEQ 2 98C“. Gezeigt sind die einzelnen Schritte des Programmes mit Temperatur und Dauer.

Schritt	Temperatur	Dauer
Heated Lid	110°C	
Start Cycle 26x		
	98°C	0:10 min
	55°C	0:10 min
	60°C	2:00 min
End Cycle		
Store	10°C	unbegrenzt

Tabelle 7.15: Thermocyclerprogramm „MLPA 1“. Aufgelistet sind die einzelnen Schritte des Programmes mit Temperatur und Dauer.

Schritt	Temperatur	Dauer
Denaturation	98°C	5:00 min
	25°C	unbegrenzt
Hybridisation	95°C	1:00 min
	60°C	unbegrenzt
Ligation	54°C	unbegrenzt
	54°C	15:00 min
	98°C	5:00 min
	15°C	unbegrenzt

Tabelle 7.16: Thermocyclerprogramm „MLPA 2“. Aufgeführt sind die einzelnen Schritte des Programmes mit Temperatur und Dauer.

Schritt	Temperatur	Dauer
PCR Heated Lid Start Cycle 35x	60°C	
	95°C	0:30 min
	60°C	0:30 min
	72°C	1:00 min
End Cycle		
Store	72°C	20:00 min
	15°C	unbegrenzt

8. Literaturverzeichnis

- 1) Adam, Margaret P.; Hennekam, Raoul C. M.; Keppen, Laura Davis; Bull, Marilyn J.; Clericuzio, Carol L.; Burke, Leah W. et al. (2005): Marshall-Smith syndrome: natural history and evidence of an osteochondrodysplasia with connective tissue abnormalities. In: *Am. J. Med. Genet. A* 137 (2), S. 117–124. DOI: 10.1002/ajmg.a.30580.
- 2) Adams, A. D.; Choate, D. M.; Thompson, M. A. (1995): NF1-L is the DNA-binding component of the protein complex at the peripherin negative regulatory element. In: *J. Biol. Chem.* 270 (12), S. 6975–6983.
- 3) Agwu, J. C.; Shaw, N. J.; Kirk, J.; Chapman, S.; Ravine, D.; Cole, T. R. (1999): Growth in Sotos syndrome. In: *Arch. Dis. Child.* 80 (4), S. 339–342.
- 4) Amiel, J.; Faivre, L.; Wilson, L.; Le Merrer, M.; Munnich, A.; Winter, R. et al. (2002): Dysmorphism, variable overgrowth, normal bone age, and severe developmental delay: a "Sotos-like" syndrome? In: *J. Med. Genet.* 39 (2), S. 148–152.
- 5) Artlett, C. M.; Chen, S. J.; Varga, J.; Jimenez, S. A. (1998): Modulation of basal expression of the human alpha1(I) procollagen gene (COL1A1) by tandem NF-1/Sp1 promoter elements in normal human dermal fibroblasts. In: *Matrix Biol.* 17 (6), S. 425–434.
- 6) Bachurski, C. J.; Kelly, S. E.; Glasser, S. W.; Currier, T. A. (1997): Nuclear factor I family members regulate the transcription of surfactant protein-C. In: *J. Biol. Chem.* 272 (52), S. 32759–32766.
- 7) Batzer, Mark A.; Deininger, Prescott L. (2002): ALU REPEATS AND HUMAN GENOMIC DIVERSITY. In: *Nat. Rev. Genet.* 3 (5), S. 370–379. DOI: 10.1038/nrg798.
- 8) Baujat, Geneviève; Cormier-Daire, Valérie (2007): Sotos syndrome. In: *Orphanet J Rare Dis* 2, S. 36. DOI: 10.1186/1750-1172-2-36.
- 9) Baujat, Geneviève; Rio, Marlène; Rossignol, Sylvie; Sanlaville, Damien; Lyonnet, Stanislas; Le Merrer, Martine et al. (2004): Paradoxical NSD1 mutations in Beckwith-Wiedemann syndrome and 11p15 anomalies in Sotos syndrome. In: *Am. J. Hum. Genet.* 74 (4), S. 715–720. DOI: 10.1086/383093.
- 10) Baynam, Gareth; Schofield, Lyn; Goldblatt, Jack (2011): A child with an STK11 mutation and Sotos syndrome-like features: can STK11 mutations produce a Sotos syndrome phenocopy? In: *BMJ Case Rep* 2011. DOI: 10.1136/bcr.07.2011.4445.
- 11) Beckman Coulter (Hg.) (2009): AGENCOURT AMPure XP. PCR PURIFICATION. Online verfügbar unter http://www.beckmancoulter.de/beckman2_media/Life+Sciences/Produkte/Instrumente/Molekularbiologie/DNARNA_Aufreinigung/DNA_Aufreinigung/Apps+AMPure+XP/AMPure+XP+Protokoll.pdf, zuletzt aktualisiert am 15.04.2009, zuletzt geprüft am 04.10.2012.
- 12) Boer, Lonke de; Kant, Sarina G.; Karperien, Marcel; van Beers, Lotte; Tjon, Jennifer; Vink, Geraldine R. et al. (2004): Genotype-phenotype correlation in patients suspected of having Sotos syndrome. In: *Horm. Res.* 62 (4), S. 197–207. DOI: 10.1159/000081063.
- 13) Boone, Philip M.; Liu, Pengfei; Zhang, Feng; Carvalho, Claudia M. B.; Towne, Charles F.; Batish, Sat Dev; Lupski, James R. (2011): Alu-specific microhomology-mediated deletion of the final exon of SPAST in three unrelated subjects with hereditary spastic paraplegia. In: *Genetics in medicine : official journal of the American College of Medical Genetics* 13 (6), S. 582–592. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3182106775.
- 14) Brun, Miranda; Coles, Jeffrey E.; Monckton, Elizabeth A.; Glubrecht, Darryl D.; Bisgrove, Dwayne; Godbout, Roseline (2009): Nuclear factor I regulates brain fatty acid-binding protein

