Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck Direktor: Prof. Dr. med. E. Herting

Molekulargenetische Untersuchung des FOXF2-Gens bei Kindern mit primären, nicht hormonell bedingten Störungen der Geschlechtsentwicklung und Lippen-Kiefer-Gaumenspalte

Inauguraldissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Universität zu Lübeck -Aus der Medizinischen Fakultät-

vorgelegt von

Ulla Jochumsen aus Lüneburg

Lübeck 2006

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus

2. Berichterstatter: Priv.-Doz. Dr. med. Dr. med. dent. Dirk Hermes

Tag der mündlichen Prüfung:	21.09.2007
Zum Druck genehmigt. Lübeck, den	21.09.2007

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach -Dekan der Medizinischen Fakultät-

Inhaltsverzeichnis	Ι
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
1. Einleitung	1
1.1 Normale und pathologische Geschlechtsentwicklung	1
1.1.1 Geschlechtsdeterminierung und ihre Störungen	1
1.1.2 Geschlechtsdifferenzierung und ihre Störungen	4
1.1.3 Steroidhormonbiosynthese und ihre Störungen	6
1.1.4 Androgenresistenzsyndrom	10
1.2 Lippen-Kiefer-Gaumenspalten	11
1.2.1 Klassifikation	13
1.2.2 Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten	13
1.3 Identifikation neuer Kandidatengene für die Geschlechtsentwicklung	13
1.4 Forkhead-Gene	15
1.5 FOXF2	17
1.6 Fragestellung	19
2. Patienten, Material und Methoden	20
2.1 Patienten	20
2.1.1 Patientenkollektiv	20
2.1.2 Klinische Daten	21
2.2. Material	28
2.3 Methoden	32
2.3.1 DNA-Extraktion	32
2.3.2 DNA-Amplifikation	33
2.3.3 Agarosegelelektropherese	35
2.3.4 Restriktionsanalyse des Fragments 1/6	35
2.3.5 SSCP-Analyse	36
2.3.6 DNA-Sequenzierung	39

3. Ergebnisse

3.1 Veränderungen im Exon 1	41
3.1.1 Veränderung c.77(GCC)9_10	41
3.1.2 Veränderung c.121G>T; Ala41Ser	42
3.1.3 Veränderung c.262G>A; Ala88Thr	43
3.1.4 Veränderung c.904(GGC)5_6	45
3.2 Befunde im Exon 2	46
3.2.1 Veränderung c.1272C>T; Ser424Ser	46
3.2.2 Veränderung c.1284T>C; Tyr428Tyr	47
3.2.3 Veränderung 25*G>A	48
3.3 Übersicht über die molekulargenetischen Ergebnisse	49
4. Diskussion	52
4.1 Mathadiasha Aspalita	50
4.1 Methodische Aspekte	52
4.2 Die molekulargenetischen Ergebnisse:	55
Pathogene Mutationen oder Polymorphismen?	
4.3 Mit Mutationen in FOX-Genen assoziierte Krankheitsbilder	59
4.4 Andere syndromale Erkrankungen, die mit	63
Lippen-Kiefer-Gaumenspalte und Genitalfehlbildungen einhergehen	
4.5 Auswahl der Patienten	68
5. Zusammenfassung	71
6. Literaturverzeichnis	72

7. Danksagung

41

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungen	Seite
Abb. 1: Ablauf der Geschlechtsdeterminierung	2
Abb. 2: Entwicklung des männlichen und weiblichen äußeren Genitale	
aus dem indifferenten Stadium	6
Abb. 3: Übersicht über die Bildung der Steroidhormone	7
Abb. 4: Entwicklung des sekundären Gaumens in der siebten und zehnten	
Embryonalwoche	12
Abb. 5: cDNA-Microarray-Expressionsdaten von	
fünf AIS Patienten und neun Normalkontrollen	15
Abb. 6: Schematische Darstellung des FOXF2-Gens	17
Abb. 7: Fotografien der Genitalregion von Foxf2-Wildtypmäusen und Nullmutanten	1 8
Abb. 8: Darstellung der heterozygoten GGC-Tripletts nach Nukleinsäure 123	42
Abb. 9: Darstellung der Mutation c.121G>T, 121Ala41Ser	43
Abb. 10: Darstellung der heterozygoten Mutation c.262G>A; Ala88Thr	44
Abb. 11: Darstellung der Insertion eines GGC-Repeats nach Nukleinsäure 918	45
Abb. 12: Ergebnisse der direkten Sequenzierung des Exon2,	
Veränderung c.1272C>T; Ser424Ser	46
Abb. 13: Veränderung c.1284T>C; Tyr428Tyr	47
Abb. 14: Veränderung 25*G>A	48
Abb. 15: Zusammenfassung der Sequenzänderungen	50
Abb. 16: Kurvenüberlagerung durch sogenanntes "Hintergrundrauschen"	54

Tabellen

Tabelle 1: Kasuistiken der Patienten	22
Tabelle 2: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes	34
Tabelle 3: PCR-Programm	34
Tabelle 4: PCR-Bedingungen für die verschiedenen Abschnitte des FOXF2-Gens	34
Tabelle 5. Zusammensetzung der SSCP-Gele 1	37
Tabelle 6: Ablauf der Silberfärbung der SSCP-Gele	39
Tabelle 7: PCR-Ansatz	40
Tabelle 8: PCR-Programm	40

Tabelle 9: Zusammenfassung der molekulargenetischen Befunde	49
Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzänderung 904(GCC)5_6	49
Tabelle 11: Übersicht der Forkhead-Gene, bei denen für den Menschen	
pathogene Mutationen gefunden wurden	61
Tabelle 12: Auswirkungen von Mutationen in Fox-Genen auf die Maus	62
Tabelle 13: Auswahl von syndromalen Erkrankungen, die mit der Kombination	
von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Genitalfehlbildungen einhergehen	64

Abkürzungsverzeichnis

A:	Adenin
Ala:	Alanin
Asn:	Asparagin
Arg:	Arginin
Asp:	Aspartat
AGS:	Adrenogenitales Syndrom
AMH:	Anti-Müller-Hormon
AR:	Androgenrezeptor
BMP4:	Bone Morphogenetic Protein 4
bp:	Basenpaare
3βHSD:	3β -Hydroxysteroiddehydrogenase
17βHSD:	17β -Hydroxysteroiddehydrogenase
C:	Cytosin
cDNA:	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
Cys:	Cystein
DAX1:	Dosage-Sensitive Sex Reversal-Adrenal Hypoplasia
	Congenita Critical Region on the X Chromosome Gene 1
ddNTPs:	Didesoxynucleosidtriphosphat
DHH:	Desert Hedgehog
DHT:	Dihydrotestosteron
DMSO:	Dimethylsulfoxide
dNTPs:	Desoxyribonukleotide
EDTA:	Ethylene Diamine Tetraacetic Acid
ESPED:	Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in
	Deutschland
FMR1-Gen:	Fragile Site Mental Retardation 1 Gene
FOX:	Forkhead-Box
FTZ1F1:	Drosophila Fushi-Tarazu factor1
G:	Guanin
Gln:	Glutamin
Glu:	Glutamat

Gly:	Glycin
hCG:	humanes Choriongonadotropin
HGV:	Human Genome Variation Society
His:	Histidin
HOXA13:	Homeobox A13
Leu:	Leucin
LH:	luteinisierendes Hormon
Lys:	Lysin
MC:	Melanincortin-Rezeptor
MSX1:	Msh-related homeobox gene 1
Met:	Methionin
OMIM:	Online Mendelian Inheritance in Man
P450scc:	P450 side chain cleavage
PCR:	Polymerase-Kettenreaktion
Phe:	Phenylalanin
Pro:	Prolin
ROR2:	tyrosine kinase-like orphan receptor 2
RT-PCR:	Reverse Transkriptase-Polymerase-Kettenreaktion
SDS:	Sodiumdodecylsulfat
Ser:	Serin
SF1:	Steroidogenic Factor1
SOX9:	SRY related HMG box 9
SRY:	Sex determining Region of the Y-chromosom
SSCP:	Single-Strand Conformation Polymorphism
StAR:	Steroidogenic acute regulatory protein
Т:	Thymin
TBP:	TATA-binding protein
TBX5:	T-Box 5
TEMED:	Tetramethylethylendiamin
TFIIB:	Transkriptionsfaktor IIB
TDF:	Testis Determing Factor
Thr:	Threonin
Trp:	Tryptophan

Tyr:	Tyrosin
Val:	Valin
WAGR:	Wilms-Tumor, Aniridie, genitale Anomalien und mentale
	Retardierung
WNT2/4:	Wingless-type MMTV integration site family member 2/4
WT1:	Wilms-Tumor1

1. Einleitung

Die Geschlechtsentwicklung des Menschen ist ein komplexer Vorgang. Die Geschlechtsorgane sind für die Reproduktionsfähigkeit des Menschen wichtig. Darüber hinaus bildet die Zugehörigkeit zum männlichen oder weiblichen Geschlecht einen bedeutenden Baustein der Identität eines Menschen. Es kann zwischen chromosomalem, gonadalem und phänotypischem Geschlecht unterschieden werden.

Die Geschlechtsentwicklung kann auf verschiedenen Ebenen gestört werden. Die sich daraus ergebenden klinischen Folgen sind vielfältig und hängen mit der Art der Störung, dem Zeitpunkt des Auftretens und weiteren teilweise noch unbekannten Faktoren zusammen (Hiort und Holterhus, 2000).

Die Aufdeckung der genetischen Grundlagen der Geschlechtsentwicklung und ihrer Störungen trägt dazu bei, die zugrunde liegenden Mechanismen besser zu verstehen.

Darüber hinaus helfen diese Erkenntnisse aber auch bei der Diagnostik und dem Umgang mit den betroffenen Patienten.

1.1 Normale und pathologische Geschlechtsentwicklung

Die Geschlechtsentwicklung kann in Geschlechtsdeterminierung und Geschlechtsdifferenzierung eingeteilt werden.

1.1.1 Geschlechtsdeterminierung und ihre Störungen

Als Geschlechtsdeterminierung wird der Prozess bezeichnet, der über die bipotente Gonadenanlage zur Entwicklung von Hoden oder Ovarien führt. An dieser Entwicklung ist eine Kaskade von geschlechtsdeterminierenden Genen beteiligt (Lim und Hawkins, 1998). Durch die Befruchtung der Eizelle mit einem Spermium wird das chromosomale Geschlecht des Embryos festgelegt. Dabei stellt die Kombination 46,XY den männlichen und 46,XX den weiblichen Chromosomensatz dar.

Nach der Befruchtung bildet sich beim Embryo die indifferente Gonadenanlage aus. Dieser Vorgang läuft unabhängig vom chromosomalen Geschlecht ab. An diesem Prozess sind mehrere Faktoren beteiligt (siehe Abb. 1).



Abb. 1: Ablauf der Geschlechtsdeterminierung. Aus dem sich differenzierenden Mesoderm entwickelt sich die bipotente Gonadenanlage. Aus dieser gehen entweder Hoden oder Ovarien hervor. Die Entwicklungsschritte der Geschlechtsdeterminierung werden von mehreren Genen beeinflusst.

WT1: Wilms-Tumor1, SF1: Steroidogenic Factor1, SOX9: SRY related HMG box 9, SRY: Sex determining Region of the Y-chromosom, DHH: Desert Hedgehog, DAX1: Dosage-Sensitive Sex Reversal-Adrenal Hypoplasia Congenita Critical Region on the X Chromosome Gene 1, WNT4: Wingless-type MMTV integration site family member 4

Das WT1-Gen (Wilms-Tumor1-Gen) ist nicht nur für die Genitalentwicklung wichtig. So können Mutationen in diesem Gen das Denys-Drash Syndrom (Wilms-Tumor, Nephropathie und genitale Anomalien), das Frasier Syndrom (Gonadoblastom) und das WAGR Syndrom (Wilms-Tumor, Aniridie, genitale Anomalien und mentale Retardierung) verursachen (Pelletier et al., 1991; Coppes et al., 1993; Kreidberg et al., 1993; Little et al., 2005).

Das Protein SF1 (Steroidogenic Factor1) ist das Produkt des FTZ1F1-Gens (Drosophila Fushi-Tarazu factor1) und fungiert als Hormonrezeptor. SF1 spielt nicht nur eine Rolle bei der Entwicklung der bipotenten Gonadenanlage, sondern beeinflusst auch die später stattfindende männliche Geschlechtsdifferenzierung (Parker et al., 1999).

Bis jetzt sind nur wenige Fälle beschrieben, bei denen Mutationen im FTZF1 Gen des Menschen gefunden wurden. Bei einem Kind mit einem XY Chromosomensatz führte die Mutation zu einem weiblichen Phänotyp mit weiblichem inneren Genitale und Gonadendysgenesie (gonadal streaks). Außerdem zeigten die betroffenen Menschen eine primäre Nebenniereninsuffizienz (Achermann et al., 1999; Oziski et al., 2003).

Aus der bipotenten Gonadenanlage entwickeln sich entweder Hoden oder Ovarien. Eine Schlüsselrolle kommt hierbei dem Y-Chromosom zu, genauer gesagt dem SRY-Gen (Sex Determing Region of the Y-Chromosom), welches für den TDF (Testis Determing Factor) kodiert (zusammengefasst von Knower et al., 2003). TDF fungiert als Transkriptionsfaktor und initiiert über eine Genkaskade die männliche Entwicklung (Übersicht bei Nef und Parada, 2000).

Mutationen im Bereich des SRY-Gens führen bei Individuen mit XY Karyotyp zu einem komplett weiblichen Phänotyp. Auch die Entwicklung von gemischter Gonadendysgenesie ist in diesem Zusammenhang beschrieben worden (Hiort und Holterhus, 2000).

Für die normale Entwicklung der Testes sind jedoch weitere Faktoren von entscheidender Bedeutung. Das autosomale SOX9-Gen (SRY related HMG box 9) ist sowohl für die Hodenentwicklung des Mannes, als auch für die Skelettentwicklung bei beiden Geschlechtern wichtig. Mutationen in diesem Gen führen bei einem großem Teil der XY Patienten zur Gonadendysgenesie in Kombination mit Skelettfehlbildungen, bezeichnet als campomele Dysplasie (Knower et al., 2003).

Ein weiteres Gen, welches eine wichtige Rolle in der Geschlechtsdeterminierung zu spielen scheint, ist das DHH-Gen (Desert hedgehog). Im Jahr 2000 veröffentlichten Umehara et al. den ersten Bericht über eine homozygote Missensemutation bei einem Patienten mit 46,XY Karyotyp mit partieller Gonadendysgenesie und begleitender Neuropathie (Umehara et al., 2000). Bei drei weiteren Patienten mit kompletter Gonadendysgenesie konnten Canto et al. Mutationen im DHH-Gen finden (Canto et al., 2004).

Bis vor kurzer Zeit wurde angenommen, dass die Entwicklung der Gonadenanlage in Ovarien ein eher passiver Prozess ist, der in Abwesenheit von SRY automatisch abläuft. Neuere Untersuchungen deuten darauf hin, dass der Differenzierung der Gonaden zu Ovarien eine komplexe Interaktion vieler, zum größten Teil noch unbekannter Faktoren zugrunde liegt (Ross und Capel, 2005).

Das DAX1-Gen (Dosage-Sensitive Sex Reversal-Adrenal Hypoplasia Congenita Critical Region on the X Chromosome, Gene 1) spielt sowohl eine wichtige Rolle bei der Entwicklung der Nebennieren als auch bei der Determinierung der Gonadenanlagen (Mizusaki et al., 2003). DAX-1 wird während der männlichen Entwicklung durch das SRY-Gen unterdrückt. Die Duplikation des Gens DAX-1 führt bei Individuen mit XY Karyotyp zu einem weiblichen Phänotyp. Bei Mutationen in diesem Gen kommt es beim chromosomal männlichen Geschlecht zu einem hypogonadotropen Hypogonadismus und zur Nebennierenhypoplasie (Fleming und Vilain, 2004).

In seiner Gesamtheit ist der Prozess der Geschlechtsdeterminierung mit den hierfür wichtigen Genen noch nicht vollständig verstanden. Untersuchungen an Tiermodellen konnten weitere Faktoren identifizieren, die für die Geschlechtsdeterminierung von Bedeutung sind (Kobayashi und Behringer, 2003; Kobayashi et al., 2004; MacLaughlin und Donahoe, 2004; Ross und Capel, 2005).

Aus der bipotenten Gonadenanlage entstehen unter Mitwirkung der oben genannten Faktoren in der 7. Woche nach erfolgter Befruchtung die Hoden. Ist dagegen das SRY-Gen nicht vorhanden, entwickeln sich ab der 10. Woche Ovarien (Sinnecker, 1999). Damit ist die Geschlechtsdeterminierung abgeschlossen und die Geschlechtsdifferenzierung beginnt.

1.1.2 Geschlechtsdifferenzierung und ihre Störungen

Als Geschlechtsdifferenzierung wird die Ausdifferenzierung der inneren und äußeren Genitalorgane bezeichnet. Dieser Prozess steht unter dem Einfluss verschiedener Geschlechtshormone.

Anfangs sind sowohl beim männlichen als auch beim weiblichen Embryo auf jeder Seite je zwei Genitalgänge vorhanden. Aus den Wolff-Gängen (auch Urnierengänge genannt) entwickeln sich beim männlichen Embryo Nebenhoden, Samenleiter und Bläschendrüse. Beim weiblichen Embryo bilden sich aus den Müller-Gängen der Uterus, die Tuben und der obere Teil der Vagina.

Beim männlichen Embryo bilden sich unter dem Einfluss von SRY Sertoli-Zellen aus, die das Anti-Müller-Hormon (AMH) produzieren. AMH bewirkt über zwei verschiedene Rezeptoren die Rückbildung der Müller-Gänge (Josso et al., 2001).

Die Bildung von AMH wird durch SF1 und SOX9 stimuliert (de Santa Barbara et al., 1998; Knower et al., 2003).

Eine unzureichende Wirkung von AMH kann sowohl durch eine verminderte Bildung (z.B. durch eine verminderte Anzahl an Sertoli-Zellen), als auch durch eine gestörte Funktion (durch Mutationen im AMH Gen oder dem entsprechenden AMH-Rezeptor Typ II)

bedingt sein (Lee und Donahoe, 1993; Hiort und Holterhus, 2000). Beides kann zur Persistenz von Müllerschen Strukturen (Uterus und Tuben) bei 46,XY Individuen führen. Da hierbei die Steroidhormonsynthese unbeeinflusst bleibt, entwickelt sich das äußere Genitale unauffällig (Hiort und Holterhus, 2000).

Die Vorstellung, dass bei weiblichen Individuen allein durch das Fehlen von AMH eine Differenzierung der Müller-Gänge stattfindet, erwies sich als nicht zutreffend. So führt eine Mutation des Wnt-4-Gens bei männlichen Mäusen zu keiner Störung der Geschlechtsentwicklung. Bei weiblichen Mäusen dagegen kommt es zu keiner Entwicklung der Müllerschen Strukturen bei Persistenz der Wolffschen Gänge (Vainio et al., 1999). Die Persistenz der Wolffschen Strukturen scheint durch erhöhte Androgenspiegel bedingt zu sein, die von den Ovarien dieser mutierten Mäuse gebildet werden (Heikkilä et al., 2005). Biason-Lauber et al. konnten eine Mutation im WNT-4-Gen bei einer Frau mit Virilisierungserscheinungen und Fehlen der Müllerschen Strukturen nachweisen (Biason-Lauber et al., 2004). Dies lässt vermuten, dass dem Wnt-4-Gen eine essentielle Rolle bei der Entwicklung der Müller-Gänge zukommt (Heikkilä et al., 2005).

In den Leydig-Zellen werden die androgenen Steroidhormone gebildet. Die Stimulation für die Androgenbildung erhalten die Leydig-Zellen dabei anfangs über das von der Plazenta gebildete humane Choriongonadotropin (hCG). Später übernimmt das vom Feten selbst gebildete luteinisierende Hormon (LH) diese Aufgabe. Sowohl hCG als auch LH entfalten ihre Wirkung dabei über den LH-Rezeptor (LHR) (Stavrou et al., 1998).

Mutationen im für den LH-Rezeptor kodierenden Gen können die Funktion dieses Rezeptors stark beeinträchtigen und zu einer Resistenz gegenüber hCG und LH führen. Die Folge ist eine unzureichende Stimulation der Androgensynthese (Themmen und Huhtaniemi, 2000). Es kommt zu einer Leydig-Zellhypoplasie und zu einer gestörten Entwicklung der äußeren männlichen Geschlechtsorgane. Häufig resultiert sogar ein phänotypisch weibliches Geschlecht (Stavrou et al., 1998; Sinnecker, 1999).