- and glial fibrillary acidic protein gene expression in malignant glioma cell lines. In: *J. Mol. Biol.* 391 (2), S. 282–300. DOI: 10.1016/j.jmb.2009.06.041.
- 15) Butler, Merlin G. (2004): Marshall-Smith syndrome: Follow-up report of a four and a half year old male. In: *Am. J. Med. Genet. A* 126 (3), S. 329–330. DOI: 10.1002/ajmg.a.20603.
 - 16) Campbell, Christine E.; Piper, Michael; Plachez, Céline; Yeh, Yu-Ting; Baizer, Joan S.; Osinski, Jason M. et al. (2008): The transcription factor Nfix is essential for normal brain development. In: *BMC Dev. Biol.* 8, S. 52. DOI: 10.1186/1471-213X-8-52.
 - 17) Chatel, C.; Maazoul, F.; Sigaudy, S.; Fredouille, C.; Ayme, S.; Philip, N. (1998): Neonatal death in Marshall-Smith syndrome. In: *Genet. Couns.* 9 (1), S. 15–18.
 - 18) Chaudhry, A. Z.; Lyons, G. E.; Gronostajski, R. M. (1997): Expression patterns of the four nuclear factor I genes during mouse embryogenesis indicate a potential role in development. In: *Dev. Dyn.* 208 (3), S. 313–325. DOI: 10.1002/(SICI)1097-0177(199703)208:3<313::AID-AJA3>3.0.CO;2-L.
 - 19) Chen, Chih-Ping; Lin, Shuan-Pei; Chang, Tung-Yao; Chiu, Nan-Chang; Shih, Shin-Lin; Lin, Chen-Ju et al. (2002): Perinatal imaging findings of inherited Sotos syndrome. In: *Prenat. Diagn.* 22 (10), S. 887–892. DOI: 10.1002/pd.433.
 - 20) Christner, Paul J.; Yufit, Tatyana; Peters, Josephine; McGrath, Rodney; Conway, Raymond F.; Jiménez, Sergio A. (2003): Transcriptional activation of alpha 1(III) procollagen gene in Tsk2/+ dermal fibroblasts. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 303 (2), S. 406–412.
 - 21) Cole, T. R.; Hughes, H. E. (1990): Sotos syndrome. In: *J. Med. Genet.* 27 (9), S. 571–576.
 - 22) Cole, T. R.; Hughes, H. E. (1994): Sotos syndrome: a study of the diagnostic criteria and natural history. In: *J. Med. Genet.* 31 (1), S. 20–32.
 - 23) Cooke, D. W.; Lane, M. D. (1999): The transcription factor nuclear factor I mediates repression of the GLUT4 promoter by insulin. In: *J. Biol. Chem.* 274 (18), S. 12917–12924.
 - 24) Cooley, Sharon M.; O'Connell, M. P.; Keane, D. (2004): Marshall Smith syndrome and pregnancy. In: *J Obstet Gynaecol* 24 (2), S. 181. DOI: 10.1080/01443610410001648368.
 - 25) Cullen, A.; Clarke, T. A.; O'Dwyer, T. P. (1997): The Marshall-Smith syndrome: a review of the laryngeal complications. In: *Eur. J. Pediatr.* 156 (6), S. 463–464.
 - 26) Deininger, P. L.; Batzer, M. A. (1999): Alu repeats and human disease. In: *Molecular genetics and metabolism* 67 (3), S. 183–193. DOI: 10.1006/mgme.1999.2864.
 - 27) Dekker, J.; van Oosterhout, J. A.; van der Vliet, P. C. (1996): Two regions within the DNA binding domain of nuclear factor I interact with DNA and stimulate adenovirus DNA replication independently. In: *Mol. Cell. Biol.* 16 (8), S. 4073–4080.
 - 28) Deutschbauer, Adam M.; Jaramillo, Daniel F.; Proctor, Michael; Kumm, Jochen; Hillenmeyer, Maureen E.; Davis, Ronald W. et al. (2005): Mechanisms of haploinsufficiency revealed by genome-wide profiling in yeast. In: *Genetics* 169 (4), S. 1915–1925. DOI: 10.1534/genetics.104.036871.
 - 29) Diab, Mohammad; Raff, Michael; Gunther, Daniel F. (2003): Osseous fragility in Marshall-Smith syndrome. In: *Am. J. Med. Genet. A* 119 (2), S. 218–222. DOI: 10.1002/ajmg.a.10173.
 - 30) Dolan, Michelle; Mendelsohn, Nancy J.; Pierpont, Mary Ella; Schimmenti, Lisa A.; Berry, Susan A.; Hirsch, Betsy (2010): A novel microdeletion/microduplication syndrome of 19p13.13. In: *Genet. Med.* 12 (8), S. 503–511. DOI: 10.1097/GIM.0b013e3181e59291.
 - 31) Donnelly, Deirdre E.; Turnpenny, Peter; McConnell, Vivienne P. M. (2011): Phenotypic variability in a three-generation Northern Irish family with Sotos syndrome. In: *Clin. Dysmorphol.* 20 (4), S. 175–181. DOI: 10.1097/MCD.0b013e328349182d.
 - 32) Douglas, J.; Tatton-Brown, K.; Coleman, K.; Guerrero, S.; Berg, J.; Cole, T. R. P. et al. (2005): Partial NSD1 deletions cause 5% of Sotos syndrome and are readily identifiable by

- multiplex ligation dependent probe amplification. In: *J. Med. Genet.* 42 (9), S. e56. DOI: 10.1136/jmg.2005.031930.
- 33) Douglas, Jenny; Hanks, Sandra; Temple, I. Karen; Davies, Sally; Murray, Alexandra; Upadhyaya, Meena et al. (2003): NSD1 mutations are the major cause of Sotos syndrome and occur in some cases of Weaver syndrome but are rare in other overgrowth phenotypes. In: *Am. J. Hum. Genet.* 72 (1), S. 132–143.
 - 34) Driller, Katrin; Pagenstecher, Axel; Uhl, Markus; Omran, Heymut; Berlis, Ansgar; Gründer, Albert; Sippel, Albrecht E. (2007): Nuclear factor I X deficiency causes brain malformation and severe skeletal defects. In: *Mol. Cell. Biol.* 27 (10), S. 3855–3867. DOI: 10.1128/MCB.02293-06.
 - 35) Du, Minjie; Beatty, Linda G.; Zhou, Wenjing; Lew, Jocelyne; Schoenherr, Christopher; Weksberg, Rosanna; Sadowski, Paul D. (2003): Insulator and silencer sequences in the imprinted region of human chromosome 11p15.5. In: *Hum. Mol. Genet.* 12 (15), S. 1927–1939.
 - 36) Eich, G. F.; Silver, M. M.; Weksberg, R.; Daneman, A.; Costa, T. (1991): Marshall-Smith syndrome: new radiographic, clinical, and pathologic observations. In: *Radiology* 181 (1), S. 183–188.
 - 37) Fitch, N. (1980): The syndromes of Marshall and Weaver. In: *J. Med. Genet.* 17 (3), S. 174–178.
 - 38) Fletcher, C. F.; Jenkins, N. A.; Copeland, N. G.; Chaudhry, A. Z.; Gronostajski, R. M. (1999): Exon structure of the nuclear factor I DNA-binding domain from *C. elegans* to mammals. In: *Mamm. Genome* 10 (4), S. 390–396.
 - 39) Franke, Gerlind; Bausch, Birke; Hoffmann, Michael M.; Cybulla, Markus; Wilhelm, Christian; Kohlhase, Jürgen et al. (2009): Alu-Alu recombination underlies the vast majority of large VHL germline deletions: Molecular characterization and genotype-phenotype correlations in VHL patients. In: *Human mutation* 30 (5), S. 776–786. DOI: 10.1002/humu.20948.
 - 40) Gounari, F.; Francesco, R. de; Schmitt, J.; van der Vliet, P.; Cortese, R.; Stunnenberg, H. (1990): Amino-terminal domain of NF1 binds to DNA as a dimer and activates adenovirus DNA replication. In: *EMBO J.* 9 (2), S. 559–566.
 - 41) Gronostajski, R. M. (2000): Roles of the NFI/CTF gene family in transcription and development. In: *Gene* 249 (1-2), S. 31–45.
 - 42) Gurrieri, Fiorella; Cavaliere, Maria Luigia; Wischmeijer, Anita; Mammì, Corrado; Neri, Giovanni; Pisanti, Maria Antonietta et al. (2015): NFIX mutations affecting the DNA-binding domain cause a peculiar overgrowth syndrome (Malan syndrome): A new patients series. In: *European journal of medical genetics* 58 (9), S. 488–491. DOI: 10.1016/j.ejmg.2015.06.009.
 - 43) Harris, Lachlan; Dixon, Chantelle; Cato, Kathleen; Heng, Yee Hsieh Evelyn; Kurniawan, Nyoman D.; Ullmann, Jeremy F. P. et al. (2013): Heterozygosity for nuclear factor one x affects hippocampal-dependent behaviour in mice. In: *PloS one* 8 (6), S. e65478. DOI: 10.1371/journal.pone.0065478.
 - 44) Hearle, Nicholas; Schumacher, Valérie; Menko, Fred H.; Olschwang, Sylviane; Boardman, Lisa A.; Gille, Johan J. P. et al. (2006): Frequency and spectrum of cancers in the Peutz-Jeghers syndrome. In: *Clin. Cancer Res.* 12 (10), S. 3209–3215. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-06-0083.
 - 45) Heng, Yee Hsieh Evelyn; McLeay, Robert C.; Harvey, Tracey J.; Smith, Aaron G.; Barry, Guy; Cato, Kathleen et al. (2012): NFIX Regulates Neural Progenitor Cell Differentiation During Hippocampal Morphogenesis. In: *Cereb. Cortex*. DOI: 10.1093/cercor/bhs307.
 - 46) Heng, Yee Hsieh Evelyn; McLeay, Robert C.; Harvey, Tracey J.; Smith, Aaron G.; Barry, Guy; Cato, Kathleen et al. (2014): NFIX regulates neural progenitor cell differentiation during