Bei ausreichender Stimulation der Leydig-Zellen wird von diesen Testosteron gebildet. Das Testosteron ist essentiell für die Differenzierung der Wolff-Gänge. Außerdem reguliert es die Gonadotropinausschüttung und induziert die Spermatogenese. Testosteron wird im peripheren Gewebe zum Teil durch das Enzym 5 α -Reduktase Typ II in das potentere Hormon 5 α -Dihydrotestosteron (DHT) umgewandelt. DHT bewirkt die Virilisierung des männlichen äußeren Genitale und die sexuelle Reifung in der Pubertät.



Abb. 2: Entwicklung des männlichen und weiblichen äußeren Genitale aus dem indifferenten Stadium.

A: Indifferentes Stadium eines ca. 6 Wochen alten menschlichen Embryos.

B: Etwa 10 Wochen alter männlicher Embryo. Die Urethralfalten werden noch durch den Urogenitalspalt getrennt.

C: Verhältnisse beim männlichen Neugeborenen. Die Urethralfalten und die Skrotalwülste sind verschmolzen.

5 Monate alter weiblicher Fetus (**D**) und Neugeborenes (**E**): Die Urethralfalten verschmelzen nicht, sondern bilden die Labia minora. Die Labioskrotalwülste entwickeln sich zu den Labia majora.

(Modifiziert nach Sadler 1998)

1.1.3 Steroidhormonbiosynthese und ihre Störungen

Die Androgenbiosynthese findet in den Leydig-Zellen des Hodens, in der Nebennierenrinde und im Ovar statt. Die Bildung der Androgene ist dabei mit der Bildung der Mineralo- und Glukokortikoide eng gekoppelt. Gemeinsames Ausgangssubstrat ist das Cholesterin (siehe Abb. 3).



Abb. 3: Übersicht über die Bildung der Steroidhormone. Aus Cholesterin als Ausgangssubstrat werden über mehrere Reaktionsschritte die Mineralo- und Glukokortikoide und die Sexualhormone gebildet.

Bei Störungen der Steroidhormonbiosynthese kann daher die Bildung aller drei Steroidhormongruppen oder nur die Bildung einzelner Steroidhormone betroffen sein.

Der Begriff Adrenogenitales Syndrom (AGS) bezeichnet streng genommen nur Störungen der Cortisolsynthese, die kompensatorisch mit einer vermehrten Bildung von Androgenen einhergehen. Häufig werden aber auch andere Enzymopathien, die zu gestörter adrenaler Steroidsynthese und gesteigerter Bildung von Androgenen führen, als AGS bezeichnet (Dörr, 1999).

Die Steroidhormonbiosynthese findet in den Mitochondrien statt. Durch das aktive Transporterprotein StAR (Steroidogenic acute regulatory protein) gelangt das Cholesterin durch die innere Mitochondrienmembran zum Syntheseort.

Defekte im StAR-Gen führen zu einer schweren Beeinträchtigung der Steroidhormonbiosynthese und durch den Anstau von Cholesterin zu einer angeborenen Lipoidhyperplasie der Nebennieren. Die Virilisierung von 46,XY Individuen ist dadurch gestört. Dass es trotzdem zu einer geringen Bildung von Steroidhormonen in der Fetalzeit kommt ist damit zu erklären, dass in der Plazenta Steroidhormone StAR-unabhängig gebildet werden (Bose et al., 1996; Bose et al., 2000).

Der erste enzymatisch katalysierte Schritt in der Steroidhormonbiosynthese ist die Umwandlung von Cholesterin in Pregnenolon durch das mitochondriale Enzym P450scc. Das kodierende Gen wird als CYP11A1 bezeichnet. Lange Zeit wurde davon ausgegangen, dass ein Defekt im Enzym P450 mit dem Leben nicht vereinbar sei. Tajima et al. berichteten 2001 von einem Fall mit 46,XY Chromosomensatz, bei dem eine heterozygote Mutation im Gen P450scc zu einem weiblichen Phänotyp und Nebenniereninsuffizienz führte (Tajima et al., 2001). Der Bericht über eine erste homozygote Mutation widerlegt das oben genannte Paradigma und legt nahe, dass embryofetale Mechanismen existieren müssen, die auch unter vollständigem Funktionsverlust von P450scc eine gewisse lebensnotwendige Steroidhormonbiosynthese aufrecht erhalten (Hiort et al., 2005).

Das mikrosomale Enzym CYP17 (Cytochrom P450c17) besitzt sowohl Hydroxylaseaktivität als auch 17/20-Lyaseaktivität.

Mit seiner 17 α -Hydroxylase-Aktivität katalysiert es sowohl die Umwandlung von Pregnenolon zu 17-Hydroxypregnenolon als auch die Umwandlung von Progesteron zu 17-Hydroxyprogesteron. Mit seiner 17/20-Lyase-Aktivität führt es die Kaskade weiter und wandelt 17-Hydroxypregnenolon in Dehydroepiandrosteron und 17-Hydroxyprogesteron zu Androstendion um (siehe Abbildung 3). Mutationen im CYP17-Gen können sowohl die 17 α -Hydroxylase-Aktivität und 17/20-Lyase-Aktivität, als auch in seltenen Fällen isoliert die 17/20-Lyase-Aktivität betreffen (Biason-Lauber et al., 1997). Das klinische Bild betroffener chromosomal männlicher Individuen reicht von phänotypisch weiblichem äußeren Genitale mit blind endender Vagina bis zum männlich erscheinenden Phänotyp mit Hypospadie und Mikropenis. Der Anstau von Vorstufen des Mineralokortikoids Aldosteron führt durch Natrium- und Wasserretention zu einem Hypertonus mit Hypernatriämie, Hypokaliämie und Alkalose (Sinnecker, 1999; di Cerbo et al., 2002).

Ein drittes Enzym, welches die Biosynthese sowohl der Sexualhormone als auch der Gluko- und Mineralokortikoide beeinflusst, ist die 3β -Hydroxysteroiddehydrogenase (3β -HSD).

Die 3 β -HSD wandelt Pregnenolon in Progesteron, 17-Hydroxypregnenolon in 17-Hydroxyprogesteron, Dehydroepiandrosteron in Androstendion und Androstendiol in Testosteron um (siehe Abb. 3).

Von der 3β-HSD sind zwei Isoenzyme bekannt, Typ I und II, die sich in ihrem Expressionsmuster und ihrer katalytischen Effektivität unterscheiden (Penning, 1997).

Mutationen sind für das Isoenzym Typ II nachgewiesen worden, die bei den betroffenen Kindern zu einer angeborenen Nebennierenhyperplasie mit oder ohne Salzverlustsyndrom führen. Bei XY Neugeborenen treten Virilisierungsstörungen, bei XX Neugeborenen eine vermehrte Virilisierung auf (Penning, 1997). Diese entsteht durch das für die Δ 5-Vorstufen wesentlich affinere 3 β -HSD Typ I Isoenzym, also durch periphere Konversion.

Die 21-Hydroxylase katalysiert die Bildung von 11-Desoxycorticosteron aus Progesteron und 11-Desoxycortisol aus 17-Hydroxyprogesteron. Defekte im kodierendem CYP21-Gen sind die häufigste Ursache für das Adrenogenitale Syndrom (Dörr, 1999). Durch die gestörte Cortisolsynthese kommt es zur Anhäufung von Vorstufen des Cortisols, die stattdessen in Androgene umgewandelt werden. Begleitend kann ein Salzverlustsyndrom auftreten. XX Individuen virilisieren schon in utero unter dem Überschuss an Androgenen. Die Genitalentwicklung männlicher Neugeborener ist anfangs unauffällig, durch die erhöhten Androgenspiegel kommt es im Verlauf aber zu einer Pseudopubertas praecox (Dörr, 1999).

Später in der Androgensynthese auftretende Enzymdefekte beeinflussen die Synthese der Mineralo- und Glukokortikoide dagegen nicht.

Die Umwandlung von Androstendion in Testosteron wird von dem Enzym 17 β -Hydroxysteroiddehydrogenase (17 β -HSD) katalysiert. Von der 17 β -HSD gibt es mehrere Isoenzyme, wobei im Hodengewebe vor allem 17 β -HSD3 exprimiert wird (Twesten et al., 2000). Störungen des Enzyms 17 β -HSD3 führen bei chromosomal männlichen Individuen zu schweren Virilisierungsstörungen mit häufig phänotypisch weiblichem äußeren Genitale bei vorhandenem männlichen inneren Genitale (Penning, 1997; Twesten et al., 2000).

Die Umwandlung von Testosteron in das potentere Androgen Dihydrotestosteron (DHT) wird im Genitalgewebe durch das Enzym 5α-Reduktase Typ II vermittelt. Defekte dieses Enzyms führen bei XY-Neugeborenen in der Regel zu einem vollständigen oder zumindest vornehmlich weiblichen Phänotyp. Während der Pubertät kommt es jedoch durch steigende Testosteronspiegel zu einer deutlichen Virilisierung des Genitales (Hiort et al.,

1999). Die Differenzierung der Wolffschen Strukturen findet DHT-unabhängig statt und verläuft daher ungestört (Sinnecker, 1999).

1.1.4 Androgenresistenzsyndrom

Neben Störungen der Geschlechtsdifferenzierung aufgrund von Defekten in der Androgensynthese kann auch die Wirkung auf die Zielzellen gestört sein.

Sowohl Testosteron als auch DHT entfalten ihre Wirkung über den Androgenrezeptor (AR). Mutationen im Bereich des auf dem X-Chromosom lokalisierten AR-Gens können die Funktion des ARs beeinträchtigen.

Bei einem vollständigen Funktionsverlust des ARs resultiert eine komplette Androgenresistenz (früher auch als testikuläre Feminisierung bezeichnet). Betroffene XY-Individuen zeigen einen äußerlich weiblichen Phänotyp, Hodengewebe ist vorhanden, jedoch weder Müller- noch Wolff-Gänge. Durch die hohen Testosteronspiegel wird während der Pubertät vermehrt Testosteron in Estradiol umgewandelt, so dass eine normale Brustentwicklung resultiert (zusammengefasst von Hiort, 1998 und Hiort et al., 1999).

Ist die Funktion des ARs nur unvollständig beeinträchtigt, so resultiert eine partielle Androgenresistenz. Klinisch besteht eine ausgeprägte Varianz von einem fast vollständig weiblichen Genitale bis hin zur isolierten Hypospadie (Ahmed et al., 2000; Lim et al., 2000).

Die vorangegangene Darstellung soll einen Überblick über die wichtigsten Punkte der Geschlechtsentwicklung geben.

Eingegangen wurde nur auf Störungen, die sich auf einen bestimmten Genlokus zurückführen lassen. Darüber hinaus können Störungen der Geschlechtsentwicklung andere Ursachen zugrunde liegen, wie zum Beispiel numerische Chromosomenaberrationen beim Ulrich-Turner-Syndrom und Klinefelter-Syndrom (Hughes et al., 2006). Mittlerweile sind viele Faktoren, die mit einer gestörten Geschlechtsentwicklung einhergehen, bekannt. Dennoch ist der komplexe Vorgang der Geschlechtsdeterminierung und -differenzierung längst nicht vollständig geklärt.

So kann immer noch bei ungefähr 75% der Patienten mit unterschiedlichem chromosomalem und phänotypischem Geschlecht keine eindeutige Ursache gefunden werden (Vilain, 1998).

Auffällig ist weiterhin, dass bei einem Teil der Patienten mit ungeklärter Störung der Geschlechtsentwicklung auch Fehlbildungen anderer Körperteile vorliegen. Dies lässt vermuten, dass es genetische Faktoren geben muss, die Einfluss auf die Entwicklung mehrerer Organsysteme nehmen, zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Entwicklung wirksam sind und die Geschlechtsentwicklung hormon*un*abhängig in ihren frühen embryonalen Anlagen beeinflussen.

Eine unter der Schirmherrschaft der ESPED (Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland) von 2000 bis 2002 durchgeführte epidemiologische Studie sollte unter anderem Aufschluss über die Rolle von assoziierten Fehlbildungen bei Störungen der Geschlechtsentwicklung geben (Lanz, 2004). Von den 80 in die Studie eingeschlossenen Neugeborenen wurde die Frage nach weiteren Fehlbildungen in 35 Fällen (entspricht 43,8 % der Fälle) positiv beantwortet. Am häufigsten waren dabei mit 17,5% die Nieren betroffen, gefolgt von Fehlbildungen der Extremitäten (12,5%) und des Gehirns (8,8%).

Unter weiteren Fehlbildungen fanden sich insbesondere isolierte Gaumenspalten (6,3%) und komplexe Fehlbildungssyndrome (13,8%) (Lanz, 2004). Da die Fallzahl relativ gering ist (insgesamt 80 Fälle), lassen sich daraus natürlich nur schwer Aussagen über die Inzidenz ableiten. Der hohe Anteil von assoziierten Fehlbildungen ist auf jeden Fall bemerkenswert und war bislang nicht bekannt.

1.2 Lippen -Kiefer-Gaumenspalten

Gesichtsspalten gehören zu den häufigsten Fehlbildungen des Menschen. Die Häufigkeit wird mit etwa 1 pro 500 bis 1 pro 2500 Geburten (Schutte und Murray, 1999; Wilkie und Moriss-Kay, 2001) angegeben. Lippen-Kiefer-Gaumenspalten beeinträchtigen unter anderem die Gesichtszüge und die Sprachbildung und stellen damit für die Betroffenen sowohl eine starke körperliche als auch eine psychosoziale Belastung dar.

Die Entwicklung des menschlichen Gesichts beginnt am Ende der 4.Woche mit der Ausbildung von Gesichtswülsten, die vor allem aus Neuralleistenmesenchym bestehen oder vom 1. Schlundbogen abstammen. Es bildet sich auf jeder Seite ein Unter- und ein Oberkieferwulst und medial ein Stirnfortsatz. In der 5. Woche bildet sich die sogenannte Riechgrube, die von einem medialen und einem lateralen Nasenwulst umgeben ist. Die Oberkieferwülste wachsen in den folgenden zwei Wochen und drängen damit die medialen Nasenwülste weiter nach medial, so dass diese sich in der Mittellinie berühren. Die Spalten zwischen den medialen Nasenwülsten und den Oberkieferwülsten gehen verloren und es entsteht die Oberlippe.

Aus den medialen Nasenwülsten entsteht aber nicht nur ein Teil der Oberlippe, sondern auch ein Oberkieferanteil, in dem die vier Schneidezähne sitzen und ein dreieckiges Stück Gaumen, der auch als primärer Gaumen bezeichnet wird.

Der Hauptanteil des definitiven knöchernen Gaumens wird aber von den Gaumenplatten gebildet. Die Gaumenplatten entwickeln sich in der 6. Woche aus den Oberkieferwülsten. In der 7. Woche verlagert sich die Zunge nach unten, die Gaumenplatten nehmen eine horizontale Lage ein und verschmelzen in der Mittellinie (siehe Abb. 4).



Abb. 4: Entwicklung des sekundären Gaumens in der siebten (A) und zehnten (B) Embryonalwoche. anfangs Die vertikal orientierten Gaumenplatten nehmen nach Verlagerung der Zunge nach unten eine horizontale Lage ein und verschmelzen. Es entsteht der knöcherne sekundäre Gaumen. (Modifiziert nach Wilkie et al. 2001)

Der Gaumen wird also zu einem kleinen Teil aus den medialen Nasenwülsten (primärer Gaumen) und zum größeren Teil aus den Gaumenplatten gebildet (sekundärer Gaumen). Primärer und sekundärer Gaumen treffen auf Höhe des Foramen incisivum aufeinander (zusammengefasst nach Sadler, 1998).

1.2.1 Klassifikation

Die Einteilung der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten kann nach verschiedenen Aspekten erfolgen. Die Einteilung in vordere, hintere und kombinierte Spaltbildung mit dem Foramen incisivum als Grenze leitet sich von der embryonalen Entwicklung ab. Zu den vorderen Spaltbildungen zählen die seitliche Lippenspalte, die Oberkieferspalte und zwischen sekundärem und primärem Gaumen liegende Spalten. Die vorderen Spalten entstehen durch unvollständige Verschmelzung der Oberkieferwülste mit den medialen Nasenwülsten. Bei ausbleibender Fusion der beiden Gaumenplatten entstehen hintere Gaumenspalten. Hierzu zählen die hinteren medianen Gaumenspalten und die gespaltene Uvula. Eine dritte Gruppe stellen Spaltbildungen dar, die sowohl hinter als auch vor dem Foramen incisivum liegen (zusammengefasst nach Sadler, 1998).

1.2.2 Ätiologie der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten

Die Ätiologie ist komplex, der größte Anteil (ca. 70%) der Lippen-Kiefer-Gaumenspalten tritt ohne begleitende Fehlbildungen auf (Wilkie und Moriss-Kay, 2001; Stanier und Moore, 2004), in den übrigen Fällen liegen zusätzliche, häufig komplexe Fehlbildungen vor.

Zu den Ursachen von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten zählen Chromosomenaberrationen, teratogen wirkende Substanzen und Umweltfaktoren (Stanier und Moore, 2004). Bei Fällen von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten mit begleitenden Fehlbildungen liegen häufig syndromale Erkrankungen unbekannter Ursache vor (Tolarova und Cervenka, 1998). Auch Einzelgendefekte als Ursache für Lippen-Kiefer-Gaumenspalten sind bekannt. So führen Mutationen im Homeobox-Gen MSX1 (Msh-related homeobox gene 1) bei betroffenen Patienten zu Lippen- und Gaumenspalten in Kombination mit Agenesie einzelner Zähne (van den Boogaard et al., 2000; De Muynck et al., 2004).

Für die Gesichtsentwicklung relevante Gene stellen wichtige Kandidatengene dar und sind Gegenstand aktueller Forschung (Übersicht bei Lidral et al., 1998; Wilkie und Moriss-Kay, 2001; Stanier und Moore, 2004).

1.3 Identifikation neuer Kandidatengene für die Geschlechtsentwicklung

Um weitere Gene zu identifizieren, die die Geschlechtsentwicklung beeinflussen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. Durch die Erzeugung von Knock-out-Mäusen lassen sich gezielt Gene zerstören und die Auswirkungen auf den Organismus Maus untersuchen.

Mit der Microarray-Technik besteht dagegen die Möglichkeit das Expressionsmuster von Tausenden von Genen gleichzeitig zu untersuchen (Hegde et al., 2000). Das Wissen wann und wo ein Gen exprimiert wird, liefert dabei wichtige Hinweise über seine Bedeutung im Organismus.

Diese Technik benutzten auch Holterhus et al. 2003 mit dem Ziel, mehr Information über die Rolle des Androgenrezeptors in der menschlichen Geschlechtsentwicklung zu erhalten (Holterhus et al., 2003).

Verglichen wurde das Expressionsmuster von Fibroblasten des Präputiums gesunder männlicher Normalkontrollen mit dem Expressionsmuster von Fibroblasten aus dem Bereich der Labia majora von 46,XY Frauen mit Androgenresistenz.

Von den 32.968 auf dem Chip enthaltenen Genen zeigten dabei 404 Gene einen signifikanten Unterschied in ihrem Transkriptionsverhalten. Unterschiede in der Transkription ließen sich einerseits auf den bekannten Androgenrezeptorstatus (normal versus defekt) zurückführen. Darüber hinaus spielt die embryonale Anlage, von der die Biopsie stammt (der Genitalwulst entwickelt sich zu den Labia majora, der Genitalhocker zum Phallus) eine essentielle Rolle, insbesondere für Gene wie WNT2, HOXA13, BMP4 und FOXF2.

Einige Gene wurden schon früher mit der männlichen Genitalentwicklung in Verbindung gebracht. Für viele Gene ist die Bedeutung für den Menschen noch unbekannt. Sie stellen jedoch potentielle Kandidatengene für die frühe Geschlechtsentwicklung, d.h. für die Entwicklung der genitalen Anlagen, dar (siehe Abb. 5).



Abb. 5: Dargestellt ist eine *Clusteranalyse*, die die Expressionsdaten von - 14 *cDNA* Arrays wiedergibt Jeder grüne, rote oder schwarze Fleck zeigt die Expression eines Gens. Dabei stellt eine rot Heraufregulation und grün eine Herabregulation dar. Die Nummern der Patienten mit Androgenresistenzsyndrom sind gelb dargestellt (Labia majora), die Normalkontrollen blau (Präputium). Die Clusteranalyse sortiert *die Proben aufgrund der* Analyse der Ähnlichkeit des Expressionsmusters. (Aus Holterhus et al. 2003)

Ein Gen mit signifikantem Unterschied im Transkriptionsverhalten ist das auf der Abbildung 5 auch aufgeführte FOXF2.