- hippocampal morphogenesis. In: *Cerebral cortex (New York, N.Y. : 1991)* 24 (1), S. 261–279. DOI: 10.1093/cercor/bhs307.
- 47) Jackson, D. A.; Rowader, K. E.; Stevens, K.; Jiang, C.; Milos, P.; Zaret, K. S. (1993): Modulation of liver-specific transcription by interactions between hepatocyte nuclear factor 3 and nuclear factor 1 binding DNA in close apposition. In: *Mol. Cell. Biol.* 13 (4), S. 2401–2410.
 - 48) Johnson, J. P.; Carey, J. C.; Glassy, F. J.; Paglieroni, T.; Lipson, M. H. (1983): Marshall-Smith syndrome: two case reports and a review of pulmonary manifestations. In: *Pediatrics* 71 (2), S. 219–223.
 - 49) Khajavi, Mehrdad; Inoue, Ken; Lupski, James R. (2006): Nonsense-mediated mRNA decay modulates clinical outcome of genetic disease. In: *Eur. J. Hum. Genet.* 14 (10), S. 1074–1081. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201649.
 - 50) Klaassens, Merel; Morrogh, Deborah; Rosser, Elisabeth M.; Jaffer, Fatima; Vreeburg, Maaïke; Bok, Levinus A. et al. (2015): Malan syndrome: Sotos-like overgrowth with de novo NFIX sequence variants and deletions in six new patients and a review of the literature. In: *European journal of human genetics : EJHG* 23 (5), S. 610–615. DOI: 10.1038/ejhg.2014.162.
 - 51) Krohn, K.; Rozovsky, I.; Wals, P.; Teter, B.; Anderson, C. P.; Finch, C. E. (1999): Glial fibrillary acidic protein transcription responses to transforming growth factor-beta1 and interleukin-1beta are mediated by a nuclear factor-1-like site in the near-upstream promoter. In: *J. Neurochem.* 72 (4), S. 1353–1361.
 - 52) Kruse, U.; Qian, F.; Sippel, A.E (1991): Identification of a fourth Nuclear Factor I gene in chicken by cDNA cloning: NFI-X. In: *Nucleic Acids Research* (Vol. 19, No 23), S. 6641, zuletzt geprüft am 06.12.2012.
 - 53) Kruse, U.; Sippel, A. E. (1994): The genes for transcription factor nuclear factor I give rise to corresponding splice variants between vertebrate species. In: *J. Mol. Biol.* 238 (5), S. 860–865. DOI: 10.1006/jmbi.1994.1343.
 - 54) Kruse, U.; Sippel, A. E. (1994): Transcription factor nuclear factor I proteins form stable homo- and heterodimers. In: *FEBS Lett.* 348 (1), S. 46–50.
 - 55) Kùchler, A.; Wiczorek, D. (2011): Syndrome mit dem Leitsymptom Großwuchs. In: *medgen* 23 (4), S. 505–517. DOI: 10.1007/s11825-011-0307-7.
 - 56) Kuersten, Scott; Goodwin, Elizabeth B. (2003): The power of the 3' UTR: translational control and development. In: *Nat. Rev. Genet.* 4 (8), S. 626–637. DOI: 10.1038/nrg1125.
 - 57) Kurotaki, N.; Harada, N.; Yoshiura, K.; Sugano, S.; Niikawa, N.; Matsumoto, N. (2001): Molecular characterization of NSD1, a human homologue of the mouse Nsd1 gene. In: *Gene* 279 (2), S. 197–204.
 - 58) Kurotaki, Naohiro; Imaizumi, Kiyoshi; Harada, Naoki; Masuno, Mitsuo; Kondoh, Tatsuro; Nagai, Toshiro et al. (2002): Haploinsufficiency of NSD1 causes Sotos syndrome. In: *Nat. Genet.* 30 (4), S. 365–366. DOI: 10.1038/ng863.
 - 59) Lapunzina, Pablo (2005): Risk of tumorigenesis in overgrowth syndromes: a comprehensive review. In: *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 137 (1), S. 53–71. DOI: 10.1002/ajmg.c.30064.
 - 60) Lehman, A. M.; Du Souich, C.; Chai, D.; Eydoux, P.; Huang, J. L.; Fok, A. K. et al. (2012): 19p13.2 microduplication causes a Sotos syndrome-like phenotype and alters gene expression. In: *Clin. Genet.* 81 (1), S. 56–63. DOI: 10.1111/j.1399-0004.2010.01615.x.
 - 61) Leventopoulos, George; Kitsiou-Tzeli, Sophia; Kritikos, Konstantinos; Psoni, Stavroula; Mavrou, Ariadni; Kanavakis, Emmanuel; Fryssira, Helen (2009): A clinical study of Sotos syndrome patients with review of the literature. In: *Pediatr. Neurol.* 40 (5), S. 357–364. DOI: 10.1016/j.pediatrneurol.2008.11.013.

- 62) Li, Lili; McVety, Susan; Younan, Rami; Liang, Ping; Du Sart, Desirée; Gordon, Philip H. et al. (2006): Distinct patterns of germ-line deletions in MLH1 and MSH2: the implication of Alu repetitive element in the genetic etiology of Lynch syndrome (HNPCC). In: *Human mutation* 27 (4), S. 388. DOI: 10.1002/humu.9417.
- 63) Malan, Valérie; Rajan, Diana; Thomas, Sophie; Shaw, Adam C.; Louis dit Picard, Hélène; Layet, Valérie et al. (2010): Distinct effects of allelic NFIX mutations on nonsense-mediated mRNA decay engender either a Sotos-like or a Marshall-Smith syndrome. In: *Am. J. Hum. Genet.* 87 (2), S. 189–198. DOI: 10.1016/j.ajhg.2010.07.001.
- 64) Marshall, R. E.; Graham, C. B.; Scott, C. R.; Smith, D. W. (1971): Syndrome of accelerated skeletal maturation and relative failure to thrive: a newly recognized clinical growth disorder. In: *J. Pediatr.* 78 (1), S. 95–101.
- 65) Martinez, E.; Dusserre, Y.; Wahli, W.; Mermod, N. (1991): Synergistic transcriptional activation by CTF/NF-I and the estrogen receptor involves stabilized interactions with a limiting target factor. In: *Mol. Cell. Biol.* 11 (6), S. 2937–2945.
- 66) Martinez, Francisco; Marín-Reina, Purificación; Sanchis-Calvo, Amparo; Perez-Aytés, Antonio; Oltra, Silvestre; Roselló, Mónica et al. (2015): Novel mutations of NFIX gene causing Marshall-Smith syndrome or Sotos-like syndrome: one gene, two phenotypes. In: *Pediatric research*. DOI: 10.1038/pr.2015.135.
- 67) Mason, Sharon; Piper, Michael; Gronostajski, Richard M.; Richards, Linda J. (2009): Nuclear factor one transcription factors in CNS development. In: *Mol. Neurobiol.* 39 (1), S. 10–23. DOI: 10.1007/s12035-008-8048-6.
- 68) Mayo, Sonia; Garin, Intza; Monfort, Sandra; Roselló, Mónica; Orellana, Carmen; Oltra, Silvestre et al. (2012): Hypomethylation of the KCNQ1OT1 imprinting center of chromosome 11 associated to Sotos-like features. In: *J. Hum. Genet.* 57 (2), S. 153–156. DOI: 10.1038/jhg.2011.145.
- 69) Mazoyer, Sylvie (2005): Genomic rearrangements in the BRCA1 and BRCA2 genes. In: *Human mutation* 25 (5), S. 415–422. DOI: 10.1002/humu.20169.
- 70) Mazumder, Barsanjit; Seshadri, Vasudevan; Fox, Paul L. (2003): Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. In: *Trends Biochem. Sci.* 28 (2), S. 91–98. DOI: 10.1016/S0968-0004(03)00002-1.
- 71) Meisterernst, M.; Rogge, L.; Foeckler, R.; Karaghiosoff, M.; Winnacker, E. L. (1989): Structural and functional organization of a porcine gene coding for nuclear factor I. In: *Biochemistry* 28 (20), S. 8191–8200.
- 72) Mermod, N.; O'Neill, E. A.; Kelly, T. J.; Tjian, R. (1989): The proline-rich transcriptional activator of CTF/NF-I is distinct from the replication and DNA binding domain. In: *Cell* 58 (4), S. 741–753.
- 73) MRC Holland (Hg.) (2012): Designing synthetic MLPA probes. Online verfügbar unter <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhAPz9QEm7akikAm7AOEGw1vtZvffaZPOiSig8uqel7Yd>, zuletzt aktualisiert am 13.01.2012, zuletzt geprüft am 03.10.2012.
- 74) MRC-Holland (Hg.) (2011): Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification (MLPA®). Copy number quantification & Methylation detection
- 75) Online verfügbar unter <http://www.mlpa.com/WebForms/WebFormMain.aspx?Tag=zjCZBtdOUyAt3KF3EwRZhNWLtcfv9pVI/tHJIM\fa9FWO8KMqctOGloqYwxaGF9Y>, zuletzt aktualisiert am 14.12.2011, zuletzt geprüft am 19.09.2012.
- 76) Natiq, Abdelhafid; Elalaoui, Siham Chafai; Miesch, Sevrine; Bonnet, Celine; Jonveaux, Philippe; Amzazi, Saaïd; Sefiani, Abdelaziz (2014): A new case of de novo 19p13.2p13.12 deletion in a girl with overgrowth and severe developmental delay. In: *Molecular cytogenetics* 7, S. 40. DOI: 10.1186/1755-8166-7-40.

- 77) Neri, Giovanni; Moscarda, Marco (2009): Overgrowth syndromes: a classification. In: *Endocr Dev* 14, S. 53–60. DOI: 10.1159/000207476.
- 78) Neylon, Orla M.; Werther, George A.; Sabin, Matthew A. (2012): Overgrowth syndromes. In: *Current opinion in pediatrics* 24 (4), S. 505–511. DOI: 10.1097/MOP.0b013e3283558995.
- 79) Nowock, J.; Sippel, A. E. (1982): Specific protein-DNA interaction at four sites flanking the chicken lysozyme gene. In: *Cell* 30 (2), S. 607–615.
- 80) Osada, S.; Daimon, S.; Nishihara, T.; Imagawa, M. (1996): Identification of DNA binding-site preferences for nuclear factor I-A. In: *FEBS Lett.* 390 (1), S. 44–46.
- 81) Palacios, Daniela; Puri, Pier Lorenzo (2010): Switch NFix developmental myogenesis. In: *Dev. Cell* 18 (3), S. 340–341. DOI: 10.1016/j.devcel.2010.03.005.
- 82) Passalacqua, Cristóbal; Melo, Camila; Martín, Luz María; Rojas, Francisca; Sanz, Patricia; Taucher, Silvia Castillo; Aranibar, Ligia (2011): A pigmentary skin defect is a new finding in Marshall-Smith syndrome. In: *Am. J. Med. Genet. A* 155 (8), S. 2015–2017. DOI: 10.1002/ajmg.a.34076.
- 83) Pekarik, Vladimir; Izpisua Belmonte, Juan Carlos (2008): NFIX--one gene, two knockouts, multiple effects. In: *J. Biol.* 7 (8), S. 29. DOI: 10.1186/jbiol94.
- 84) Pérez-Casellas, Laura A.; Wang, Xiaoying; Howard, Kristy D.; Rehage, Mark W.; Strong, Donna D.; Linkhart, Thomas A. (2009): Nuclear factor I transcription factors regulate IGF binding protein 5 gene transcription in human osteoblasts. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1789 (2), S. 78–87. DOI: 10.1016/j.bbagr.2008.08.013.
- 85) Piper, Michael; Dawson, Amber-Lee S.; Lindwall, Charlotta; Barry, Guy; Plachez, Céline; Richards, Linda J. (2007): Emx and Nfi genes regulate cortical development and axon guidance in the telencephalon. In: *Novartis Found. Symp.* 288, S. 230-242; discussion 242-5, 276-81.
- 86) Piper, Michael; Harris, Lachlan; Barry, Guy; Heng, Yee Hsieh Evelyn; Plachez, Celine; Gronostajski, Richard M.; Richards, Linda J. (2011): Nuclear factor one X regulates the development of multiple cellular populations in the postnatal cerebellum. In: *J. Comp. Neurol.* 519 (17), S. 3532–3548. DOI: 10.1002/cne.22721.
- 87) Pirok, E. W.; Li, H.; Mensch, J. R.; Henry, J.; Schwartz, N. B. (1997): Structural and functional analysis of the chick chondroitin sulfate proteoglycan (aggrecan) promoter and enhancer region. In: *J. Biol. Chem.* 272 (17), S. 11566–11574.
- 88) Pistocchi, Anna; Gaudenzi, Germano; Foglia, Efrem; Monteverde, Stefania; Moreno-Fortuny, Artal; Pianca, Alessia et al. (2013): Conserved and divergent functions of Nfix in skeletal muscle development during vertebrate evolution. In: *Development (Cambridge, England)* 140 (7), S. 1528–1536. DOI: 10.1242/dev.076315.
- 89) Plachez C, Cato K. McLeay RC Heng YH Bailey TL Gronostajski RM Richards LJ Puche AC Piper M. (2012): Expression of nuclear factor one A and -B in the olfactory bulb. In: *J Comp Neurol.*, 2012 (520(14)), S. 3135–3149.
- 90) Priolo, Manuela; Grosso, Enrico; Mammì, Corrado; Labate, Claudia; Naretto, Valeria Giorgia; Vacalebri, Caterina et al. (2012): A peculiar mutation in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX causes Sotos-like overgrowth syndrome: A new case. In: *Gene* 511 (1), S. 103–105. DOI: 10.1016/j.gene.2012.08.040.
- 91) QIAGEN GmbH (Hg.) (2010): QIAamp DNA Mini and Blood Mini Handbook. Online verfügbar unter <http://www.qiagen.com/products/genomicdnastabilizationpurification/qiaampsystem/qiaampdnabloodminikit.aspx#Tabs=t2>, zuletzt aktualisiert am 28.04.2010, zuletzt geprüft am 19.09.2012.