1.4 Forkhead-Gene

Das FOXF2-Gen gehört zu der Familie der sogenannten Forkhead-Box Gene. Beim Menschen sind mittlerweile mindestens 43 Mitglieder dieser Familie bekannt (Katoh und Katoh, 2004). Gemeinsames Merkmal dieser FOX-Gene ist ein spezielles, ungefähr 100 Aminosäuren langes DNA-Bindungsmotiv. Dieses DNA-Bindungsmotiv wurde von Weigel et al. anfangs in dem Drosophila Protein forkhead entdeckt. Der Name forkhead kam zustande, weil die mutierten Drosophila-Embryos sowohl am anterioren als auch am posterioren Pol anstelle der normalen Darmstrukturen eine ektop liegende Kopfstruktur ausbildeten (Weigel et al., 1989; Weigel und Jäckle, 1990).

Seit der Entdeckung des hochkonservierten Forkhead-Bindungsmotivs durch Weigel ist dieses mittlerweile bei den verschiedensten Spezies nachgewiesen worden, angefangen bei Hefen über Nagetiere bis hin zum Menschen (zusammengefasst von Kaufmann und Knöchel, 1996).

Da das Forkhead-Bindungsmotiv in den verschiedenen Spezies sehr ähnlich ist, ist zu erwarten, dass dies auch für die dreidimensionale Struktur zutrifft (Mahlapuu, 2001a).

Die dreidimensionale Struktur erinnert an einen Schmetterling: Ein Kernbereich aus α -Helices und β -Faltblättern wird durch zwei "Flügel" ergänzt. Daher wird auch häufig von der "winged-helix"-Struktur gesprochen (Kaufmann und Knöchel, 1996).

Um bei der wachsenden Anzahl von neu entdeckten Forkhead-Transkriptionsfaktoren die Übersicht zu behalten und die phylogenetischen Beziehungen kenntlich zu machen, wurde 2000 von Kaestner et al. eine neue Nomenklatur veröffentlicht. Danach werden bei Wirbeltieren alle Forkhead-Transkriptionsfaktoren mit Fox (Forkhead box) bezeichnet. Die Subklassen werden mit einem Buchstaben gekennzeichnet und die Mitglieder einer Subklasse mit einer Nummer versehen. Beim Menschen werden nur Großbuchstaben verwendet (z.B. FOXF2), bei der Maus wird nur der erste Buchstabe groß geschrieben (z.B. Foxf2) und bei allen anderen Wirbeltieren wird der erste und der für die Subklasse kennzeichnende Buchstabe groß geschrieben (z.B. FoxF2) (Kaestner et al., 2000).

Die Erkenntnisse über die Rolle der Forkhead-Proteine während der Entwicklung nehmen ständig zu. Mausmodelle helfen dabei, die Funktion der Forkhead-Proteine in vivo zu untersuchen. Die Zerstörung kodierender Fox-Gene hat vielfältige Auswirkungen auf den sich entwickelnden Embryo (zusammengefasst von Mahlapuu, 2001a).

Das Ausknocken bestimmter Gene führt teilweise zum frühen Absterben der Embryos (z.B. Foxa2 (HNF-3 β) (Weinstein et al., 1994), Foxf1 (FREAC1, HFH-8) (Mahlapuu et al., 2001b)).

Teilweise sterben die Mutanten nach der Geburt aufgrund von komplexen Fehlbildungen oder von Organversagen (z.B. Foxd1 (Bf2), (Hatini et al., 1996)).

Die Zerstörung bestimmter Forkhead Gene kann aber auch nur zur Schädigung ganz bestimmter Organe führen (z.B. Foxi1 (Fkh-10), (Hulander et al., 1998)).

Beim Menschen konnten Mutationen in Forkhead Genen als Ursache für unterschiedliche Fehlbildungen nachgewiesen werden (zusammengefasst von Mahlapuu, 2001a).

1.5 FOXF2

Das FOXF2-Gen (vormals auch FREAC-2 oder FKHL-6 beim Menschen und LUN bei der Maus genannt, Ormestad et al., 2004) besteht aus zwei Exons, unterbrochen durch ein Intron, und ist auf Chromosom 6p25.3 lokalisiert (Blixt et al., 1998). Die DNA-Sequenz ist bekannt (Pierrou et al., 1994; Hellqvist et al., 1996).



FOXF2 kodiert für einen Transkriptionsfaktor, ähnlich wie andere Mitglieder der Forkhead-Familie (Hellqvist et al., 1996).

Innerhalb des Exon1 liegen sowohl die Forkhead-Domäne/DNA-bindende Domäne als auch zwei Aktivierungsdomänen (Hellqvist et al., 1998) (siehe Abb.6).

Foxf2 interagiert unter in vitro Bedingungen mit zwei generellen Transkriptionsfaktoren: TBP (TATA-binding protein) und TFIIB (Transkriptionsfaktor IIB) (Hellqvist et al., 1998).

Untersuchungen des Expressionsmusters von Foxf2 bei Mäusen zeigt, dass Foxf2 von einem sehr frühen Zeitpunkt an in mesenchymalem Gewebe exprimiert wird (Aitola et al., 2000). Besonders starke Expression wird im Verdauungstrakt (Mundhöhle, Zunge, Zähne, Ösophagus, Magen und Darm), im Respirationstrakt (Lunge und Larynx), im Urogenitalsystem (Blase, Urethra, Genitalhügel und Penis), Skelettsystem, Auge und Innenohr beobachtet. Bei ausgewachsenen Mäusen dagegen findet man nur noch eine niedrige Expression im Bereich von Magen und Darm, der Lunge und im Auge. Foxf2 wird von Mesenchymzellen exprimiert, die in der Nähe von Epithelzellen lokalisiert sind (Aitola et al., 2000; Wang et al., 2003; Ormestad et al., 2004).

Bei der weiten Verbreitung der Expression von Foxf2 im embryonalen Gewebe ist überraschend, dass Mäuse mit einer homozygoten Deletion für das Exon1 des Foxf2-Gens als vorrangigen Befund nur Defekte im Bereich der Mundhöhle zeigten. Die homozygoten Nullmutanten entwickelten alle eine ausgeprägte Spaltbildung im Bereich des harten und weichen Gaumens und starben innerhalb der ersten 18 Stunden nach Geburt. Der Tod der Nullmutanten wurde damit erklärt, dass die Mäuse durch die Spaltbildung des Gaumens unfähig waren zu trinken (Wang et al., 2003).

Auf persönliche Nachfrage berichtete Herr Wang auch über Auffälligkeiten im Bereich des äußeren Genitale der Mäuse (siehe Abb. 7), die bisher nicht publiziert, und damit unbekannt sind.



Abb. 7: Die Fotos A und B makroskopische zeigen Bilder der Genitalregion einer Maus. Dargestellt ist eine Nullmutante (B) und im Vergleich ein Wildtyp (A). Der Penis (Pfeil) ist bei der Nullmutante deutlich kleiner als beim Wildtyp. Die Fotos C und D zeigen zwei histologische Schnitte durch den Penis einer Nullmutante (D) und eines Wildtyps (C). Auch hier fällt auf, das der Penis auf Abbildung D deutlich kleiner ist als auf Abbildung C. (Unveröffentlichtes Material von Wang et al. 2003)

Über Veränderungen des Gens FOXF2 beim Menschen liegen bislang keine Berichte vor.

1.6 Fragestellung

In vielen Fällen von Geschlechtsentwicklungsstörungen kann bislang keine Ursache gefunden werden. Insbesondere finden sich bei vielen betroffenen Individuen mit 46,XY-Karyotyp keine endokrinen Auffälligkeiten. Das bedeutet, es findet sich eine ungestörte Androgenbiosynthese und bei Abwesenheit von Mutationen im Androgenrezeptorgen muss von einer normalen Androgenwirkung ausgegangen werden.

Die ESPED Umfrage hat deutlich gezeigt, dass unklare Fälle von gestörter Geschlechtsentwicklung häufig mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten assoziiert sind. Dies lässt vermuten, dass genetische Faktoren vorhanden sind, die unabhängig von hormonellen Mechanismen zu einem frühen Zeitpunkt der Embryonalperiode die Entwicklung der bipotenten Genitalanlage und des Lippen-, Kiefer-, Gaumenbereichs beeinflussen.

Bei Lippen-Kiefer-Gaumenspalten ist die Ätiologie ebenfalls häufig unklar.

Die Ergebnisse einer umfassenden genomweiten Expressionsanalyse von Holterhus et al. 2003 sprechen dafür, dass dem FOXF2-Gen eine wichtige Rolle bei der Geschlechtsentwicklung zukommen könnte.

Außerdem zeigen Knock-out-Mäuse für das Foxf2-Gen Spaltbildungen im Bereich des Gaumens in Kombination mit einer massiven Hypoplasie des vom Genitalhöcker abgeleiteten Penis.

Daraus ergibt sich folgende Fragestellung:

Lassen sich bei Kindern mit Genitalfehlbildungen unklarer Genese, das heißt mit normaler Androgenbildung und ohne Mutationen im Androgenrezeptorgen, in Kombination mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte genetische Veränderungen im FOXF2-Gen, die diese Fehlbildungen verursachen könnten, nachweisen?

2. Patienten, Material und Methoden

2.1 Patienten

2.1.1 Patientenkollektiv

Es wurden 18 Patienten molekulargenetisch auf einen Defekt im FOXF2-Gen untersucht. Die untersuchten Patientenproben stammen aus der Einsendekartei für molekulargenetische Analysen der DFG-Forscher-Gruppe "Intersexualität - vom Gen zur Geschlechtsidentität". Projekte zur Untersuchung der genetischen Grundlagen der Intersexualität wurden im Rahmen der DFG- und BMBF- geförderten Studien mehrfach von der Ethikkommission der Universität in Lübeck und Kiel bewilligt, unter anderem unter den Kennzeichen D429/05 (in Kiel), sowie 01-065 (in Lübeck, 19.07.2001, Erweiterung vom 19.08.2004). Das hier durchgeführte Projekt wurde im Rahmen einer von der DFG geförderten Studie (KFO111, TP-C) durchgeführt.

In der Patientenkartei werden seit 1991 zur Zeit über 1500 Patientenproben aus Deutschland und Teilen Europas gesammelt und untersucht. Von den in der Studie eingeschlossenen Patienten sind in Lübeck DNA-Proben sowie klinische, laborchemische und molekulargenetische Daten vorhanden.

Außerdem erhielt ich zusätzlich eine Patientenprobe von Herrn Dr. Korsch aus Köln und eine Probe von Frau Dr. Richter-Unruh aus Essen.

Die Patienten werden im Weiteren mit einer ARD-Nummer bezeichnet, unter der sie in Lübeck geführt werden. Wenn im folgenden Text in allen Fällen von *Patienten* in der grammatisch männlichen Form gesprochen wird, so soll dies keine Wertung in Hinblick auf die Geschlechtsidentität beinhalten.

Auswahlkriterium für die Untersuchung eines möglichen FOXF2-Gendefekts war das Vorliegen einer Differenzierungsstörung des äußeren Genitale bei gleichzeitiger Spaltbildung im Bereich des Gesichts (Gaumenspalte, Lippen-Kiefer-Gaumenspalte oder Lippenspalte). Bei erfolgter molekulargenetischer Untersuchung des Androgenrezeptors und der 5 α -Reduktase galt eine hier gefundene Mutation als Ausschlusskriterium. Eine Ausnahme davon wurde bei einem Patienten (ARD 1229) gemacht, bei dem im Androgenrezeptor eine sogenannte stumme Mutation (Substitution im Codon 210, AGG>AGA, Arg>Arg) gefunden wurde. Stumme Mutationen führen nicht zu einer Veränderung der Aminosäurenfolge und haben daher, wenige Ausnahmen ausgenommen, keine klinischen Folgen.

Die Eltern des Patienten ARD 1342 waren blutsverwandt. Alle Patienten wiesen eine negative Familienanamnese auf.

2.1.2 Klinische Daten

Bei der Mehrzahl der Patienten wurde ein 46,XY Karyotyp festgestellt. Ein Patient wies einen weiblichen Karyotyp (46,XX) auf, bei einem weiteren Patienten lag im Karyogramm ein Mosaik vor (45,X0/46,XY), bei einem dritten Patienten eine partielle Trisomie 3q.

Der Phänotyp der Patienten variierte erheblich. In der Mehrzahl lag ein männlicher oder fast männlicher Phänotyp mit Mikropenis und/oder Hypospadie vor. Eine genaue Übersicht über die klinischen Charakteristika der einzelnen Patienten liefert die Tabelle 1.

Zehn der Patienten wiesen eine (korrigierte) Gaumenspalte auf, acht eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte, die in einem Fall doppelseitig vorhanden war. Viele der Patienten zeigten weitere, teilweise komplexe Fehlbildungen.

Die Geschlechtshormonbestimmung fand nicht bei allen Patienten statt oder ist teilweise lückenhaft dokumentiert worden, so dass einige Werte fehlen. Hier aufgeführt sind sowohl die basalen, als auch die durch Stimulation mit hCG erreichten maximalen Werte von Testosteron, sowie die Basalwerte von DHT und Androstendion. Gemessene Androgenkonzentrationen können differieren, je nachdem ob eine Bestimmungsmethode mit Extraktion, Säulenchromatographie oder eine Direktbestimmung aus Plasma oder Serum erfolgte. Diese Daten lagen nicht systematisch vor.

Die Hormonbestimmung wurde bei allen Patienten präpubertär durchgeführt. Für den hCG-Stimulationstest gelten daher für Jungen folgende Referenzbereiche: Basalwert: 4 -18 ng/dl, Maximalwert nach Stimulation: 90-400 ng/dl. Für DHT gelten für präpubertäre Jungen der Referenzbereich von 1,6-7,1 ng/dl. Die altersabhängigen Referenzbereiche für Androstendion sind in der Tabelle 1 jeweils in Klammern angegeben (Referenzbereiche aus Hauffa, 1992).

ARD	166	251	298
Karyotyp	46,XY	46,XY	46,XY
Geschlechtsorgane	intersexuelles	penoskrotale	perineale
	Genitale mit	Hypospadie,	Hypospadie, Skrotum
	Schalskrotum,	Mikropenis	bipartitium
	Mikropenis und		
	Hypospadie		
Gesichtsspalte	Gaumenspalte	Gaumenspalte	Gaumenspalte
woitoro	unklares Fehl	Fehlbildungssyndrom:	Peterdierung
Fehlbildungen und	bildungssyndrom,	breite Daumen,	Mikrozephalie,
klinische Symptome	weite Aorta	prominente Stirn,	Epilepsie,
	descendens,	Hypertelorismus,	Minderwuchs,
	Makrozephalie,	Zahndysplasie,	Iriskolobom
	psychomotorische	dysplastische Ohren	
	Retardierung,		
	Hypertelorismus,		
	tiefstehende Ohren		
Normalbefunde	Androgenrezeptor,	Androgenrezeptor	Androgenrezeptor
molekulargenetischer	SRY-Gen		
Untersuchungen			
Hormonwerte	Testosteron basal:	Testosteron basal:	Testosteron basal:
	8,2 ng/dl	13 ng/dl,	19,1 ng/dl, stimuliert:
		stimuliert: 91 ng/dl;	167,5 ng/dl
		DHT: 23 ng/dl,	
		Androstendion: 60	
		ng/dl (7-68 ng/dl)	

Tabelle 1: Kasuistiken der Patienten ARD 166, 251 und 298

ARD	423	464	529
Karyotyp	46,XY	46,XX	46,XY
Geschlechtsorgane	penoskrotale	doppelte,	skrotale
	Hypospadie	dysplastische	Hypospadie,
		Uterusanlage,	Skrotum bipartitium
		Vaginalagenesie	
Gesichtsspalte	Lippen-Kiefer-	Lippen-Kiefer-	mediane
	Gaumenspalte	Gaumenspalte	Gaumenspalte,
	(doppelseitig) und		doppelte Uvula
	Larynxspalte		
weitere	Fehlbildungssyndrom:	aplastische Niere	
Fehlbildungen und	Tief sitzende Ohren,	rechts, Doppelniere	
klinische Symptome	Epikanthus, breite	links, Meckel-	
	Nasenwurzel,	Divertikel	
	Kleinwuchs,		
	tatzenartige Hände,		
	lobäres Emphysem		
Normalbefunde	Androgenrezeptor,	Androgenrezeptor,	Androgenrezeptor,
molekulargenetischer	5α-Reduktase	SRY-Gen	5α-Reduktase
Untersuchungen			
Hormone	Testosteron basal:	Testosteron basal:	Testosteron basal:
	<20 ng/dl, stimuliert:	1,8 ng/dl	27 ng/dl, stimuliert:
	nicht bestimmt, DHT:		212,9 ng/dl, DHT:
	19 ng/dl,		0,25 nmol/l,
	Androstendion: nicht		Androstendion nicht
	bestimmt		bestimmt

Fortsetzung Tabelle 1: Kasuistiken der Patienten ARD 423, 464 und 529

ARD	776	850	981
Karyotyp	46,XY	46,XY	46,XY
Geschlechtsorgane	skrotale Hypospadie,	Mikropenis	penoskrotale
	Mikropenis		Hypospadie,
			Mikropenis
Gesichtsspalte	Gaumenspalte	Lippen-Kiefer-	Lippen-Kiefer-
		Gaumenspalte links	Gaumenspalte
weitere Fehlbildungen	Nierenhypoplasie	Taubheit	Fallot-Tetralogie,
und klinischen	links, Retrognathie		Iriskolobom
Symptome			
Normalbefunde	Androgenrezeptor,	nicht erfolgt	Androgenrezeptor,
molekulargenetischer	5α-Reduktase		5α-Reduktase
Untersuchungen			
Hormonwerte	nicht bestimmt	Testosteron	nicht bestimmt
		basal:<20ng/dl	

Fortsetzung Tabelle 1: Kasuistiken der Patienten ARD 776, 850 und 981

ARD	1131	1226	1229
Karyotyp	46,XY	46,XY	nicht bestimmt
Geschlechtsorgane	skrotale Hypospadie	Hypospadie,	Mikropenis,
		labienähnliche	Kryptorchismus
		Skrotalhälften	
Gesichtsspalte	mediane	Gaumenspalte	Lippen-Kiefer-
	Gaumenspalte		Gaumenspalte
weitere Fehlbildungen	faciale	Sagittalnaht-	Ösophagusatresie IIIb,
und klinische	Auffälligkeiten,	synostose,	Z.n. Ductus-Botalli-
Symptome	Vitium cordis,	hypoplastische	OP, kleiner
	Kleinwuchs	Rippe	Ventrikelseptum-
			Defekt,
			psychomotorische
			Retardierung,
			Schwerhörigkeit
Normalbefunde	Androgenrezeptor	Androgenrezeptor,	Androgenrezeptor→
molekulargenetischer		5α-Reduktase	stumme Mutation, 5α-
Untersuchungen			Reduktase
Hormonwerte	nicht bestimmt	nicht bestimmt	"nach Stimulation kein
			relevanter Anstieg von
			Testosteron"

Fortsetzung Tabelle 1: Kasuistiken der Patienten ARD 1131, 1226 und 1229

ARD	1342	1359	1371
Karyotyp	46,XY	46,XY	46,XY
Geschlechtsorgane	Hypospadie,	perineale Hypospadie,	intersexuelles
	Kryptorchismus	Skrotum bipartitium,	Genital
		prolabiertes Septum	
		urorectale	
Gesichtsspalte	muköse	Lippen-Kiefer-	Lippen-Kiefer-
	Gaumenspalte	Gaumenspalte	Gaumenspalte
weitere	konnatale	funktionslose,	
Fehlbildungen und	Hypothyreose,	zystisch-dysplastische	
klinische Symptome	psychomotorische	Nieren, Iriskolobom	
	Retardierung	links, akzessorische	
		Mamille links,	
		Hypertelorismus,	
		Analatresie	
Normalbefunde	Androgenrezeptor,	nicht erfolgt	Androgenrezeptor,
molekulargenetischer	5α-Reduktase		5α-Reduktase
Untersuchungen			
Hormonwerte	nicht bestimmt	nicht bestimmt	Testosteron basal:
			11 ng/dl. stimuliert:
			254 ng/dl. DHT:
			6 ng/dl.
			Androstendion:
			33ng/dl (3-44 ng/dl)

Fortsetzung Tabelle 1: Kasuistiken der Patienten ARD 1342, 1359 und 1371
ARD	1372	1503	1521
Karyotyp	46,XY, partielle	45,X0/46,XY	nicht bestimmt
	Trisomie 3q		
Geschlechtsorgane	skrotale Hypospadie,	Pseudohermaphroditismus	Hypospadie
	intersexuelles Genital,	maskulinus	
	persistierende		
	Vaginalanlage		
Gesichtsspalte	mediane Gaumenspalte	muköse Gaumenspalte	Lippen-Kiefer-
			Gaumenspalte
weitere	subaortaler		weite
Fehlbildungen und	Ventrikelseptumdefekt,		Nierenbecken
klinische Symptome	Pulmonalstenose,		
	rechtseitiger		
	Aortenbogen		
Normalhafunda	Androgonrozontor	night orfolgt	night orfolgt
normanberunue malakulangan etiashan	Androgeniezeptor	ment errorgt	ment errorgt
molekulargenetischer			
Untersuchungen			
Hormonwerte	Testosteron basal:	Testosteron basal	nicht bestimmt
	2 ng/dl, stimuliert:	21 ng/dl, stimuliert:	
	271 ng/dl	99 ng/dl, DHT: nicht	
		bestimmt, Androstendion:	
		80 ng/dl (5-100 ng/dl)	

Fortsetzung Tabelle 1: Kasuistiken der Patienten ARD 1372, 1503 und 1521

2.2 Material

Gebrauchslösungen und Chemikalien

•	Agarose NEEO	Roth, Karlsruhe
•	APS (Ammoniumpersulfat)	USB [™] , Amersham LIFE SCIENCE,
		Buckinghamshire, England
•	BigDye (Version 1.1) und 2,5xPuffer	Applied Biosystems, Darmstadt
•	Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
•	Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
•	DMSO (Dimethylsulfoxide)	Sigma, St. Louis, USA
•	dNTPs (Desoxyribonukleotide)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
	Set (100nM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	
•	EDTA	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
•	Essigsäure	Merck, Darmstadt
•	Ethanol	Merck, Darmstadt
•	Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
•	Formaldehyd	Merck, Darmstadt
•	Formamid	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
•	Glyzerin	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
•	Marker vom Typ	DigestNew England Biolabs,
	φX174RF DNA HAEIII	Schwalbach/Taunus
•	Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
•	Natriumacetat	Merck, Darmstadt
•	Polyacrylamidlösung (PAA)	Roth, Karlsruhe
	(Rotiphorese-Gel 30)	
•	PvuII (Restriktionsenzym) und	
	1xNEPuffer 2	New England BioLabs
•	Salpetersäure	Merck, Darmstadt
•	Salzsäure	Merck, Darmstadt
•	SDS (Sodiumdodecylsulfat)	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
•	Silbernitrat	Caesar&Lorentz GmbH, Hilden
•	DNA- Polymerase (AmpliTaq®)	Roche, Holdingen
•	TEMED	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

-Patienten, Material und Methoden

Phase GmbH, Lübeck

Biometra, Göttingen

GFL®, Burgwedel

Labor-Brand, Gießen

Sigma, Osterode am Harz

Applied Biosystem GmbH, Weiterstadt

My Research, Inc, Massachusetts, USA

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

(Tetramethylethylendiamin)

- Trizma® Base
- Xylene Cyanol

Einmalartikel

Life technology, Inc.
Sarstedt, Nümbrecht
Sarstedt, Nümbrecht
Eppendorf, Hamburg
Life Technologies, Inc.

für SSCP (Model S2)

• Geldokumentationsanlage

- Gelkammer und -träger
- Inkubator
- PCR-Thermocycler (Perkin Elmer Cetus 480)
- PCR-Thermocycler (PTC-2000)
- Spannungsgerät für Agarosegel (Power Pack P22)
- Spannungsgerät für SSCP
- UV-Leuchttisch
- Zentrifuge (Typ 1-15)

Kits

	Blood Midi/Maxi Test Kit	Quiagen GmbH, Hilden
1	QIAquick PCR Purification Kit	Quiagen GmbH, Hilden

Primer

TIB MOLBIO Syntheselabor, Berlin

S= sense

A= antisense

- Exon 1/1: S 5`- GGCGCTCGCAGGGCTTCT-3`
 - A 5`-TCATCAGGGCGGCCTGGA-3`
- Exon 1/2: S 5`-CCGGGTCCCAGATGACCA-3` A 5`-GGGGCGCTGGCCGAATTG-3`
- Exon 1/3: S 5`-GTCGTCGTCGTCGCGCGCGCTCCT-3` A 5`-TTGCTGGGCGAGCTCTGGAT-3′
- Exon 1/4: S 5`-CTACTCGTACGCGCTCAT-3` A 5`-GAGGCCCTTAGGCAGCTTG-3`
- Exon 1/5: S 5`-AGGGCTGGAAGAACTCGGT-3` A 5`-TACATGGGCTTGAGCGCCT-3`
- Exon 1/6: S 5`-CGACCCGGCCAGCGAGTTCAT-3` A 5'-GGTACCGGGCTGCTGCTGCTGTCC-3`
- Exon 1/7: S 5`-CAGCCACGCGCACCCTCA-3` A 5`-GCGAGTAGGAGGACATGCTGGA-3`
- Exon 1/8: S 5`-GCGCCATCGAATGCCACT-3`
 - A 5`-AGCCCTGGAGGCCTAGAA-3`
- Exon 2/1: S 5`-CTGGATGACTTTGTTTCTGA-3` A 5`-CGTGCATGTGACTTGAAT-3`

Primerverdünnung

Erste Stammlösung

Die Primer wurden gefriergetrocknet geliefert. Eine herstellerspezifische Primermenge (700-900 μ g) wurde in 10 μ l 1xTE-Puffer gelöst. Die so entstandene 1:10 Verdünnung wurde als Stammlösung verwendet.

Zweite Stammlösung

Die Herstellung der zweiten Stammlösung erfolgte durch die Zugabe von 1 μ l Stammlösung zu 9 μ l 1xTE.

Arbeitsverdünnung

Die Primerlösung in der Konzentration 20 pmol/ μ l wurde aus der zweiten Stammlösung durch Verdünnen mit 1xTE erstellt. Für die Errechnung der genauen Menge 1xTE (X) wurde folgende Formel verwendet:

 $X = \frac{\left[\mu g/\mu l\right]}{\left(\text{Basenzahl des Primers} \times 0,0066\right)}$

Die resultierende Menge 1xTE wurde mit 1 μ l der zweiten Stammlösung zusammengegeben und ergab die Arbeitsverdünnung (20 pmol/ μ l), die für die PCR-Ansätze verwendet wurde.

Lösungen

EDTA: Als Stammlösung wurde eine 250 mM EDTA-Verdünnung verwendet. Dazu wurden 93,05 g EDTA in 1 l Aqua bidest gelöst.

10xTBE: Es wurden 1090 g Trizma® Base, 566,5 g Borsäure und 93 g natriumhaltiges EDTA zusammen gegeben und in 10l l Aqua bidest gelöst. Der pH-Wert betrug 8,3.

10xTE: Zur Herstellung wurden 10 ml Trizma® Base-Lösung (pH: 8,0) mit 292 mg natriumfreien EDTA auf 100 ml Aqua bidest aufgefüllt. Zur pH-Einstellung (pH 7,5) wurde Salzsäure verwendet.

Ethidiumbromid: Zur Herstellung der Färbelösung wurden 50 µl Stammlösung (enthält 10 mg/ml) zu 250 ml Aqua bidest gegeben.

Färbelösungen

Agarosefärbepuffer: In 50 ml Aqua bidest wurden 25 ml Glyzerin, 10 µl Bromphenolblau, 0,5 ml 1 M Trizma® Base (pH 8), 0,5 ml 10% SDS und 0,3 ml 0,5M EDTA gelöst.

Bluestop-Färbepuffer: Als Arbeitslösung wurden 28,5 ml Formamid, 0,22 g EDTA, 0,015 g Bromphenolblau und 0,015 Xylene Cyanol mit Aqua bidest auf 30 ml aufgefüllt.

Sonstige Lösungen

Entwickler: Für die Herstellung des Entwicklers wurden 59,2 g Natriumbicarbonat und 1080 µl Formaldehyd (37%) in 21 Aqua bidest gelöst.

Silbernitratlösung: Es wurden 4 g Silbernitrat in 21 Aqua bidest gelöst.

Längenmarker: 98 µl Agarosefärbepuffer wurden mit 2¢X174RF DNA HAEIII Digest versetzt.

2.3 Methoden

Ziel war es, bei allen 18 Patienten den gesamten kodierenden Bereich des Gens FOXF2 auf Veränderungen der Basenabfolge zu untersuchen. Dazu wurde dieser Bereich zuerst amplifiziert und anschließend mittels SSCP-Analyse untersucht. Bei Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse wurde der entsprechende Abschnitt sequenziert. Bei Veränderungen in der Sequenz schloss sich die gezielte Untersuchung von 10 männlichen und 10 weiblichen Normalkontrollen auf diese Veränderung hin an.

2.3.1 DNA-Extraktion

Die DNA-Isolierung erfolgte mit Hilfe des QIAamp Blood Midi/Maxi Test Kit aus Leukozyten in EDTA-Blut. Die verwendete Arbeitsverdünnung enthielt 100 ng/µl DNA.

2.3.2 DNA-Amplifikation

Prinzip

Die Polymerasekettenreaktion (Polymerase Chain Reaction, PCR) erlaubt es, spezifisch Abschnitte der DNA zu vervielfältigen. Dazu werden in einem Ansatz zu der DNA definierte Oligonukleotide (Primer; Sense und Antisense) gegeben, die der ebenfalls zugeführten DNA-Polymerase als Ausgangspunkt für die DNA-Synthese dienen. Für die Amplifikation der DNA benötigt die Polymerase Desoxynukleosidtrisphophat (dNTPs) (Mullis und Faloona, 1987). Außerdem werden weitere Zusätze benötigt, um passende Reaktionsbedingungen zu schaffen. Durch zyklische Temperaturänderungen wird die Synthese spezifischer DNA-Fragmente erreicht.

Durchführung

Die DNA-Sequenz des FOXF2-Gens ist bekannt und wurde aus der NCBI Gendatenbank übernommen (GenBank accession number: NT_034880).

Das aus zwei Exons bestehende Gen wird durch ein Intron unterteilt. Mit Hilfe des Programms PrimerSelect (DNAStar, Inc.) wurden neun Primerpaare ermittelt (siehe oben). Das Exon 1 ist mit 1170 Basenpaaren (bp) sehr lang. Es wurden daher acht Primerpaare gewählt, um das Exon 1 stückweise zu amplifizieren. Das Exon 2 wurde dagegen in einem Stück amplifiziert. Die Primer wurden so gewählt, dass auch Exon/Intron-Grenzen mit eingeschlossen waren und damit auch die Splicing-Regionen untersucht wurden.

Anschließend wurden für jedes zu amplifizierende Fragment passende PCR-Bedingungen entwickelt. Da das Gen FOXF2 sehr GC-reiche Regionen besitzt, wurde zu den meisten PCR-Ansätzen DMSO hinzugefügt (Choi et al., 1999).

Bei allen Abschnitten wurde eine Negativkontrolle ohne DNA-Zusatz und eine Normalkontrolle mitgeführt. Durchgeführt wurde die Amplifikation in einem programmierbaren Thermocycler.

Die genaue Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes ist der Tabelle 2 zu entnehmen.

Reagenzien	pro Ansatz in μl	pro Ansatz in μl
DNA-Arbeitsverdünnung (100 ng/µl)	1	1
Primer sense (20 pmol)	1	1
Primer antisense (20 pmol)	1	1
10xPuffer	5	5
dNTPs (2 mM)	5	5
Taq Polymerase	0,2	0,2
Zusatz: DMSO	2,5	/
ddH2O	34,5	37

Tabelle 2: Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes, links mit DMSO als Zusatz(Exon 1) rechts ohne Zusatz (Exon 2).

Für alle Abschnitte wurde das gleiche PCR-Programm mit 35 Zyklen adaptiert.

Das PCR-Programm ist Tabelle 3 zu entnehmen. Bei der initialen Denaturierung bei 94°C wurden die DNA-Doppelstränge in Einzelstränge aufgespalten. Anschließend erfolgte eine weitere kurze Denaturierung bei 98°C. Während der Anlagerungsphase hybridisierten die Primer an die Einzelstränge. Die Temperatur der Anlagerungsphase variierte bei jedem zu amplifizierenden Abschnitt (siehe Tabelle 4). Die Verlängerung der Primer während der Synthesephase fand bei 72°C statt. Schritt 2 bis 4 wurden 34 mal wiederholt. Eine abschließende Synthesephase von 5 Minuten beendete den Prozess.

Schritt	Temperatur in ℃	Zeit
1. initiale Denaturierung	94	5 min.
2. Denaturierung	98	10 s
3. Anlagerungsphase	siehe Tabelle 4	30 s
4. Synthesephase	72	2 min.
5.abschließende Synthesephase	72	5 min.
6.herunterkühlen	4	

Tabelle 3: PCR-Programm.

Exon	Anlagerungs- temperatur	Puffer-pH	MgCl2 (mmol/l) im Puffer	Zusatz	Fragmentlänge
1/1	60 <i>°</i> C	8,0	1,5	DMSO	180 bp
1/2	56℃	8,6	1,0	DMSO	217 bp
1/3	64 <i>°</i> C	8,4	2,0	DMSO	210 bp
1/4	58 <i>°</i> C	8,0	2,0	DMSO	190 bp
1/5	66 <i>°</i> C	8,4	2,0	DMSO	196 bp
1/6	67 ° C	8,8	1,0	DMSO	426 bp
1/7	61 <i>°</i> C	8,8	1,0	DMSO	347 bp
1/8	61 <i>°</i> C	8,6	2,0	DMSO	257 bp
2/1	49 <i>°</i> C	8,0	1,5	/	302 bp

Tabelle 4: PCR-Bedingungen für die verschiedenen Abschnitte des FOXF2-Gens

2.3 3 Agarosegelelektrophorese

Prinzip

Die amplifizierten DNA-Fragmente trennen sich in der Gelelektrophorese von den anderen Bestandteilen des Reaktionsansatzes. Die DNA-Fragmente wandern aufgrund ihrer schwachen negativen Ladung im elektrischen Feld in Richtung positiver Ladung und trennen sich dabei entsprechend ihrer Länge auf. Durch eine Ethidiumbromidfärbung kann das PCR-Produkt unter UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Beschaffenheit der entstehenden Banden gibt Auskunft über Erfolg und Spezifität der Amplifikation. Veränderungen können eventuell sichtbar gemacht werden. Mit Hilfe eines Längenmarkers kann außerdem die Größe des amplifizierten Fragments abgeschätzt werden.

Durchführung

Für die Gelelektrophorese wurde ein 2% iges Agarosegel verwendet. Zur Herstellung wurden 2 g Agarose in 100 ml 1xTBE unter Erwärmung und Rühren in der Mikrowelle gelöst.

Die Lösung wurde auf zwei Gelträger verteilt. Pro Gelträger wurden je zwei Kämme zur Bildung von Geltaschen in die flüssige Lösung gesteckt. Nach ca. 15 Minuten war das Gel abgekühlt und ausgehärtet und damit gebrauchsfertig. Das Gel mit dem Gelträger wurde anschließend in die Elektrophoresekammer gesetzt und mit 1xTBE bedeckt. Nun konnten die Kämme aus dem Gel entfernt werden. 5 μ l des PCR-Produkts wurden mit 5 μ l Agarosefärbepuffer versetzt und in die entstandenen Geltaschen hineinpipettiert. Pro Probenreihe wurden zusätzlich 10 μ l eines Längenmarkers aufgetragen. In der anschließenden Elektrophorese wurde das Gel durch ein Netzgerät einer Spannung von 100 V für 30-40 Minuten ausgesetzt.

An die Elektrophorese schloss sich eine Färbephase von etwa 10 Minuten in einer Ethidiumbromidlösung an. Um überschüssiges Ethidiumbromid wieder zu entfernen wurde das Gel anschließend für 10 Minuten in Aqua bidest entfärbt. Auf einem UV-Tisch erfolgte die Betrachtung der Banden. Die Anfertigung eines Fotos des Gels unter UV-Bestrahlung ermöglichte die Auswertung und Dokumentation der Banden.

2.3.4 Restriktionsanalyse des Fragments 1/6

Wie oben bereits erwähnt, besitzt das FOXF2-Gen sehr GC-reiche Regionen. Für diese Bereiche war es schwierig, Primer zu finden, die eine spezifische Amplifikation ermöglichten. Der Abschnitt 1/6 war daher mit 426 bp für die SSCP-Analyse sehr lang.

Aus diesem Grund wurde er nach erfolgreicher Amplifikation mit Hilfe eines Restriktionsenzyms geschnitten. Restriktionsenzyme schneiden die DNA an einer für jedes Enzym spezifischen Sequenzabfolge.

Für den Abschnitt 1/6 wurde das Enzym PuvII gewählt, welches die DNA immer bei der Sequenz 5'...CAG▼CTG...3' schneidet.

17μl PCR-Produkt wurden mit 2μl 1x NEPuffer2 und 1μl Puv II vermischt und bei 37°C für mindestens 3 Stunden inkubiert. Die beiden Fragmente hatten eine Länge von 93 und 333 bp.

2.3.5 SSCP-Analyse

Prinzip

Mittels SSCP- (Single Stranded Conformation Polymorphismen) Analyse ist es möglich, Veränderungen der Basenabfolge der DNA mit hoher Wahrscheinlichkeit zu erkennen.

Die amplifizierten DNA-Fragmente werden thermisch denaturiert. Anschließend werden die Einzelstränge in einem denaturierenden Ladepuffer auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt. Sobald die DNA-Stränge das denaturierende Milieu verlassen und in das Gel eintreten, nehmen sie eine Sekundärstruktur an, die durch ihre Basenabfolge und -anzahl bestimmt wird (Orita et al., 1989). Bei Veränderung der Basenabfolge ändert sich auch die Sekundärstruktur und damit das Laufverhalten (Hayashi, 1991). Das spezifische Laufmuster wird durch eine Silberfärbung sichtbar gemacht. Ein geändertes Wanderungsverhalten wird als Gelshift bezeichnet. Durch den Vergleich von Normalkontrollen mit Patientenproben lassen sich auftretende Gelshifts erkennen.

Durchführung

Gelherstellung

Die SSCP-Analyse erfolgte mit einem nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel. Je nach Länge der zu untersuchenden DNA-Fragmente wurde entweder ein 10%iges oder 5%iges Gel verwendet. Die Prozentangabe bezieht sich auf den Anteil von Glyzerin im Gel. Die Zusammensetzung der Gele ist der Tabelle 5 zu entnehmen.

	5% Glyzerin	10% Glyzerin
10x TBE	15 ml	15 ml
30% PAA	30 ml	30 ml
Glyzerin	7,5 ml	15 ml
Aqua bidest	96,5 ml	89 ml
10% APS	1 ml	1 ml
TEMED	70 μl	70 μl

 Tabelle 5: Zusammensetzung der SSCP-Gele

Als Polyacrylamidlösung wurde eine fertige Mischung (Rotiphorese-Gel) verwendet. Die Glyzerinzugabe führte zu einer besseren Auftrennung der einzelnen Fragmente. Außerdem verlängerte sich durch einen höheren Anteil an Glyzerin die Laufzeit.

Die Gelkammer setzte sich aus zwei Glasplatten (Maße: 32x40 cm und 32x38 cm) zusammen, die durch einen Platzhalter aus Plastik von 0,8 mm Dicke voneinander getrennt waren. Zur Fixierung und Isolierung wurden drei Seiten der Glasplatten mit Klebeband abgedichtet. Eine kurze Seite, an der die längere Platte überstand, wurde frei gelassen. Durch diesen offenen Spalt wurde das Gel sofort nach dem Anrühren gegossen. Anschließend wurde ein Kunststoffkamm zur Bildung der Taschen an der offenen Seite eingeführt und mit drei Klammern fixiert. Die Glasplatten wurden in Schräglage positioniert und für ca. 1,5 Stunden bei Raumtemperatur stehen gelassen. In dieser Zeit polymerisierte das Gel aus.

Nach dem Aushärten wurde der Kamm aus dem Gel entfernt. Außerdem musste das Klebeband von der kurzen Seite der Glasplatten entfernt werden, um einen Stromfluss während der Elektrophorese zu ermöglichen. Die Glasplatten wurden mit der überragenden Platte nach außen in die Elektrophoresekammer eingespannt. Zum Abdichten wurde 2%ige Agarose erhitzt und anschließend mit einer Glaspipette in den Spalt zwischen kleiner Glasplatte und Elektrophoresekammer gebracht. Das Gel wurde anschließend an beiden kurzen Seiten mit 1xTBE bedeckt und die Gel-Taschen gründlich gespült.

Probenvorbereitung

15 μl des PCR-Produktes und 10 μl Bluestop wurden in ein Safe-lock-Tube gefüllt. Der Bluestop-Ladepuffer diente der DNA als Vehikel. Der Ansatz für den Marker bestand aus 15 μl Längenmarker und ebenfalls 10 μl Bluestop. Die Normalkontrolle wurde zweifach angesetzt.