- 92) Qian F, Kruse U, Lichter P, Sippel AE (1995): Chromosomal localization of the four genes (NFIA, B, C, and X) for the human transcription factor nuclear factor I by FISH. In: *Genomics*. 1995 Jul 1;28(1):66-73., 1995.
- 93) Rajas, F.; Delhase, M.; La Hoya, M. de; Verdood, P.; Castrillo, J. L.; Hooghe-Peters, E. L. (1998): Nuclear factor 1 regulates the distal silencer of the human PIT1/GHF1 gene. In: *Biochem. J.* 333 (Pt 1), S. 77–84.
- 94) Rio, M.; Clech, L.; Amiel, J.; Faivre, L.; Lyonnet, S.; Le Merrer, M. et al. (2003): Spectrum of NSD1 mutations in Sotos and Weaver syndromes. In: *J. Med. Genet.* 40 (6), S. 436–440.
- 95) Roulet, E.; Bucher, P.; Schneider, R.; Wingender, E.; Dusserre, Y.; Werner, T.; Mermod, N. (2000): Experimental analysis and computer prediction of CTF/NFI transcription factor DNA binding sites. In: *J. Mol. Biol.* 297 (4), S. 833–848. DOI: 10.1006/jmbi.2000.3614.
- 96) Rupp, R. A.; Kruse, U.; Multhaup, G.; Göbel, U.; Beyreuther, K.; Sippel, A. E. (1990): Chicken NFI/TGGCA proteins are encoded by at least three independent genes: NFI-A, NFI-B and NFI-C with homologues in mammalian genomes. In: *Nucleic Acids Res.* 18 (9), S. 2607–2616.
- 97) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences*.
- 98) Schanze, Denny; Neubauer, Dorothée; Cormier-Daire, Valerie; Delrue, Marie-Ange; Dieux-Coeslier, Anne; Hasegawa, Tomonobu et al. (2014): Deletions in the 3' part of the NFIX gene including a recurrent Alu-mediated deletion of exon 6 and 7 account for previously unexplained cases of Marshall-Smith syndrome. In: *Human mutation* 35 (9), S. 1092–1100. DOI: 10.1002/humu.22603.
- 99) Schouten, Jan P.; McElgunn, Cathal J.; Waaijer, Raymond; Zwijnenburg, Danny; Diepvens, Filip; Pals, Gerard (2002): Relative quantification of 40 nucleic acid sequences by multiplex ligation-dependent probe amplification. In: *Nucleic Acids Res.* 30 (12), S. e57.
- 100) Sellner, Loryn N.; Taylor, Graham R. (2004): MLPA and MAPH: new techniques for detection of gene deletions. In: *Hum. Mutat.* 23 (5), S. 413–419. DOI: 10.1002/humu.20035.
- 101) Sharma, A. K.; Haldar, A.; Phadke, S.; Agarwal, S. S. (1994): Marshall-Smith syndrome: a distinct entity. In: *Indian Pediatr* 31 (9), S. 1098–1100.
- 102) Shaw, Adam C.; van Balkom, Inge D.C; Bauer, Mislen; Cole, Trevor R.P; Delrue, Marie-Ange; van Haeringen, Arie et al. (2010): Phenotype and natural history in Marshall-Smith syndrome. In: *American journal of medical genetics* 152 (11), S. 2714–2726.
- 103) Shaw, Christine J.; Lupski, James R. (2005): Non-recurrent 17p11.2 deletions are generated by homologous and non-homologous mechanisms. In: *Hum. Genet.* 116 (1-2), S. 1–7. DOI: 10.1007/s00439-004-1204-9.
- 104) Shimojima, Keiko; Okamoto, Nobuhiko; Tamasaki, Akiko; Sangu, Noriko; Shimada, Shino; Yamamoto, Toshiyuki (2015): An association of 19p13.2 microdeletions with Malan syndrome and Chiari malformation. In: *American journal of medical genetics. Part A* 167A (4), S. 724–730. DOI: 10.1002/ajmg.a.36959.
- 105) Siegenthaler, Walter (Hg.) (op. 2006): *Klinische Pathophysiologie*. 9. Aufl. Stuttgart, New York: Thieme, S. 33.
- 106) Singh, Sandeep K.; Wilczynska, Katarzyna M.; Grzybowski, Adrian; Yester, Jessie; Osrah, Bahiya; Bryan, Lauren et al. (2011): The unique transcriptional activation domain of nuclear factor-I-X3 is critical to specifically induce marker gene expression in astrocytes. In: *J. Biol. Chem.* 286 (9), S. 7315–7326. DOI: 10.1074/jbc.M110.152421.
- 107) Sotos, J. F.; Dodge, P. R.; Muirhead, D.; Crawford, J. D.; Talbot, N. B. (1964): Cerebral gigantism in childhood. A syndrome of excessively rapid growth and acromegalic features and a nonprogressive neurologic disorder. In: *N. Engl. J. Med.* 271, S. 109–116. DOI: 10.1056/NEJM196407162710301.