Die Proben wurden für 10 Minuten bei 98°C denaturiert und anschließend für ca. 3 Minuten auf Eis gekühlt. Eine Normalkontrolle, die Negativkontrolle und der Marker wurden nicht denaturiert. Je 15 μ l der Proben und 15 μ l des Markers wurden in die Geltaschen pipettiert.

Elektrophorese

Die aufgetragenen Proben wurden im Gel bei 8-40 Watt für 4-17 Stunden mittels Elektrophorese aufgetrennt. Die Wattzahl, die durch ein Netzgerät erzeugt wurde, bestimmte zusammen mit der Glyzerolkonzentration die Laufzeit der Proben und wurde entsprechend variiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Raumtemperatur von ca. 20°C durchgeführt.

Gelfärbung

Um die DNA-Banden im SSCP-Gel sichtbar zu machen, wurde eine Standard-Silberfärbung verwendet (Bassam et al., 1991).

Das Gel mit den umschließenden Glasplatten wurde aus der Elektrophoresekammer entnommen und das Klebeband entfernt. Die Platzhalter wurden zur Hälfte hinausgeschoben und eine Glasplatte vom Gel abgehoben. Das Gel wurde zurechtgeschnitten und mit Hilfe einer Frischhaltefolie in die Färbeschale übertragen. Der genaue Ablauf der Färbung ist in Tabelle 6 wiedergegeben.

Vorgang	Zeitdauer
10% Ethanol	5 min
1% Salpetersäure	3 min
Aqua bidest	2x 1 min
Silbernitratlösung	30-60 min
Aqua bidest	2x 1 min
Entwickler	1x min
Aqua bidest	1x min
Entwickler	max. 5 min
10% Essigsäure	1 min
50 mM EDTA pH 8	5 min
Aqua bidest	5 min
Gel in Folie einschweißen	

 Tabelle 6: Ablauf der Silberfärbung der SSCP-Gele

Die initiale Lagerung des Gels in Ethanol diente der Fixation der DNA. Die Salpetersäure denaturiert die DNA. Aqua bidest dient zwischen den verschiedenen Schritten dem Auswaschen der Chemikalien. Für die eigentliche Färbephase wurde eine Silbernitratlösung verwendet. Die Silberionen lagern sich an DNA-Bestandteile an. Der Entwickler (Natriumbikarbonat und Formaldehyd) führte zum Ausfällen der Silberionen und macht damit die DNA-Banden sichtbar. Durch Essigsäure wurde die Entwicklung beendet und gleichzeitig der Kontrast verstärkt. Zum Schluss wurde das Gel in einer EDTA-Stopplösung fixiert und noch einmal gründlich mit Aqua bidest gespült, bevor es in Plastikfolie eingeschweißt wurde.

2.3.6 DNA-Sequenzierung

Prinzip

Die Sequenzierung beruht auf dem von Sanger et al. entwickelten Prinzip der Kettenabbruchreaktion (Sanger et al., 1977). Im Gegensatz zum traditionellen Verfahren wurden keine radioaktiven Bausteine, sondern mit Fluoreszenzgruppen versehende ddNTPs (Didesoxynucleosidtriphosphat) verwendet. Bei dem in dieser Arbeit verwendeten Kapillarsequenzierer wandern die Proben durch eine dünne Glaskapillare. Die durch einen Laser angeregten Fluoreszenzgruppen emittieren Licht, welches von einem Detektor aufgezeichnet wird. Computergestützt werden die Signale gesammelt und ausgewertet.

Durchführung

Probenvorbereitung

Für die Sequenzierung wurden 100 µl PCR-Produkt (zwei PCR-Ansätze) benötigt.

Für die DNA-Aufreinigung wurde das QIAquick PCR Purification Kit mit entsprechendem Protokoll verwendet.

An die Aufreinigung der DNA schloss sich eine erneute Amplifikation an, jedoch mit veränderten PCR-Bedingungen (siehe Tabelle 7).

Reagenzien	pro Ansatz in μl
gereinigte DNA	5
Aqua bidest	12
2,5xPuffer	4
Primer (sense oder antisense)	0,75
Big Dye	4
Tabello 7. DCD Amagta	

 Tabelle 7: PCR-Ansatz

Da beim Sequenzieren immer nur ein Strang der DNA abgelesen werden kann, wurde in einem Ansatz entweder der Sense- oder der Antisense-Primer verwendet.

Das PCR-Programm war folgendermaßen verändert:

Schritt	Temperatur in ℃	Zeit
1.	96	3min
2.	98	10s
3.	60	1min 30s
4.	50	1min 30s
5.	4	

Tabelle 8.: PCR-Programm

Die Schritte 2.-4. wurden 24 mal wiederholt, so dass sich insgesamt eine Zykluszahl von 25 ergab.

Nach erfolgter Amplifikation wurde das PCR-Produkt in ein 1,5 ml Tube umgefüllt und mit Aqua bidest auf 100 μ l aufgefüllt. Dazu wurden 10 μ l 3M Natriumacetat und 250 μ l 100% Ethanol gegeben. Nach 20 Minuten Zentrifugation wurde der Überstand verworfen und erneut mit 250 μ l 70% Ethanol gewaschen. Nach 10minütiger Zentrifugation und anschließendem Verwerfen des Überstands war die Probenvorbereitung beendet.

Die Sequenzierung wurde vom Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie des Universitätsklinikums Eppendorf durchgeführt. Dafür wurde ein Kapillarsequenzierer (ABI PRISM 3100, Applied Biosystem) verwendet.

3. Ergebnisse

Die molekulargenetische Analyse gelang bei allen 18 Patienten. Die beiden Exons des FOXF2-Gens konnten jeweils vollständig amplifiziert werden. Durch die Wahl der Primer wurden auch Exon-Intron-Übergange mituntersucht. Es fanden sich sowohl im Exon 1 als auch im Exon 2 Veränderungen der DNA-Sequenz. Die Nomenklatur für die Beschreibung der Sequenzvariationen basiert auf den Empfehlungen der HGV (Human Genome Variation Society, http://www.dmd.nl/mutnomen.html).

3.1 Veränderungen im Exon 1

3.1.1 Veränderung c.77(GCC)9_10

Die SSCP-Analyse zeigte bei einem Patienten (ARD 1131) einen Bandenshift im Vergleich zur Normalkontrolle. Die direkte Sequenzierung ergab, dass es sich hierbei um eine heterozygote Insertion eines zusätzlichen Tripletts handelte. Im Gegensatz zum Wildtyp lagen bei diesem Patienten 10 statt 9 GCC-Repeats vor, was auf Proteinebene zur Insertion einer zusätzlichen Aminosäure Alanin (10 statt 9) führt (siehe Abb. 8 und Abb. 15).

Bei den 20 Normalkontrollen zeigte sich in diesem Bereich dagegen in keinem Fall eine Auffälligkeit in der SSCP-Analyse.

Ergebnisse



Abb. 8: Darstellung der heterozygoten Insertion eines GCC-Tripletts nach Nukleinsäure 123. Die rechte Bildseite zeigt den Befund der Sequenzierung einer Normalkontrolle und der Patientenprobe ARD 1131. Durch die heterozygote Insertion eines GCC-Tripletts kommt es zu einer Überlagerung der beiden Kurven ab der Insertion.

 $\textit{Kurvenrepräsentation:} \ \blacksquare \ \textit{Nukleotid} \ T \ (\textit{Thymin}), \ \blacksquare \ \textit{Nukleotid} \ C \ (\textit{Cytosin}), \ \blacksquare \ \textit{Nukleotid} \ G \ (\textit{Guanin}),$

Nukleotid A (Adenin); Ala: Alanin, Pro: Prolin, Glu: Glutamat

3.1.2 Veränderung c.121G>T; Ala41Ser

Bei der SSCP-Analyse der 20 Normalkontrollen fiel bei einer Probe ein verändertes Laufverhalten in der SSCP-Analyse auf. Die direkte Sequenzierung ergab, dass hier eine heterozygote Punktmutation an Nukleinsäureposition 121 von Guanin (normal) gegen Thymin (mutiert) vorlag. Auf Proteinebene führt dies zu einem Austausch der Aminosäure Alanin gegen Serin an Position 41 (Ala41Ser) (siehe Abb. 9 und Abb. 15). Diese Veränderung wurde nur bei einer weiblichen Normalkontrolle, aber bei keinem Patienten gefunden.



Abb. 9: Darstellung der Mutation c.121G>T; 121Ala41Ser. Der linke Teil der Abbildung zeigt einen Ausschnitt eines SSCP-Gels. Dargestellt ist eine Normalkontrolle und eine Probe, bei der ein heterozygoter Austausch der Base Guanin (G) gegen Thymin (T) vorliegt. Auf der rechten Seite der Abbildung ist das Ergebnis der Sequenzierung dargestellt. Kurvenrepräsentation: ■ Nukleotid T (Thymin), ■ Nukleotid C (Cytosin), ■ Nukleotid G (Guanin); Ala: Alanin, Pro: Prolin, Ser: Serin

3.1.3 Veränderung c.262G>A; Ala88Thr

Bei der SSCP-Analyse zeigte sich bei zwei Patienten (ARD 298 und ARD 1359) ein Bandenshift gegenüber dem Wildtyp, der auf eine heterozygote Mutation hinwies. Die Sequenzierung dieses Bereichs zeigte den Austausch der Base Guanin (normal) gegen Adenin (mutiert) in heterozygoter Form an Position 262. Der Austausch der Base führt zur Veränderung des Tripletts 88 (GCC zu ACC), was den Austausch der Aminosäure Alanin gegen Threonin zur Folge hat (siehe Abb. 10 und Abb. 15).



Abb. 10: Darstellung der heterozygoten Mutation c.262G>A; Ala88Thr. Der linke Teil zeigt einen Ausschnitt des SSCP-Gel, rechts sind die entsprechenden Ergebnisse der Sequenzierung dargestellt. Kurvenrepräsentation: ■ Nukleotid T (Thymin), ■ Nukleotid C (Cytosin), ■ Nukleotid G (Guanin), ■ Nukleotid A (Adenin); Gly: Glycin, Ala: Alanin, Thr: Threonin, Lys: Lysin

Die Analyse der Normalkontrollen zeigte bei zwei von 20 Proben eine Veränderung des Laufverhaltens im SSCP-Gel vergleichbar mit dem der zwei Patienten. Durch die Sequenzierung konnte bei diesen beiden männlichen Normalkontrollen die gleiche heterozygote Punktmutation nachgewiesen werden.

3.1.4 Veränderung c.904(GGC)5_6

Bei der SSCP-Analyse zeigten sich in dem Abschnitt 1/6 des Exon 1 Veränderungen im Laufverhalten der Proben, die dafür sprachen, dass hier Sequenzänderungen gegenüber dem Wildtyp teilweise in homozygoter und teilweise in heterozygoter Form vorlagen.



Abb. 11: Dargestellt sind die Befunde der Insertion eines GGC-Repeats nach Nukleinsäure 918 in homozygoter und heterozygoter Form. Links ist der Ausschnitt eines SSCP-Gels zu sehen, rechts die entsprechenden Befunde in der Sequenzierung.

Kurvenrepräsentation: Nukleotid T (Thymin), Nukleotid C (Cytosin), Nukleotid G (Guanin), Nukleotid A (Adenin); Gly: Glycin, Asp:Aspertat, Tyr: Tyrosin

Die Sequenzierung zeigte, dass dem veränderten Laufverhalten eine unterschiedliche Anzahl an GGC-Repeats ab Position 904 zugrunde liegt. Bei der Originalsequenz liegen nach Position 904 fünf GGC-Repeats. Bei der Untersuchung der 18 Patienten hatten drei Patienten fünf GGC-Repeats, fünf Patienten waren homozygot für ein sechstes GGC-Triplett und zehn Patienten waren heterozygot für ein sechstes GGC.

Die Analyse der Normalkontrollen zeigte ein ähnliches Bild: Sechs zeigten eine fünffache Wiederholung des GGC-Tripletts, zwei hatten sechs GGC-Tripletts und zwölf waren heterozygot für diese Veränderung.

3.2 Befunde im Exon 2

Die SSCP-Analyse des Exon 2 gestaltete sich schwierig, da es hier nur zu minimalen Unterschieden im Laufverhalten der Proben kam. Um keine Veränderungen zu übersehen wurde dazu übergegangen, alle Patientenproben und anschließend die 20 Normalkontrollen zu sequenzieren.

3.2.1 Veränderung c.1272C>T; Ser424Ser

An der Nukleinsäureposition 1272 fand sich bei einem Patienten (ARD 1371) und einer männlichen Normalkontrolle von 20 untersuchten Normalkontrollen der heterozygote Austausch der Base Cytosin gegen Thymin. Diese Veränderung der Basenabfolge führt nicht zu einer Veränderung der Aminosäurensequenz (Ser424Ser), man spricht auch von einer stummen Mutation (siehe Abb. 12 und Abb. 15).



Abb. 12: Ergebnisse der direkten Sequenzierung des Exon 2. Dargestellt sind der Normalbefund und der heterozygote Austausch der Base Cytosin gegen Thymin an Position 1272. Kurvenrepräsentation: ■ Nukleotid T (Thymin), ■ Nukleotid C (Cytosin), ■ Nukleotid G (Guanin), ■ Nukleotid A (Adenin); Ala:Alanin, Ser: Serin, Gly:Glycin

3.2.2 Veränderung c.1284T>C; Tyr428Tyr

An der Position 1284 bestand bei sieben Patienten ein heterozygoter Austausch der Base Thymin gegen Cytosin. Ein Patient zeigte diesen Austausch in homozygoter Form. Auch diese Veränderung der Basenabfolge führt nicht zu einem Austausch einer Aminosäure (siehe Abb. 13 und Abb. 15).

Bei der Sequenzierung der Normalkontrollen konnte dieselbe Veränderung in heterozygoter Form bei 9 von 20 Proben ermittelt werden. Eine homozygote Veränderung lag jedoch bei keiner der 20 Normalkontrollen vor.



Abb. 13: Befunde der direkten Sequenzierung des Exon 2. Dargestellt sind der Normalbefund sowie der heterozygote und homozygote Basenaustausch Thymin gegen Cytosin an Position 1284. Kurvenrepräsentation: ■ Nukleotid T (Thymin), ■ Nukleotid C (Cytosin), ■ Nukleotid G (Guanin),
■ Nukleotid A (Adenin); Tyr: Tyrosin, His: Histidin

3.2.3 Veränderung 25*G>A

Bei einem der untersuchten Patienten (ARD 1229) zeigte sich im nicht translatierten 3`-Bereich des Exons2 eine heterozygoter Austausch der Base Guanin gegen Adenin. Diese Veränderung fand sich bei keiner der 20 Normalkontrollen.



Abb. 14: Dargestellt sind der Normalbefund und der heterozygote Basenaustausch Guanin gegen Adenin an Position 25*. Kurvenrepräsentation: ■ Nukleotid T (Thymin), ■ Nukleotid C (Cytosin), ■ Nukleotid G (Guanin), ■ Nukleotid A (Adenin)

3.3 Übersicht über die molekulargenetischen Ergebnisse

Die Tabellen 9 und 10 fassen die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung zusammen. Die Abbildung 15 zeigt den gesamten kodierenden Bereich des Gens FOXF2 und die gefundenen Veränderungen.

Sequenzänderung	Patienten	Normalkontrollen
c.77(GCC)9_10	1 (ARD 1131)	/
(heterozygot)		
c.121G>T; Ala41Ser	1	1
(heterozygot)		
c.262G>A; Ala88Thr	2 (ARD 298 und ARD 1359)	2
(heterozygot)		
c.1272C>T; Ser424Ser	1 (ARD 1371)	1
(heterozygot)		
c.1284T>C;Tyr428Tyr	7 (ARD 251, 423, 529,776,1131,	9
(heterozygot)	1226 und 1503)	
c.1284T>C; Tyr428Tyr	1 (ARD 464)	/
(homozygot)		
25*G>A	1 (ARD 1229)	/
(heterozygot)		

 Tabelle 9: Zusammenfassung der molekulargenetischen Befunde.

Sequenzänderung	Patienten	Normalkontrollen				
904(GGC)5_6						
5 GGC-Repeats	3 (ARD 981, 1342, 1371)	6				
heterozygot	10 (ARD 166, 215, 298, 464,	12				
	529, 776, 1229, 1359, 1372,					
	1521)					
6 GGC-Repeats	5 (ARD 423, 850, 1131,	2				
	1226, 1503)					

Tabelle 10: Zusammenfassung der Ergebnisse der Sequenzänderung 904(GGC)5_6

Ergebnisse -

1	atg	acc	acc	gag	ggc	ggg	ccg	ccg	ccg	gcc	ccg	ctc	cgc	cgc	gcg	tgc	agc	ccg	gtc	ccc
1	Met	Thr	Thr	Glu	Gly	Gly	Pro	Pro	Pro	Ala	Pro	Leu	Arg	Arg	Ala	Cys	Ser	Pro	Val	Pro
61	ggc	gcg	ctc	cag	gcc	gcc	ctg	atg	agc	ccg	ccg	ccc	gcc	gcc	gcc	gcc	gcc	gcc	gcc	gcc
21	Gly	Ala	Leu	Gln	Ala	Ala	Leu	Met	Ser	Pro	Pro	Pro	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala	Ala
121	<mark>g</mark> cc	ccg	gag	acc	acc	tcc	tcc	tcc	tcg	tcg	tcg	tcc	tcc	gcc	tcc	tgc	gcc	tcg	tcc	tcg
41	Ala	Pro	Glu	Thr	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ala	Ser	Cys	Ala	Ser	Ser	Ser
181	tcc	tcc	tcc	aat	tcg	gcc	agc	gcc	ccc	tcg	gct	gcc	tgc	aag	agc	gcg	ggc	ggc	ggc	ggc
61	Ser	Ser	Ser	Asn	Ser	Ala	Ser	Ala	Pro	Ser	Ala	Ala	Cys	Lys	Ser	Ala	Gly	Gly	Gly	Gly
241	gcg	ggc	gcc	ggg	agc	ggg	ggc	<mark>g</mark> cc	aag	aag	gcg	agc	tcg	ggg	<u>ctg</u>	cgg	cgg	ccc	gag	aag
81	Ala	Gly	Ala	Gly	Ser	Gly	Gly	Ala	Lys	Lys	Ala	Ser	Ser	Gly	Leu	Arg	Arg	Pro	Glu	Lys
301	<u>ccg</u>	ccc	tac	tcg	tac	<u>atc</u>	gcg	<u>ctc</u>	<u>atc</u>	gtc	<u>atg</u>	gcc	<u>atc</u>	<u>cag</u>	agc	tcg	ccc	agc	aag	<u>cgc</u>
101	Pro	Pro	Tyr	Ser	Tyr	Ile	Ala	Leu	Ile	Val	Met	Ala	Ile	Gln	Ser	Ser	Pro	Ser	Lys	Arg
361	<u>ctg</u>	acg	ctc	agc	gag	atc	tac	cag	ttc	ctg	cag	gcg	cgc	ttc	ccc	ttc	ttc	cgc	ggc	gcc
121	Leu	Thr	Leu	Ser	Glu	Ile	Tyr	Gln	Phe	Leu	Gln	Ala	Arg	Phe	Pro	Phe	Phe	Arg	Gly	Ala
421	<u>tac</u>	cag	ggc	tgg	aag	aac	tcg	gtg	cgc	cac	aat	ctc	tcg	ctc	aac	gag	tgc	ttc	<u>atc</u>	aag
141	Tyr	Gln	Gly	Trp	Lys	Asn	Ser	Val	Arg	His	Asn	Leu	Ser	Leu	Asn	Glu	Cys	Phe	Ile	Lys
481	<u>ctg</u>	cct	aag	ggc	ctc	ggg	cgg	ccc	ggc	aag	ggc	cac	tac	tgg	acc	atc	gac	ccg	gcc	agc
161	Leu	Pro	Lys	Gly	Leu	Gly	Arg	Pro	Gly	Lys	Gly	His	Tyr	Trp	Thr	Ile	Asp	Pro	Ala	Ser
541	<u>gag</u>	ttc	atg	ttc	gag	gag	ggc	tcg	ttc	cgc	cgc	cgg	ccg	<u>cgc</u>	ggc	ttc	agg	cgg	aag	tgc
181	Glu	Phe	Met	Phe	Glu	Glu	Gly	Ser	Phe	Arg	Arg	Arg	Pro	Arg	Gly	Phe	Arg	Arg	Lys	Cys
601	cag	gcg	ctc	aag	ccc	atg	tac	cac	cgc	gtg	gtg	agc	ggc	ttg	ggc	ttc	ggg	gcg	tcg	ctg
201	Gln	Ala	Leu	Lys	Pro	Met	Tyr	His	Arg	Val	Val	Ser	Gly	Leu	Gly	Phe	Gly	Ala	Ser	Leu
661	ctg	ccc	cag	ggc	ttc	gac	ttc	cag	gcg	ccc	ccg	tcg	gcg	ccg	ctc	ggc	tgc	cac	agc	cag
221	Leu	Pro	Gln	Gly	Phe	Asp	Phe	Gln	Ala	Pro	Pro	Ser	Ala	Pro	Leu	Gly	Cys	His	Ser	Gln
721	ggc	ggc	tac	ggc	ggc	ctc	gac	atg	atg	ccc	gcg	ggc	tac	gac	gcc	ggc	gcg	ggc	gcc	ccc
241	Gly	Gly	Tyr	Gly	Gly	Leu	Asp	Met	Met	Pro	Ala	Gly	Tyr	Asp	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Pro
781	agc	cac	gcg	cac	cct	cac	cac	cac	cac	cac	cac	cac	gtc	ccg	cac	atg	tcg	ccc	aac	ccg
261	Ser	His	Ala	His	Pro	His	His	His	His	His	His	His	Val	Pro	His	Met	Ser	Pro	Asn	Pro
841	ggt	tcc	acc	tac	atg	gcc	agc	tgc	ccg	gtg	ccc	gcg	gga	ccc	ggg	ggc	gtc	ggt	gcg	gcc
281	Gly	Ser	Thr	Tyr	Met	Ala	Ser	Cys	Pro	Val	Pro	Ala	Gly	Pro	Gly	Gly	Val	Gly	Ala	Ala
901	ggg	ggc	ggc	ggc	ggc	ggc	gac	tac	ggg	ccg	gac	agc	agc	agc	agc	ccg	gta	ccc	tcg	tcc
301	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Gly	Asp	Tyr	Gly	Pro	Asp	Ser	Ser	Ser	Ser	Pro	Val	Pro	Ser	Ser
961	ccg	gcc	atg	gcg	agc	gcc	atc	gaa	tgc	cac	tcg	ccc	tac	acg	agc	cct	gcg	gcg	cac	tgg
321	Pro	Ala	Met	Ala	Ser	Ala	Ile	Glu	Cys	His	Ser	Pro	Tyr	Thr	Ser	Pro	Ala	Ala	His	Trp
1021	agc	tcg	cct	ggc	gcc	tcg	cct	tac	ctc	aag	cag	ccg	cct	gcc	ctg	acg	ccc	agc	agc	aac
341	Ser	Ser	Pro	Gly	Ala	Ser	Pro	Tyr	Leu	Lys	Gln	Pro	Pro	Ala	Leu	Thr	Pro	Ser	Ser	Asn
1081	ccc	gcc	gcc	tcg	gca	ggc	ctg	cac	tcc	agc	atg	tcc	tcc	tac	tcg	ctg	gag	cag	agc	tac
361	Pro	Ala	Ala	Ser	Ala	Gly	Leu	His	Ser	Ser	Met	Ser	Ser	Tyr	Ser	Leu	Glu	Gln	Ser	Tyr
1141 381	ttg Leu	cac His	cag Gln	aac Asn	gct Ala	cgc Arg	gag Glu	gac Asp	ctc Leu	tca Ser	g /←	-Ende	e Exc	on1						