- 108) Sotos, Juan F. (2014): Sotos syndrome 1 and 2. In: *Pediatric endocrinology reviews : PER* 12 (1), S. 2–16.
- 109) Spitz, F. M. Salminen J. Demignon A. Kahn D. Daegelen and P. Maire: A combination of MEF3 and NFI proteins activates transcription in a subset of fast-twitch muscles. In: *Mol. Cell. Biol.* 17:656–666 1997.
- 110) Steele-Perkins, George; Butz, Kenneth G.; Lyons, Gary E.; Zeichner-David, Margarita; Kim, Heung-Joong; Cho, Moon-Il; Gronostajski, Richard M. (2003): Essential role for NFI-C/CTF transcription-replication factor in tooth root development. In: *Mol. Cell. Biol.* 23 (3), S. 1075–1084.
- 111) Stefancsik, Raymund; Sarkar, Satyapriya (2003): Relationship between the DNA binding domains of SMAD and NFI/CTF transcription factors defines a new superfamily of genes. In: *DNA Seq.* 14 (4), S. 233–239.
- 112) Tatton-Brown, Katrina; Douglas, Jenny; Coleman, Kim; Baujat, Genevieve; Cole, Trevor R. P.; Soma Das et al. (2005): Genotype-phenotype associations in Sotos syndrome: an analysis of 266 individuals with NSD1 aberrations. In: *Am. J. Hum. Genet.* 77 (2), S. 193–204. DOI: 10.1086/432082.
- 113) Tatton-Brown, Katrina; Rahman, Nazneen (2004): Clinical features of NSD1-positive Sotos syndrome. In: *Clin. Dysmorphol.* 13 (4), S. 199–204.
- 114) Tatton-Brown, Katrina; Rahman, Nazneen (2007): Sotos syndrome. In: *Eur. J. Hum. Genet.* 15 (3), S. 264–271. DOI: 10.1038/sj.ejhg.5201686.
- 115) Tatton-Brown K, Cole TRP Rahman N. (2004 Dec 17 [Updated 2012 Mar 8]): Sotos Syndrome. Hg. v. Bird TD Dolan CR et al. editors GeneReviews™ [Internet] Seattle (WA): University of Washington Seattle Pagon RA und 1993-. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1479/>, zuletzt geprüft am 29.01.2013.
- 116) Tei, Satoshi; Tsuneishi, Syuichi; Matsuo, Masafumi (2006): The first Japanese familial Sotos syndrome with a novel mutation of the NSD1 gene. In: *Kobe J Med Sci* 52 (1-2), S. 1–8.
- 117) Thomas, N. Simon; Durkie, Miranda; van Zyl, Berendine; Sanford, Richard; Potts, Gemma; Youngs, Sheila et al. (2006): Parental and chromosomal origin of unbalanced de novo structural chromosome abnormalities in man. In: *Human genetics* 119 (4), S. 444–450. DOI: 10.1007/s00439-006-0157-6.
- 118) van Balkom, I. D. C.; Shaw, A.; Vuijk, P. J.; Franssens, M.; Hoek, H. W.; Hennekam, R. C. M. (2011): Development and behaviour in Marshall-Smith syndrome: an exploratory study of cognition, phenotype and autism. In: *J Intellect Disabil Res* 55 (10), S. 973–987. DOI: 10.1111/j.1365-2788.2011.01451.x.
- 119) van Haelst, Mieke M.; Hoogeboom, Jeannette J. M.; Baujat, Genevieve; Brüggewirth, Hennie T.; van de Laar, Ingrid; Coleman, Kim et al. (2005): Familial gigantism caused by an NSD1 mutation. In: *Am. J. Med. Genet. A* 139 (1), S. 40–44. DOI: 10.1002/ajmg.a.30973.
- 120) Vidovic, Diana; Harris, Lachlan; Harvey, Tracey J.; Evelyn Heng, Yee Hsieh; Smith, Aaron G.; Osinski, Jason et al. (2015): Expansion of the lateral ventricles and ependymal deficits underlie the hydrocephalus evident in mice lacking the transcription factor NFIX. In: *Brain research* 1616, S. 71–87. DOI: 10.1016/j.brainres.2015.04.057.
- 121) Visser, Remco; Gijbbers, Antoinet; Ruivenkamp, Claudia; Karperien, Marcel; Reeser, H. Maarten; Breuning, Martijn H. et al. (2010): Genome-wide SNP array analysis in patients with features of sotos syndrome. In: *Horm Res Paediatr* 73 (4), S. 265–274. DOI: 10.1159/000284391.
- 122) Williams, D. K.; Carlton, D. R.; Green, S. H.; Pearman, K.; Cole, T. R. (1997): Marshall-Smith syndrome: the expanding phenotype. In: *J. Med. Genet.* 34 (10), S. 842–845.
- 123) Winship, I. M. (1985): Sotos syndrome--autosomal dominant inheritance substantiated. In: *Clin. Genet.* 28 (3), S. 243–246.

- 124) Xu, Hua; Uno, Jennifer K.; Inouye, Michael; Collins, James F.; Ghishan, Faye K. (2005): NF1 transcriptional factor(s) is required for basal promoter activation of the human intestinal NaPi-IIIb cotransporter gene. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 288 (2), S. G175-81. DOI: 10.1152/ajpgi.00396.2004.
- 125) Xu, M.; Osada, S.; Imagawa, M.; Nishihara, T. (1997): Genomic organization of the rat nuclear factor I-A gene. In: *J. Biochem.* 122 (4), S. 795–801.
- 126) Yoder, C. C.; Wiswell, T.; Cornish, J. D.; Cunningham, B. E.; Crumbaker, D. H. (1988): Marshall-Smith syndrome: further delineation. In: *South. Med. J.* 81 (10), S. 1297–1300.
- 127) Yoneda, Yuriko; Saitsu, Hiroto; Touyama, Mayumi; Makita, Yoshio; Miyamoto, Akie; Hamada, Keisuke et al. (2012): Missense mutations in the DNA-binding/dimerization domain of NFIX cause Sotos-like features. In: *J. Hum. Genet.* 57 (3), S. 207–211. DOI: 10.1038/jhg.2012.7.
- 128) Zechner, Ulrich; Kohlschmidt, Nicolai; Kempf, Olga; Gebauer, Konstanze; Haug, Karsten; Engels, Hartmut et al. (2009): Familial Sotos syndrome caused by a novel missense mutation, C2175S, in NSD1 and associated with normal intelligence, insulin dependent diabetes, bronchial asthma, and lipedema. In: *Eur J Med Genet* 52 (5), S. 306–310. DOI: 10.1016/j.ejmg.2009.06.001.
- 129) Zhang, Feng; Gu, Wenli; Hurles, Matthew E.; Lupski, James R. (2009): Copy number variation in human health, disease, and evolution. In: *Annual review of genomics and human genetics* 10, S. 451–481. DOI: 10.1146/annurev.genom.9.081307.164217.

Danksagung

Ich danke meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. med. Martin Zenker und seinen Mitarbeitern Herrn Dipl. Mol. Med. Denny Schanze und Frau Dr. med. Ina Schanze, die mir bei allen Problemen tatkräftig zur Seite standen.

Außerdem möchte ich mich auch bei dem gesamten Kollegium des Instituts für Humangenetik, besonders bei den Medizinisch-technischen Laboratoriumsassistenten der Molekulargenetik, ganz herzlich für die große Hilfe bei den Experimenten bedanken. Ein besonders lieber Dank gilt dabei Frau Ilka Kramer.

Erklärung

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

„Neue Mutationen des *NFIX*-Gens beim Marshall-Smith-Syndrom und *NFIX*-related-Overgrowth-Syndrom.“

im Institut für Humangenetik der Otto-von-Guericke- Universität Magdeburg

mit der Unterstützung durch Prof. Dr. med. Martin Zenker,

Dipl. Mol. Med. Denny Schanze,

Dr. med. Ina Schanze,

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.

Leipzig, 04.01.2017

Dorothee Neubauer

Lebenslauf

■ Persönliche Daten

Name: Neubauer
Vorname: Dorothee
Geburtsdatum: 10.10.1987
Geburtsort: Staßfurt
Nationalität: deutsch
Familienstand: ledig
Adresse: Brockhausstraße 8
PLZ/Ort: 04229 Leipzig

■ Schulbildung/Studium

10/2007 – 05/2014 Medizinstudium an der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
Abschluss: 2. Staatsexamen, Gesamtnote: 1,83
08/2000 – 07/2007 Dr.-Frank-Gymnasium Staßfurt
Abschluss: Abitur, Gesamtnote: 1,3
08/1998 – 07/2000 Sekundarschule „Hermann Kasten“ Staßfurt
08/1994 – 07/1998 Johann-Wolfgang-von-Goethe-Grundschule Staßfurt

■ Beruflicher Werdegang

02/2013 – 01/2014 Praktisches Jahr
1. Terial: Klinik für Anästhesiologie und Intensivmedizin, Klinikum Magdeburg gGmbH
2. Terial: Departement für Chirurgie, Kantonsspital Graubünden Chur, Schweiz
3. Terial: Klinik für Innere Medizin, Krankenhaus Jerichower Land gGmbH Burg
08/2014 – 08/2015 Assistenzärztin in der Klinik für Pneumologie und Kardiologie des Ev. Diakonissenkrankenhauses Leipzig
09/2015 – 10/2015 Promotionsarbeit
11/2015 – Assistenzärztin in der Klinik für Innere Medizin, HELIOS Klinik Leisnig

Leipzig, den 04.01.2017

Dorothee Neubauer

Verzeichnis der bisherigen wissenschaftlichen Veröffentlichungen

Schanze, Denny; Neubauer, Dorothée; Cormier-Daire, Valerie; Delrue, Marie-Ange; Dieux-Coeslier, Anne; Hasegawa, Tomonobu; Eva E. Holmberg; Rainer Koenig; Gabriele Krueger, Ina Schanze, Eva Seemanova, Adam C. Shaw, Julie Vogt, Marianne Volleth, André Reis, Peter Meinecke, Raoul C. M. Hennekam and Martin Zenker (2014): Deletions in the 3' part of the NFIX gene including a recurrent Alu-mediated deletion of exon 6 and 7 account for previously unexplained cases of Marshall-Smith syndrome. In: *Human mutation* 35 (9), S. 1092–1100. DOI: 10.1002/humu.22603.