gtaacgcagcacgctccagcccagctgggcgcaccgcttctaggcctccagggctggcggccactgccactccca

• • •

1172 tg gga ctg ccc cgt tac cag cat cac tct act cca gtg tgt gac aga aaa gat ttc gtc 391 Val Gly Leu Pro Arg Tyr Gln His His Ser Thr Pro Val Cys Asp Arg Lys Asp Phe Val 1231 etc aac tte aat ggg att tet tet tte cat eec tea get age ggg teg tat tage cae cat 411 Leu Asn Phe Asn Gly Ile Ser Ser Phe His Pro Ser Ala Ser Gly Ser Tyr Tyr His His 1291 cac cac cag agc gtc tgt cag gat att aag ccc tgc gtc atg tga His His Gln Ser Val Cys Gln Asp Ile Lys Pro Cys Val Met 431 tcacatgcacgcggatagcagtaagccacacacctgccacttagccagaatgcccaggatcgcgttggtcactgttatt

Abb. 15: Dargestellt ist der gesamte kodierende Bereich (Exon 1 und 2) des Gens FOXF2. Das Protein besteht aus 444 Aminosäuren. Die 100 Aminosäuren lange Forkhead-Domain ist unterstrichen. Die Basen, an denen Punktmutationen gefunden wurden, sind rot unterlegt.

An dieser Stelle wurde bei dem Patienten ADR 1131 ein GCC-Triplett eingefügt.
 ★ An dieser Stelle kam es sowohl bei Patienten als auch bei Normalkontrollen zu der Insertion eines GGC-Tripletts.

Bei der Sequenzänderung c.1284T>C; Tyr428Tyr und 904(GGC)5_6 handelt es sich um einen bereits in der Gendatenbank aufgeführten Polymorphismus (vergleiche www.ensembl.org, Ensemble Gene ID ENSG00000137273). Alle anderen Sequenzänderungen sind bislang noch nicht beschrieben worden.

4. Diskussion

4.1 Methodische Aspekte

Da es sich bei dem FOXF2-Gen um ein molekulargenetisch bislang kaum untersuchtes Gen handelt, mussten zunächst Primer bestimmt und optimale PCR-Bedingungen ermittelt werden. Durch den hohen Anteil von Guanin und Cytosin im Exon1 kam es anfangs zur Amplifikation unspezifischer PCR-Produkte, die sich im Agarosegel und in der SSCP-Analyse als zusätzliche Banden darstellten. Durch die Zugabe von DMSO zu den PCR-Ansätzen (Choi et al., 1999) und das Finden einer optimalen Annealing-Temperatur mittels Gradientencycler gelang es bei allen Abschnitten, ein spezifisches Produkt zu amplifizieren.

Die DNA-Sequenzierung einer zur Methodenetablierung verwendeten Normalkontrolle vor Untersuchung der eigentlichen Patienten diente der Bestätigung, dass das Amplifikat wirklich dem zu untersuchenden Abschnitt entsprach. Da diese Normalkontrolle anschließend bei den SSCP-Analysen als Kontrolle diente, sollte außerdem überprüft werden, ob die DNA der Normalkontrolle Veränderungen der Basenfolge aufwies.

Mittels SSCP-Analyse und anschließender Sequenzierung ließen sich Veränderungen im FOXF2-Gen ermitteln. Die SSCP-Analyse dient der unspezifischen Detektion von Mutationen. Durch die Untersuchung von ca. 20 Proben pro Durchlauf eignet sie sich als Screeningverfahren bei der Suche nach Mutationen. Der Vergleich mit einer mitgeführten Normalkontrolle genügt, um eine Abweichung der Basenfolge zu erkennen.

Ist eine Positivkontrolle für eine Mutation vorhanden, so kann bereits in der SSCP-Analyse erkannt werden, ob es sich um die gleiche Mutation in heterozygoter oder homozygoter Form handelt, oder ob eine neue Aberration des Basencodes vorliegt. Aufgrund der einfachen Anwendung hat die SSCP-Analyse seit ihrer Einführung Ende der achtziger Jahre durch Orita und seine Mitarbeiter weite Verbreitung gefunden (Orita et al., 1989) und ist mittlerweile eine bewährte Methode in der molekulargenetischen Diagnostik.

In der Arbeit von Fan et al. und Hayashi et al. wird die Frage behandelt, wo die methodischen Grenzen der SSCP-Analyse liegen (Fan et al., 1993; Hayashi und Yandell, 1993). Es stellte sich heraus, dass die Reproduzierbarkeit von Detektionsergebnissen stark von der Konstanz der Analysebedingungen abhängt. Insbesondere die Leistung der Elektrophorese scheint erheblichen Einfluss auf die Ergebnisse der Analyse zu nehmen. Eine hohe Wattzahl (>60W) lässt die Doppelbanden stärker und die Einzelbanden

schwächer erscheinen, was die Auswertung erschwert. Außerdem führt ein hohe Wattzahl zu einer schlechteren Abgrenzbarkeit der einzelnen Banden, da diese unscharf werden (Fan et al., 1993).

Bei den vorliegenden Untersuchungen überstieg die elektrische Leistung niemals 50 Watt, so dass oben beschriebene negative Effekte nicht zu befürchten waren.

Nach Spinardi et al. wird die Diskriminierung der SSCP-Analyse erhöht, wenn sie bei Raumtemperatur durchgeführt wird und das Gel 5% Glycerol enthält (Spinardi et al., 1991). Hayashi et al. konnten den positiven Effekt von einem 5-10% Glycerol-Anteil des Gels bei der SSCP-Analyse bestätigen, wenn sie bei Raumtemperatur durchgeführt wird (Hayashi, 1991; Hayashi und Yandell, 1993). Auch in dieser Studie wurde ein Anteil von 5-10% Glycerol verwendet und die SSCP-Analyse bei Raumtemperatur durchgeführt.

In der Fachliteratur wird die Meinung vertreten, dass die Sensitivität der SSCP-Analyse ab einer bestimmten Fragmentlänge abnimmt. Dabei werden Werte von über 300-350 bp genannt, wobei nicht nur die Fragmentlänge, sondern auch die Sequenz eine wichtige Rolle spielt (Fan et al., 1993; Hayashi und Yandell, 1993). Die hier untersuchten Teilstücke hatten Fragmentlängen zwischen 180 bp und 347 bp. Das Fragment 1/6 war mit 426 bp sehr groß und wurde aus diesem Grund mit dem Restriktionsenzym PvuII geschnitten und die beiden Teilstücke (333 und 93 bp) anschließend getrennt untersucht.

Beim Exon 2 (302bp) ergaben sich Probleme bei der Diskriminierung von Bandenshifts, da sich diese nur minimal in ihrem Laufverhalten unterschieden. Nachdem anfangs versucht wurde, durch Änderung der Glycerolkonzentration und Zerschneiden mittels Restriktionsenzym eine bessere Diskriminierung zu erreichen, wurde letztlich dazu übergegangen, alle Patienten sowie die 20 Normalkontrollen direkt zu sequenzieren. Damit konnte sicher gestellt werden, dass keine Sequenzveränderungen übersehen wurden.

Um die einzelnen DNA-Fragmente aufzutrennen, ist es weiterhin wichtig, die Proben über eine gewisse Strecke laufen zu lassen. Nach Fan et al. sollen die führenden Banden mindestens 16-18 cm laufen (Fan et al., 1993). In dieser Arbeit wurden die DNA-Fragmente über eine Distanz von mindestens 20 cm aufgetrennt, so dass optimale Ergebnisse zu erwarten waren.

Zur Sensitivität kann nach dieser Studie keine Aussage gemacht werden, da nur Proben sequenziert wurden, die in der SSCP-Analyse ein auffälliges Laufverhalten aufwiesen, bzw. das Exon2 stets direkt sequenziert wurde. Wie viele Proben in der SSCP-Analyse ein falsch negatives Ergebnis hatten, wurde also nicht erfasst.

Von Fan et al. wird jedoch die Sensitivität bei optimalen Bedingungen und Fragmentlängen <354bp mit >90% angegeben (Fan et al., 1993). Aus der langjährigen Erfahrung des Labors mit dieser Methode ist eher von einer Sensitivität deutlich über 95% auszugehen (Hiort, persönliche Kommunikation).

Die SSCP-Analyse von Fragment 1/1 zeigte bei einer einzigen Probe ein auffälliges Laufverhalten, ohne dass in der anschließenden Sequenzierung eine Abweichung in der Basenfolge festgestellt werden konnte (falsch positives Ergebnis). Ansonsten korrelierten Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse stets mit einer DNA-Sequenzvariation in der anschließenden Sequenzierung.

Bei auffälligen SSCP-Ergebnissen schloss sich die Sequenzierung des entsprechenden Fragments an. Die vorbereiteten Proben wurden mittels Kapillarsequenzierer untersucht. Durch die Sequenzierung werden Mutationen mit hoher Genauigkeit detektiert und charakterisiert.

In einigen Fällen kam es bei der Sequenzierung zu Schwierigkeiten bei der eindeutigen Basenzuordnung durch sogenanntes Hintergrundrauschen (Abb. 16)



Abb. 16: Kurvenüberlagerung durch sogenanntes Hintergrundrauschen.

Diese Sequenzen wurden nicht ausgewertet und die Sequenzierungsreaktion wiederholt. Ein klares Kurvenbild mit genauer Zuordnung der Basen konnte als zuverlässig gelten. Eine heterozygote Mutation führte zu einer Unsicherheit in der Basenzuordnung. Es kommt hierbei durch das Vorhandensein von zwei unterschiedlichen Basen zu einer Überlagerung der beiden Peaks. Die beiden Kurven sind außerdem flacher als der Durchschnitt der anderen Kurven. Der Vergleich von Sense- und Antisensesequenz gibt Gewissheit, dass es sich wirklich um eine heterozygote Mutation handelt und nicht nur eine schlecht lesbare Sequenz vorliegt. Bei einer heterozygoten Mutation muss sich sowohl beim Sense- als auch beim Antisensestrang an gleicher Position die oben beschriebene Veränderung finden. Dies traf auf alle hier beschriebenen heterozygoten Veränderungen zu.

Die heterozygote Insertion eines ganzen Basen-Tripletts führt zu einer Überlagerung der beiden Kurven ab dem Punkt der Insertion. Vor der Insertion und beim Auftreten von repetitiven Sequenzen ist jeweils wieder nur eine Kurve zu sehen.

4.2 Die molekulargenetischen Ergebnisse: Pathogene Mutationen oder Polymorphismen?

Das menschliche Genom ist keine statische Einheit, sondern unterliegt ständig Veränderungen durch Mutationen (Strachan und Read, 2005).

Diese Änderungen der DNA-Sequenz können vererbt sein oder de novo im Organismus entstehen. Mutationen können sehr unterschiedliche Auswirkungen haben. Sie können klinisch stumme Polymorphismen, direkte Ursache für ein phänotypisches Erscheinungsbild, oder eine Prädisposition für die Entstehung einer Krankheit darstellen. Mutationen können sich aber auch positiv auf den Organismus auswirken.

Als Polymorphismen bezeichnet man Sequenzvarianten der DNA, die bei über einem Prozent der Bevölkerung vorkommen (Strachan und Read, 2005). Sie haben gewöhnlich keine negativen Auswirkungen auf das Individuum.

Von pathogenen Mutationen spricht man dagegen, wenn sich die Veränderungen negativ auf den Organismus auswirken können. Ein Kriterium, das für das Vorhandensein einer krankmachenden Mutation spricht, ist zum Beispiel das Einfügen eines Stop-Codons mit entsprechender Verkürzung des entstehenden Proteins. Die De-Novo-Entstehung und die Beeinträchtigung von Splicing-Mechanismen sind weitere Kriterien, die für das Vorhandensein einer pathogenen Mutation sprechen. Bei Mutationen, die schon früher als pathogen beschrieben wurden und eines der oben genannten Kriterien erfüllen, kann außerdem auch von einer pathogenen Potenz ausgegangen werden (Baralle und Baralle, 2005).

In der molekulargenetischen Untersuchung der Patienten fanden sich mehrere Veränderungen der DNA-Sequenz. Es stellt sich die Frage, ob die gefundenen Mutationen für das phänotypische Erscheinungsbild der Patienten verantwortlich gemacht werden können. Bei den gefundenen Sequenzvariationen kommt es in keinem der Fälle zum Einfügen eines Stop-Codons und damit ist keine vorzeitige Termination bei der Translation zu erwarten. Auch findet sich keine Leserasterverschiebung, was zu einer Veränderung vieler Aminosäuren führen würde. Bemerkenswert ist außerdem, dass alle Veränderungen außerhalb der Forkhead-Box liegen (siehe Abb. 15). Die Forkhead-Box kodiert für den DNA-bindenden Teil des Transkriptionsfaktors und ist hochkonserviert (Mahlapuu, 2001a). Daher ist zu erwarten, dass Veränderungen der Aminosäuren in diesem Bereich Auswirkungen auf die Funktion des Transkriptionsfaktors hätten.

Die heterozygote Mutation c.77(GCC)9_10 wurde bei einem Patienten gefunden und führt zur heterozygoten Insertion eines zehnten GCC-Tripletts. Diese Veränderung wurde bei keiner der 20 Normalkontrollen gefunden.

Trinucleotidwiederholungen können krankmachende Wirkung haben. Bekannt ist zum Beispiel die pathogene Wirkung einer CAG-Repeaterhöhung im Genort 4p16.3 bei der Chorea major. Eine Repeatanzahl von unter 26 kann dabei als normal gelten, während es bei einer Erhöhung von über 40 Repeats typischerweise zu den Symptomen der Huntington-Krankheit kommt (Myers, 2004).

Ein anderes Beispiel ist die Expansion von CGG-Repeats auf mehr als 230 Kopien im nicht translatierten 5'-Bereich des FMR1-Gens beim fragilen X-Syndrom. Diese CGG-Expansion führt dabei zu einem Funktionsverlust des FMR1-Gens (Kunst et al., 1997).

Das Exon 1 des für den Androgenrezeptor kodierenden Gens enthält ebenfalls eine polymorphe Region, bei der eine unterschiedliche Anzahl von CAG-Repeats vorkommen. Eine massive Erhöhung der Trinucleotide (über 38 Kopien) kann zu dem neurodegenerativen Kennedy Syndrom führen. Aber auch innerhalb der normalen Bandbreite an CAG-Repeats (zwischen 9 und 37) konnten Unterschiede bezüglich der Androgenwirkung festgestellt werden (Zitzmann und Nieschlag, 2003).

Ob die bei dem hier untersuchten Patienten gefundene heterozygote Insertion eines zusätzlichen GCC-Tripletts Auswirkungen auf den Phänotyp haben könnte, kann in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Für den Steroidogenic Factor1 beispielsweise sind heterozygote Mutationen beschrieben, die über eine verminderte Gendosis zu einem komplett weiblichen, bzw. intersexuellem Phänotyp eines 46,XY Individuums führten (Oziski et al., 2003; Mallet et al., 2004). Somit kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine genetische Veränderung im FOXF2-Gen trotz offensichtlich geringer Auswirkung auf

das potentielle Protein über eine verminderte Gendosis (durch verminderte mRNA- oder Proteinstabilität) dennoch pathogen wirkt.

Um einschätzen zu können, ob die hier gefundene Veränderung relevant sein könnte, müssten sich weitere Untersuchungen anschließen. So würde die Untersuchung eines größeren Kollektivs an Normalkontrollen dazu beitragen die Frage zu klären, ob es sich bei der Sequenzvariation um einen verbreiteten Polymorphismus handelt. Die Untersuchung der Eltern könnte zeigen, ob die Veränderung vererbt wurde oder de novo entstanden ist. Mittels RT-PCR könnte außerdem versucht werden, die RNA weiter zu untersuchen.

Bei einer der weiblichen Normalkontrollen wurde eine Basensubstitution c.121G>T gefunden. Diese Basensubstitution führt zum Austausch der Aminosäure Alanin zu Serin, so dass hier die Aminosäure Alanin nur acht mal aneinander gereiht ist. Wie auch die Abb.15 zeigt, liegt diese Basensubstitution nah an der Veränderung c.77(GCC)9_10. Es kann vermutet werden, dass an diesem Bereich die DNA-Sequenz nicht hoch konserviert ist, sondern Variationen bezüglich der Anzahl der Aminosäure Alanin vorkommen. Da diese Veränderung jedoch nur bei einer weiblichen Normalkontrolle gefunden wurde, kann nicht ausgeschlossen werden, dass diese Sequenzänderung der DNA bei einem männlichen Individuum nicht doch zu einer Virilisierungsstörung führen könnte.

Auch an dieser Stelle müssten sich die oben angeführten weiteren Untersuchungen anschließen.

Die Veränderung c.262G>A wurde sowohl bei zwei von 18 Patienten, als auch bei zwei von 20 Normalkontrollen gefunden. Sie führt zu einem Austausch von Alanin zu Threonin, beides sind amphiphile Aminosäuren. Die Häufigkeit und das Auftreten dieser Veränderung sowohl bei Patienten als auch bei Normalkontrollen legen einen Polymorphismus ohne funktionelle Relevanz nahe. Das Ersetzen einer amphiphilen Aminosäure durch eine ebenfalls amphiphile spricht ebenfalls dafür, dass der funktionelle Effekt dieser Substitution gering sein dürfte.

Das Vorhandensein von sechs anstatt fünf GGC-Tripletts (904(GGC)5_6) wurde sowohl bei Patienten als auch bei Normalkontrollen beobachtet. Die Veränderung lag sowohl in heterozygoter als auch in homozygoter Form vor. Aufgrund der gleichmäßigen Verteilung beim Vergleich von Patienten und Normalkontrollen und dem häufigen Vorkommen im Normalkollektiv kann angenommen werden, dass es sich auch hier um einen nicht funktionell relevanten Polymorphismus handelt.

Die Substitution c.1272C>T führt zu keiner Veränderung der Aminosäurensequenz (stumme Mutation) und wurde jeweils bei einem Patienten und bei einer männlichen Normalkontrolle gefunden. Stumme Mutationen haben häufig keine Auswirkungen, können aber durch Beeinflussung von Splicing-Mechanismen pathogen wirken (Baralle und Baralle, 2005; Cartegni et al., 2006). So konnten Hellwinkel et al. bei einem Patienten mit partiellem Androgenresistenzsyndrom eine stille Mutation im Exon8 (Codon 888) entdecken, welche über einen veränderten Splicing-Mechanismus zu einem stark verkürzten Protein führte (Hellwinkel et al., 2001)

Weil die Substitution c.1272C>T sowohl ein Patient, als auch eine Normalkontrolle aufwies, kann auch hier von einem Polymorphismus ohne signifikante Relevanz ausgegangen werden.

Bei der Substitution c.1284T>C handelt es sich ebenfalls um eine stumme Mutation. Die bereits als Polymorphismus beschriebene bekannte Veränderung (siehe Gen-Datenbank, Accession Number NT_034880) konnte in dieser Studie durch das häufige Vorkommen und die gleichmäßige Verteilung bei Patienten und Normalkontrollen als solche bestätigt werden.

Die Veränderung 25*G>A liegt im 3'-untranslatiertem Bereich und wurde ausschließlich bei einem Patienten beobachtet.

Auch wenn diese Veränderung nicht im translatiertem Bereich liegt, könnte sie zum Beispiel durch Beeinflussung von Splicing-Mechanismen relevant sein. Durch die Untersuchung einer größeren Anzahl an Normalkontrollen könnte die Veränderung als möglicher Polymorphismus oder funktionell relevante Mutation charakterisiert werden. Die Untersuchung des entstehenden RNA-Transkripts kann Aufschluss geben, ob die Veränderung 25*G>A Einfluss auf die RNA-Entstehung nimmt.

4.3 Mit Mutationen in FOX-Genen assoziierte Krankheitsbilder

Die Idee, bei Kindern mit Spaltbildungen im Bereich des Gesichts und assoziierter Genitalfehlbildung das FOXF2-Gen auf molekulare Veränderungen zu untersuchen, entstand unter anderem durch die Beobachtung von Knock-out-Mäusen (Wang et al., 2003). Die Tatsache, dass die Nullmutanten für das Exon1 des Foxf2-Gens Gaumenspalten in Verbindung mit Genitalfehlbildungen aufwiesen, führte zu der Frage, ob bei Kindern mit Kombination dieser beiden Fehlbildungen Veränderungen im FOXF2-Gen zu finden sind.

Darüber hinaus konnte in Microarrayuntersuchungen die hoch reproduzierbare, signifikante Überexpression von FOXF2 in vom Genitalhöcker abstammenden Genitalhautfibroblasten im Vergleich zu Fibroblasten des Genitalwulstes gezeigt werden (Holterhus et al., 2003).

Die Maus wird in den letzten Jahren vermehrt als Modellsystem bei der Suche nach Ursachen menschlicher Erkrankungen eingesetzt. Tatsächlich hat sich gezeigt, dass die Geninaktivierung beim Menschen und bei der Maus häufig ganz ähnliche Folgen haben (Balling, 2003). Die Übereinstimmungen phänotypischer Merkmale zwischen Mensch und Maus liefern wichtige Hinweise zur Identifizierung von Genen, die für menschliche Erkrankungen relevant sind. Beispielhaft sei hier die Agouti-Yellow-Maus genannt, die phänotypisch durch ein gelbes Fell und Übergewicht auffiel. Das für einen Liganden des Melanincortin-Rezeptor MC1 kodierende Agouti-Gen konnte mittlerweile kloniert werden. Mutationen im Agouti-Gen führen zu einem am MC1-Rezeptor antagonistisch wirkenden Protein, so dass die normale Produktion von Melanin gestört wird. Durch Kreuzreaktion am hypothalamisch exprimierten MC4-Rezeptor wird das Sättigungsverhalten gestört und es kommt zur Adipositas. Beim Menschen konnten mittlerweile Mutationen im MC4-R-Gen gefunden werden, die zum Melanocortin Obesity Syndrom führen (Jackson, 1997; Barsh, 1999; Balling, 2003). Auch im Bereich der Geschlechtsentwicklung stellt die Maus ein interessantes Tiermodell dar. So wurde 1970 die Tmf-Maus erstmals beschrieben, die eine Mutation im Androgenrezeptor aufweist und damit das murine Homologon für das Androgenresistenzsyndrom darstellt (Couse und Korach, 1998).

Bislang ist unklar, ob das FOXF2-Gen bei der Maus und beim Menschen die gleiche Funktion hat. Daraus ergibt sich weiterhin die Frage, welche Relevanz eine Mutation im Gen FOXF2, die zu einem Funktionsverlust oder zumindest zu einer Funktionseinschränkung des kodierenden Transkriptionsfaktors führen würde, beim Menschen überhaupt hätte und wie die klinischen Folgen wären.

Für die Annahme, dass das Gen FOXF2 beim Menschen und bei der Maus ähnliche Funktion haben könnte, spricht die Tatsache, dass es sich beim Gen FOXF2 um ein hochkonserviertes Gen handelt. So ist die Aminosäuresequenz der DNA-bindenden Forkhead-Domäne des FOXF2-Gens bei der Maus und beim Menschen zu 100% identisch (Mahlapuu, 2001a).

Die Untersuchung von Mäusen mit spontanen oder künstlich erzeugten Mutationen in Fox-Genen gibt Auskunft über die Funktion des entsprechenden Gens in vivo.

Beim Menschen sind bislang bei acht unterschiedlichen FOX Genen Mutationen nachgewiesen worden, die im Zusammenhang mit spezifischen Krankheitsbildern stehen (siehe Tabelle 11). Die verschiedenen FOX-Gene sind für die Entwicklung unterschiedlichster Organsysteme bedeutsam, wie der Phänotyp der betroffenen Patienten zeigt. Teilweise ist spezifisch ein bestimmtes Organ betroffen (z.B. bei FOXE3 die Entwicklung des vorderen Augenabschnitts). Die Zerstörung eines anderen Gens wiederum führt zur Störung verschiedener Organsysteme (z.B. FOXP3). Das Wissen über die Bedeutung der FOX-Gene für die embryonale Entwicklung des Menschen nehmen ständig zu, so dass vermutlich in naher Zukunft auch weitere Fehlbildungskomplexe auf Defekte in dieser Genfamilie zurückgeführt werden können.

Interessant ist der Vergleich des Phänotyps von Mensch und Maus (siehe Tabelle 11 und 12). Die Zerstörung eines menschlichen FOX Gens und des entsprechenden Homologons der Maus haben ähnliche Auswirkungen. Daher kann vermutet werden, dass auch die Zerstörung des Gens FOXF2 beim Menschen zu ähnlichen phänotypischen Veränderungen wie bei den von Wang et al. beschriebenen Knock-out-Mäusen führen könnte.

Gen	Phänotyp	Literatur
FOXC1	assoziiert mit Axenfeld-Rieger-Anomalie:	Mears et al., 1998;
(FREAC3,	Fehlbildungen des vorderen Augenabschnitts,	Lehmann et al., 2000;
FKHL7)	Glaukom, teilweise extraokuläre Befunde	Saleem et al., 2003a;
	(Zahnfehlbildungen, Hypoplasie der Maxilla,	Saleem et al., 2003b,
	Herzfehler)	
FOXC2	hereditäres Lymphödem mit Distichiasis,	Bahuau et al., 2002;
(Mfh1)	teilweise weitere Fehlbildungen (Gaumenspalten,	Berry et al., 2005
	Skelett- und Herzfehlbildungen)	
FOXE1	Agenesie der Schilddrüse, Gaumenspalte,	Clifton-Bligh et al.,
(TTF-2)	Choanalatresie	1998 ; Castanet et al.,
		2002
FOXE3	Fehlbildungen des vorderen Augenabschnitts und	Semina et al., 2001
(FREAC8)	Katarakt	
FOXL2	Blepharophimose/Ptose/Epicanthus inversus	Crisponi et al., 2001
	Syndrom	
	(BPES Typ1 und 2); Typ1 ist assoziiert mit ovarieller	
	Dysfunktion	
FOXN1	Störung der T-Zellfunktion, kongenitale Alopezie	Frank et al., 1999
(Whn)	und dystrophe Nägel	
FOXP2	Sprech- und Sprachprobleme	Enard et al., 2002 ;
	(Artikulationsschwierigkeiten, linguistische und	MacDermot et al., 2005
	grammatikalische Probleme)	
FOXP3	Polyendokrinopathie, Enteropathie, Störung des	Bennett et al., 2001;
	Immunsystems (IPEX: immune dysregulation,	Wildin et al., 2001
	polyendocrinopathy, enteropathy and X-linked	
	inheritance) Thrombozytopenie, Anämie, Ekzeme	
	u.a.	

Tabelle 11 : Übersicht der Forkhead-Gene, bei denen für den Menschen pathogene Mutationengefunden wurden

Gen	Phänotyp	Literatur
Foxc1	Foxc1-/- Mäuse sterben perinatal mit	Kume et al., 1998; Kume et al.,
(Mf1)	multiplen Fehlbildungen (Hydrocephalus und	2000 ;
	cerebrale Hämorrhagien,	Smith et al., 2000
	Skelettfehlbildungen, Fehlbildungen im	
	Bereich der Augen und Augenlider,	
	kardiovaskuläre Fehlbildungen)	
Foxc2	Foxc2-/- Mäuse sterben prä- oder perinatal	Kume et al., 2000;
(Mfh1)	mit multiplen Skelettfehlbildungen und	Smith et al., 2000
	kardiovaskulären Defekten; Fehlbildungen	
	im Bereich der Augen	
Foxe1	Agenesie oder ektope Lage der Schilddrüse	De Felice et al., 1998
(TTF-2)	und Gaumenspalte	
Foxe3	Defekte der Linse	Blixt et al., 2000;
		Medina-Martinez et al., 2005
Foxl2	Fehlbildung der Augenlider, ovarielle Dys-	Uda et al., 2004;
	funktion (weibliche Mäuse sind steril)	Ottolenghi et al., 2005
Foxn1	Störung der Thymusentwicklung und	Nehls et al., 1994
(Whn)	Immundefizienz, Störung des Wachstums	
	der Haare (früher als nude Maus bezeichnet)	
Foxp2	Foxp2-/- Mäuse zeigten Störungen der	Shu et al., 2005
	motorischen Entwicklung und starben	
	gewöhnlich um den einundzwanzigsten Tag	
	postnatal.	
	Sowohl die homozygoten als auch die	
	heterozygoten Mäuse zeigten ein verändertes	
	Muster von Lauten (Ultraschall).	
Foxp3	lymphoproliferative Störung mit	Brunkow et al., 2001
	Überproliferation von T-Lymphozyten	
	(früher als scurfy Maus bezeichnet)	

 Tabelle 12: Auswirkung von Mutationen in Fox-Genen auf die Maus.
4.4 Andere syndromale Erkrankungen, die mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalte und Genitalfehlbildungen einhergehen

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten untersucht, die die Kombination einer Genitalfehlbildung mit einer Gaumen- oder Lippen-Kiefer-Gaumenspalte aufwiesen. Sowohl Gaumen- und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten als auch Genitalfehlbildungen treten relativ häufig auf. Wie auch schon unter 1.2 erwähnt, liegt die Prävalenz für Lippen-Kiefer-Gaumenspalten bei 1 pro 500 bis 1 pro 2500 Geburten (Schutte und Murray, 1999). Abweichungen von der normalen Geschlechtsentwicklung kommen sogar bei 2% der Neugeborenen vor (Blackless et al., 2000). Es besteht damit die Möglichkeit, dass das gemeinsame Auftreten dieser Fehlbildungen rein zufällig ist und ätiologisch unterschiedliche Ursachen zugrunde liegen. Der größte Teil der in dieser Studie untersuchten Patienten wies jedoch weitere Fehlbildungen auf, was für eine komplexe Ätiologie im Rahmen einer syndromalen Erkrankung spricht.

Daraus leitet sich die Frage ab, welche syndromalen Erkrankungen beim Menschen bekannt sind, die mit Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Genitalfehlbildungen einher gehen. Die Suche in der Online-Datenbank OMIM (Online Mendelian Inheritance in Man, (TM) McKusick-Nathans Institute for Genetic Medicine, Johns Hopkins University (Baltimore, MD) and National Center for Biotechnology Information, National Library of Medicine (Bethesda, MD), 2000. World Wide Web URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim/) ergab für die Begriffe Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Genitalfehlbildungen ((cleft palate OR cleft lip) AND (hypospadias OR micropenis OR ambiguous genital)) 84 Einträge. Jeder Eintrag beschreibt eine nach Mendelschen Regeln vererbte syndromale Erkrankung, oder einen Phänotyp, von dem vorher genanntes angenommen wird. Die als Suchbegriffe verwendeten Merkmale sind im Zusammenhang mit diesen Einträgen beschrieben worden, müssen aber nicht zwingender Bestandteil sein. Die Tabelle 13 gibt einen Überblick über einen Teil der beschriebenen Syndrome mit ihren charakteristischen Merkmalen. Ausgewählt wurden nur solche Einträge, bei denen die oben genannten Suchbegriffe feste Bestandteile oder zumindest häufig vorkommende, charakteristische Fehlbildungen eines Syndroms darstellen.

MIM	Genlocus	Name	Genitalfehlbildung	Gesichtsspalte	weitere	Bemerkung	Literatur
					Fehlbildungen		
164220	unbekannt	Schilbach-Rott	Hypospadie	Gaumenspalte	Hypotelorismus,		Schilbach und
		Syndrom			Blepharophimose		Rott, 1988; Joss et
							al., 2002
145410	22q11.2	Hypertelorismus mit	Hypospadie	Lippenspalte,	Herzfehler, mentale		Stevens und
	(autosomale	ösphagealer		Gaumenspalte,	Retardierung, ZNS-		Wilroy, 1988;
	Vererbung)	Abnormalität und		laryngotracheale	Fehlbildungen,		Sedano und
		Hypospadie		Spalten und	Analatresie		Gorlin, 1988;
		(alternativ: G, Opitz-G		gespaltener			Schrander et al.,
		oder BBB-Syndrom)		Ösophagus			1995
600460	unbekannt	Gaumenspalte,	Hypospadie,	Gaumenspalte	komplexe Herzfehler,	bislang nur fünf	Giannotti et al.,
		Herzfehler,	Mikropenis		Ektrodaktylie, mentale	Fälle beschrieben	1995;
		Genitalfehlbildungen			Retardierung,		Mingarelli et al.,
		und Ektrodaktylie					2005
		(CCGE)					
231060	unbekannt	Gardner-Silengo-	46,XY Gonadendys-	Lippen- und	Mikrognathie,	nur 13 Fälle	Silengo et al.,
		Wachtel Syndrom	genesie, Hypospadie	Gaumenspalte	tiefsitzende Ohren,	beschrieben	1974; Greenberg et
					Herzfehler		al., 1987
	-		-				

Tabelle 13: Auswahl von syndromalen Erkrankungen, die mit der Kombination von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Genitalfehlbildungen einhergehen

MIM	Genlocus	Name	Genitalfehlbildung	Gesichtsspalte	weitere	Bemerkung	Literatur
					Fehlbildungen		
300000	Xp22	Opitz Syndrom, Opitz	Hypospadie, Scrotum	Lippenspalte,	Herzfehler, Agenesie	das Opitz-	Jacobson et al.,
	(X-chromo-	G/BBB Syndrom (x-	bipartitium,	Lippen-Kiefer-	des Corpus callosum,	Syndrom kann	1998 ; De Falco et
	somale	chromosomal)	intersexuelles	Gaumenspalte,	Hypertelorismus,	durch	al., 2003
	Vererbung)		Genitale	Larynxspalten	mentale Retardierung,	Mutationen im	
					Syndaktylie	MID1	
						hervorgerufen	
						werden	
214800	8q21.1	CHARGE Syndrom	Mikropenis,	Lippen-	Iriskolobom,	vermutlich	Pagon et al., 1981;
		(CHARGE	Mikrotestis,	/Gaumenspalte	Choanalatresie,	teilweise durch	Lin et al., 1990;
		Assoziation, Hall-	Kryptorchismus,	(seltener)	Herzfehler, mentale	Mutationen im	Tellier et al., 1998
		Hittner Syndrom)	seltener Hypospadie		Retardierung,	Protein CHD7	
					Fehlbildungen des	(chromodomain	
					Ohrs, Taubheit	helicase DNA-	
						binding protein-	
						7) und im Gen	
						SEMA3E	
						(Semaphorin-3E)	
ŗ		-					

Fortsetzung Tabelle 13: Auswahl von syndromalen Erkrankungen, die mit der Kombination von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Genitalfehlbildungen

einhergehen

MIM	Genlocus	Name	Genitalfehlbildung	Gesichtsspalte	weitere	Bemerkung	Literatur
					Fehlbildungen		
263520	unbekannt	Short Rib-Polydactyly	Mikropenis,	mediane	Syndaktylie, kurze	postnatales	Walley et al.,
	(4q13, 4p16?)	Syndrome (SRPS,	Kryptorchismus	Lippenspalte,	Rippen- und	Versterben der	1983 ; Urioste et
		Type II, Majewski		seltener	Extremitätenknochen	betroffenen	al., 1994
		Syndrom)		Gaumenspalte	(besonders Tibia),	Kinder	
					Anomalien des		
					Gastrointestinaltrakts,		
248340	unbekannt	Malpuech Facial	Mikropenis,	Lippen-Kiefer-	Wachstumsretar-		Malpuech et al.,
		Clefting Syndrom	Mikrotestis,	Gaumenspalte	dierung, breite Stirn,		1983; Crisponi et
			Hypospadie	(häufig bilateral)	Hypertelorismus,		al., 1999
					Ptosis, mentale		
					Retardierung		
302905	unbekannt	CHARGE-Like	Hypospadie	Gaumenspalte	Iriskolobom, Taubheit,	keine mentale	Abruzzo und
		Syndrome			Kleinwuchs	Retardierung,	Erickson, 1977;
						keine	Abruzzo und
						Choanalatresie	Erickson, 1989
						(vgl. 214800)	
Fortsetzi	ung Tabelle 13 : A	uswahl von syndromalen	Erkrankungen, die mit	der Kombination v	l von Lippen-Kiefer-Gaumu	enspalten und Geni	l italfehlbildungen

Fortsetzung 10 einhergehen

Diskussion

Literatur		Khalifa et al.,	2002a ; Khalifa	und Cappon,	2002b							Fraccaro et al.,	1980; Zackai und	Emanuel, 1980				
Bemerkung		nur 3 Fälle	beschrieben, evtl.	Überlappung mit	Ritscher-	Schinzel	Syndrom	(220210)										
weitere	Fehlbildungen	Iriskolobom,	trianguläres Gesicht,	Hypertelorismus,	Brachycephalus,	auseinanderklaffende	Suturen und	Fontanellen, mentale	Retardierung,	hypoplastische und	fehlende Rippen	psychomotorische	Retardierung,	muskuläre Hypotonie	Ohrfehlbildungen,	Mikro-/Retrognathie,	Mikrocephalie,	Herzfehler
Gesichtsspalte		muköse	Gaumenspalte									Gaumenspalte						
Genitalfehlbildung		Hypospadie,	Skrotum bipartitium,	Kryptorchismus								Mikropenis,	Kryptorchismus					
Name		Cree Mental	Retardation Syndrome									Emanuel Syndrom	(Supernumerary	der(22) Syndrome)				
Genlocus		unbekannt										t(11;22)(q23;q1	1.2)	Translokation				
MIM		606351										609029						

Fortsetzung **Tabelle 13**: Auswahl von syndromalen Erkrankungen, die mit der Kombination von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten und Genitalfehlbildungen einhergehen

4.5 Auswahl der Patienten

In diese Untersuchung wurden Patienten eingeschlossen, die genitale Fehlbildungen und Spaltbildungen im Bereich der Lippe und des Gaumens aufwiesen. Klassischerweise sind Virilisierungsstörungen durch einen Defekt in der Steroidhormonbiosynthese, bzw. eine gestörte Umwandlung von Testosteron in Dihydrotestosteron, oder einen Defekt auf Ebene des Androgenrezeptors bedingt. Bei den untersuchten Patienten galt bei erfolgter molekulargenetischer Untersuchung des Androgenrezeptorgens und des für die 5 α -Reduktase Typ II kodierenden Gens SRD5A2 eine hier gefundene Mutation als Ausschlusskriterium. Hormonwerte waren nicht bei allen Patienten bestimmt worden, zum Teil fehlte die Dokumentation der Bestimmungsmethode. Bei den untersuchten Patienten Defekt in der Hormonbildung, noch durch gestörte Wirkung der Hormone am Androgenrezeptor zustande kam.

Aus den Patientenunterlagen ging hervor, dass bei keinem der Patienten bislang eine eindeutige Zuordnung zu einem bereits bekannten Syndrom gemacht werden konnte.

Bei zwei in die Studie eingeschlossenen Patienten bestand allerdings eine klinische Verdachtsdiagnose.

Bei dem Patienten ARD 251 bestand der Verdacht des Vorliegens eines Robinow-Syndroms. Das Robinow-Syndrom kann sowohl autosomal-dominant, als auch autosomalrezessiv vererbt werden. Die autosomal-rezessive Form kann durch Mutationen im sogenannten ROR2-Gen hervorgerufen werden (Afzal et al., 2000). Das Robinow-Syndrom ist charakterisiert durch Kleinwuchs, ein charakteristisches Gesicht (Hypertelorismus, prominente Stirn, dreieckiger Mund und kleiner Gesichtsschädel) und Genitalhypoplasie. Skelettanomalien, Herzfehler Nierenfehlbildungen, und psychomotorische Retardierung können Teil dieses Syndroms sein (Patton und Afzal, 2002; Kulkarni und Reddy, 2004). Eine Lippen-Kiefer-Gaumenspalte ist nicht als typisches Merkmal dieses Syndroms beschrieben (vergleiche MIM 268310 und MIM 180700). Bei dem Patienten ARD 251 sind einige der für das Robinow-Syndrom charakteristischen Fehlbildungen beschrieben. So liegt bei diesem Patienten eine Genitalhypoplasie, eine prominente Stirn und ein Hypertelorismus vor (vergleiche Tabelle 1), so dass die Verdachtsdiagnose Robinow-Syndrom weiter verfolgt werden muss.

Bei dem Patienten ARD 1229 wurde der Verdacht auf das Vorliegen eines CHARGE-Syndroms geäußert. In der Literatur werden unterschiedliche Kriterien aufgeführt, die für die Diagnose Bedeutung haben sollen. Verloes benennt in seiner Arbeit drei Haupt- und fünf Nebenkriterien. Hauptkriterien sind dabei das Kolobom, die Choanalatresie und die Fehlbildung des Vestibularorgans. Als Nebenkriterien gelten rhombenzephale Dysfunktion, hypothalamisch-hypophysäre Dysfunktion, Abnormalität des äußeren Ohres oder des Mittelohres, Fehlbildungen mediastinaler Organe und mentale Retardierung (Verloes, 2005). Um von einem typischen Fall eines CHARGE-Syndroms sprechen zu können, müssen laut Verloes alle drei Hauptkriterien oder zwei Hauptkriterien und zwei Nebenkriterien erfüllt sein. Bei dem Patienten ARD 1229 wird in den vorliegenden Unterlagen keines der drei Hauptkriterien beschrieben, so dass nach Verloes zumindest nicht von einem typischen CHARGE-Syndrom gesprochen werden kann (vergleiche auch Tabelle 1).

Zwei der in dieser Studie eingeschlossenen Patienten zeigten Auffälligkeiten im Karyogramm.

Bei dem Patienten ARD 1372 lag eine partielle Trisomie 3q vor. Analysen von Fehlbildungen, die im Zusammenhang mit Chromosomenanomalien auftraten, haben sowohl die Deletion als auch die Duplikation gezeigt, dass bestimmter Chromosomenabschnitte mit einer erhöhten Frequenz von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten einhergehen (Schutte und Murray, 1999). Die Duplikationen bestimmter Abschnitte des Chromosoms 3 (p26-21, q23-25) sind signifikant häufig mit einer Lippen- oder Gaumenspalte assoziiert (Brewer et al., 1999). Interessant ist zu bemerken, dass dieser Bereich (3p26-23 und 3q26-29) auch für die Entstehung eines Ventrikelseptumdefekts Bedeutung zu haben scheint und dieser Herzfehler bei diesem Patienten ebenfalls vorlag.

Su et al. beschreiben außerdem einen kleinen Patienten mit partieller Trisomie 3q, der neben anderen Missbildungen auch eine Gaumenspalte, Genitalhypoplasie und einen Ventrikelseptumdefekt aufwies (Su et al., 2004). Es ist daher denkbar, dass das phänotypische Erscheinungsbild des Patienten ARD 1372 im Zusammenhang mit der partiellen Trisomie steht.

Bei dem Patienten ARD 1503 bestand im Karyogramm ein 45,X0/46,XY Mosaik. Diese Mosaikform der Geschlechtschromosomen kann zur Gonadendysgenesie führen, also zum Fehlen funktionstüchtiger Keimzellen. Dadurch kann es zur Entwicklung eines intersexuellen Genitale kommen. Es kann sich aber auch ein komplett männlicher oder komplett weiblicher äußerer Phänotyp entwickeln, je nachdem welche Zelllinien dominieren (Migeon und Wisniewski, 2003). Interessant ist, dass bei dem Patienten ARD 1503 ein Pseudohermaphroditismus maskulinus vorlag, obwohl die Hormonwerte

(Testosteron basal und stimuliert und Androstendion) im Normalbereich lagen (vergleiche Tabelle 1).

Die Zuordnung eines Patienten mit komplexen Fehlbildungen gestaltet sich häufig schwierig. Dies liegt unter anderem daran, dass Syndrome häufig nicht streng definiert sind und nicht stets feste Einschluss- bzw. Ausschlusskriterien bestehen. Teilweise überlappen sich die klinischen Charakteristika oder es stellt sich heraus, dass vormals voneinander unabhängig klassifizierte Syndrome eigentlich als ein Syndrom zusammengefasst werden müssen. Aus oben genannten Gründen und mangels hinreichender Informationen über die klinische Erscheinung soll daher der Versuch unterbleiben, die in dieser Studie untersuchten Patienten einzelnen Syndromen zuzuordnen.

Die meisten der in dieser Arbeit neu beschriebenen molekulargenetischen Befunde können derzeit nicht eindeutig als Ursache für die Fehlbildungen der untersuchten Patienten verantwortlich gemacht werden. Sequenzvariationen, die in gleicher Häufigkeit sowohl bei Patienten als auch bei Normalkontrollen gefunden wurden, scheinen eher Polymorphismen ohne pathogene Wirkung darzustellen. Ob die Sequenzvariationen, die in dieser Studie nur bei Patienten und nicht bei den 20 untersuchten Normalkontrollen gefunden wurden, eine bedeutende Auswirkung auf die Proteinentstehung und letztlich auf den Phänotyp der entsprechenden Patienten hat, konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. An dieser Stelle müssten sich Folgeuntersuchungen anschließen (vergleiche auch Abschnitt 4.2). Es bleiben damit viele Fragen offen. So ist es außerdem möglich, dass Mutationen im FOXF2-Gen mit den hier benutzten Methoden übersehen wurden. Es könnte aber auch sein, dass das Gen bei Menschen andere Gene eine überlappende Funktion, so dass der Ausfall des FOXF2-Gens für den Menschen ohne Bedeutung ist.

Da die Kombination von Genitalfehlbildungen und Lippen-Kiefer-Gaumenspalten relativ selten ist, ist das untersuchte Patientenkollektiv klein. Außerdem wurde in der Diskussion gezeigt, dass es viele mehr oder weniger gut untersuchte syndromale Erkrankungen gibt, die mit diversen Fehlbildungen einhergehen können. Es ist daher nicht ausgeschlossen, dass bei der Analyse eines größeren Patientenkollektivs pathogen wirkende Mutationen im FOXF2-Gen gefunden werden können, die mit dem Vorhandensein von Genitalfehlbildungen und Lippen-Kiefer-Gaumenspalte korrelieren.

5. Zusammenfassung

Die Geschlechtsentwicklung stellt einen komplexen Vorgang dar und unterteilt sich in die Geschlechtsdeterminierung und -differenzierung. Während der Geschlechtsdeterminierung entwickelt sich die bipotente Gonadenanlage des Embryos zu Hoden oder Ovarien. Dieser einer Vielzahl Prozess ist abhängig von unterschiedlicher Gene. Die Geschlechtsdifferenzierung beschreibt die Ausdifferenzierung der Geschlechtsorgane unter dem Einfluss der Sexualhormone. Störungen der Geschlechtsentwicklung können zu jedem Zeitpunkt auftreten und zeigen je nach Zeitpunkt und Art der Schädigung ein vielfältiges klinisches Bild. Auch wenn das Wissen über den Vorgang der Geschlechtsentwicklung und das Zusammenspiel der einzelnen Faktoren ständig wächst, so ist dieser komplexe Prozess längst nicht vollständig verstanden. Es gibt daher noch viele Fälle von Patienten mit Genitalfehlbildungen, bei denen die Ursache bislang unbekannt bleibt. Diese Patienten zeigen teilweise weitere komplexe Fehlbildungen, unter anderem auch Lippen-Kiefer-Gaumenspalten. Es kann vermutet werden, dass es weitere Faktoren gibt, die sowohl für die Geschlechtsentwicklung, als auch für die Entwicklung anderer Organe relevant sind. Auch die Ursachen für die Entwicklung von Lippen-Kiefer-Gaumenspalten sind vielfältig und häufig bleibt die Ätiologie ungeklärt. Auf der Suche nach neuen Kandidatengenen für die Geschlechtsentwicklung fiel in der Microarrayanalyse das FOXF2-Gen als in Zellen des menschlichen Genitalhöckers überexprimiert auf. Foxf2-Knock-out-Mäuse zeigten darüber hinaus eine Genitalhypoplasie zusammen mit einer Gaumenspalte. Daraus leitete sich die Frage ab, ob bei Patienten mit Genitalfehlbildungen und Lippen-Kiefer-Gaumenspalte ein Defekt im FOXF2-Gen vorliegt.

In dieser Studie wurden 18 Patienten mit Genitalfehlbildungen und Lippen-Kiefer-Gaumenspalte und teilweise weiteren Fehlbildungen molekulargenetisch auf einen Defekt im FOXF2-Gen untersucht. Mittels SSCP-Analyse wurde der gesamte kodierende Bereich sowie die Exon-Intron-Übergänge des FOXF2-Gens untersucht. Bei Auffälligkeiten in der SSCP-Analyse schloss sich die Sequenzierung entsprechender Bereiche an. Es konnten mehrere Veränderungen der DNA-Sequenz gefunden werden. Bei der Analyse von 20 Normalkontrollen konnten dieses Veränderungen zum größten Teil auch bei diesen gefunden werden. Zwei Sequenzvariationen wurden jedoch ausschließlich bei Patienten gefunden. Ob diese Veränderungen der DNA mit dem Phänotyp der beiden Patienten korrelieren, konnte nicht abschließend geklärt werden. Hier müssten sich Folgeuntersuchungen anschließen, um die Relevanz der Sequenzänderungen genauer zu charakterisieren.

6. Literaturverzeichnis

Abruzzo, M. A. und Erickson, R. P.: *Case report: A new syndrome of cleft palate associated with coloboma, hypospadias, deafness, short stature, and radial synostosis.* J Med Genet 14: 76-80, 1977

Abruzzo, M. A. und Erickson, R. P.: *Re-Evaluation of New X-Linked Syndrome for Evidence of CHARGE Syndrome or Association*. Am J Med Genet 34: 397-400, 1989

Achermann, J. C., Ito, M., Ito, M., Hindmarsh, P. C. und Jameson, L.: A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. Nat Genet 22: 125-126, 1999

Afzal, A. R., Rajab, A., Fenske, C. D., Oldrige, M., Elanko, N., Ternes-Pereira, E., Tüysüz, B., Murday, V. A., Patton, M. A., Wilkie, A. O. M. und Jeffery, S.: *Recessive Robinow syndrome, allelic to dominant brachydactyly type B, is caused by mutation of ROR2*. Nat Genet 25: 419-422, 2000

Ahmed, S. F., Cheng, A., Dovey, L., Hawkins, R. J., Martin, H., Rowland, J., Shimura, N., Tait, A. D. und Hughes, I. A.: *Phenotypic Features, Androgen Receptor Binding, and Mutational Analysis in 278 Clinical Cases Reported as Androgen Insensitivity Syndrome.* J Clin Endocrinol Metab 85: 658-665, 2000

Aitola, M., Carlsson, P., Mahlapuu, M., Enerbäck, S. und Pelto-Huikko, M.: Forkhead Transcription Factor FoxF2 Is Expressed in Mesodermal Tissues Involved in Epithelio-Mesenchymal Interactions. Dev Dyn 218: 136-149, 2000

Bahuau, M., Houdayer, C., Tredano, M., Soupre, V., Couderc, R. und Vazquez, M.-P.: *FOXC2 truncating mutation in distichiasis, lymphedema, and cleft palate*. Clin Genet 62: 470-473, 2002

Balling, R.: *Die Maus als Modellsystem f
ür menschliche Erkrankungen* W. Seyffert.Lehrbuch der Genetik. 2, 1022-1024 Spektrum Akademischer Verlag. Heidelberg.

Baralle, D. und Baralle, M.: *Splicing in action: assessing disease causing sequence changes.* J Med Genet 42: 737-748, 2005

Barsh, G.: From Agouti to Pomc-100 years of fat blonde mice. Nat Med 5: 984-985, 1999

Bassam, B. J., Caetano-Anolles, G. und Gresshoff, P. M.: *Fast and Sensitive Silver Staining of DNA in Polyacrylamide Gels*. Anal Biochem 196: 80-83, 1991

Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L. und Kelly, E.: *The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3*. Nat Genet 27: 20-21, 2001

Berry, F. B., Tamimi, Y., Carle, M., Lehmann, O. J. und Walter, M. A.: *The establishment* of a predictive mutational model of the forkhead domain through the analyses of FOXC2 missense mutations identified in patients with hereditary lymphedema with distichiasis. Hum Mol Genet 14: 2619-2627, 2005

Biason-Lauber, A., Leiberman, E. und Zachmann, M.: A Single Amino Acid Substitution in the Putative Redox Partner-Binding Site of P450c17 as Cause of Isolated 17,20-Lyase Deficiency. J Clin Endocrinol Metab 82: 3807-3812, 1997

Biason-Lauber, A., Konrad, D., Navratil, F. und Schoenle, E. J.: *A WNT4 Mutation Associated with Mullerian-Duct Regression and Virilization in a 46,XY Woman*. N Engl J Med 351: 792-798, 2004

Blackless, M., Charuvastra, A., Derryck, A., Fausto-Sterling, A., Lauzanne, K. und Lee,
E.: *How Sexually Dimorphic Are We? Review and Synthesis*. Am J Hum Biol 12: 151-166, 2000

Blixt, A., Mahlapuu, M., Bjursell, C., Darnfors, C., Johannesson, T., Enerbäck, S. und Carlsson, P.: *The Two-Exon Gene of the Human Forkhead Transcrition Faktor FREAC-2* (*FKHL6*) *Is Located at 6p25.3*. Genomics 53: 387-390, 1998

Blixt, A., Mahlapuu, M., Aitola, M., Pelto-Huikko, M., Enerbäck, S. und Carlsson, P.: *A forkhead gene, FoxE3, is essential for lens epithelial proliferation and closure of the lens vesicle*. Genes Dev 14: 245-254, 2000

Bose, H. S., Sugawara, T., Strauss, J. F. I. und Miller, W. L.: *The pathophysiology and genetics of congenital lipoid adrenal hyperplasia*. N Engl J Med 335: 1870-1878, 1996

Bose, H. S., Sato, S., Aisenber, J., Shalev, S. A., Matsuo, N. und Miller, W. L.: *Mutations in the Steroidogenic Acute Regulatory Protein (StAR) in Six Patients with Congenital Lipoid Adrenal Hyperplasia.* J Clin Endocrinol Metab 85: 3636-3639, 2000

Brewer, C., Holloway, S., Zawalnyski, P., Schinzel, A. und FitzPatrick, D.: *A chromosomal duplication map of malformations: regions of suspected haplo- and triplolethality-and tolerance of segmental aneuploidy-in humans*. Am J Hum Genet 64: 1702-1708, 1999

Brunkow, M. E., Jeffery, E. W., Hjerrild, K. A., Paeper, B., Clark, L. B., Yasayko, S.-A., Wilkinson, J. E., Galas, D., Ziegler, S. F. und Ramsdell, F.: *Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfin, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse*. Nat Genet 27: 68-73, 2001

Canto, P., Söderlund, D., Reyes, E. und Mendez, J. P.: *Mutation in the Desert hedgehog* (*DHH*) *Gene in Patients with 46,XY Complete Pure Gonadal Dysgenesis*. J Clin Endocrinol Metab 89: 4480-4483, 2004

Cartegni, L., Hastings, M. L., Calarco, J. A., de Stanchina, E. und Krainer, A. R.: *Determinants of Exon 7 Splicing Muscular Atrophy Genes, SMN1 and SMN2*. Am J Hum Genet 78: 63-77, 2006

Castanet, M., Park, S.-M., Smith, A., Bost, M., Leger, J., Lyonnet, S., Pelet, A., Czerichow, P., Chatterjee, K. und Polak, M.: *A novel loss-of-function mutation in TTF-2 is associated with congenital hypothyroidism, thyroid agenesis and cleft palate*. Hum Mol Genet 11: 2051-2059, 2002 Choi, J.-S., Kim, J.-S., Joe, C.-O., Kim, S., Ha, K.-S. und Park, Y.-M.: *Improved cycle* sequencing of GC-rich DNA template. Exp Mol Med 31: 20-24, 1999

Clifton-Bligh, R. J., Wentworth, J. M. und Heinz, P.: *Mutation of the gene encoding human TTF-2 associated with thyroid agenesis, cleft palate and choanal atresia.* Nat Genet 19: 399-401, 1998

Coppes, M. J., Huff, V. und Pelletier, J.: *Denys-Drash syndrom: Relating a clinical disorder to genetic alterations in the tumor suppressor gene WT1*. J Pediatr 123: 673-678, 1993

Couse, J. F. und Korach, K. S.: *Exploring the role of sex steroids through studies of receptor deficient mice*. J Mol Med 76: 497-511, 1998

Crisponi, G., Marras, A. R. und Corrias, A.: *Brief Clinical Report: Two Sibs With Malpuech Syndrome*. Am J Med Genet 86: 294-299, 1999

Crisponi, L., Deiana, M., Loi, A., Chiappe, F., Uda, M., Amati, P., Bisceglia, L. und Zelante, L.: *The putative forkhead transcription factor FOXL2 is mutated in blepharophimosis/ptosis/epicanthus inversus syndrome*. Nat Genet 27: 159-166, 2001

De Falco, F., Cainarca, S., Andolfi, G., Ferrentino, R., Berti, C., Criado, G. R., Rittinger, O., Dennis, N., Odent, S., Rastogi, A., Liebelt, J., Chitayat, D., Winter, R., Jawanda, H., Ballabio, A., Franco, B. und Meroni, G.: *X-Linked Opitz Syndrome: A Novel Mutation in the MID1 Gene and Redefinition of the Clinical Spectrum*. Am J Med Genet 120A: 222-228, 2003

De Felice, M., Ovitt, C., Biffali, E., Rodriguez-Mallon, A., Arra, C., Anastassiadis, K., Macchia, P. E., Mattei, M.-G., Mariano, A., Schöler, H., Maccia, V. und Di Lauro, R.: *A mouse model for hereditary thyroid dysgenesis and cleft palate*. Nat Genet 19: 395-398, 1998

De Muynck, S., Schollen, E., Matthijs, G., Verdonck, A., Devriendt, K. und Carels, C.: *A Novel MSX1 Mutation in Hypodontia*. Am J Med Genet 128A: 401-403, 2004

de Santa Barbara, P., Moniot, B., Poulat, F., Boizet, B. und Berta, P.: *Steroidogenic Factor-1 Regulates Transcription of the Human Anti-müllerian Hormone Receptor*. J Biol Chem 273: 29654-29660, 1998

di Cerbo, A., Biason-Lauber, A., Savino, M., Piemontese, M. R., di Giorgio, A., Perona, M. und Savoia, A.: *Combined 17α-Hydroxylase/17,20-Lyase Deficiency Caused by Phe93Cys Mutation in the CYP 17 Gene.* J Clin Endocrinol Metab 87: 898-905, 2002

Dörr, H. G.: *Störungen der Nebennieren* K. Kruse. Pädiatrische Endokrinologie. 2. Auflage, Seite: 73-110 Georg Thieme Verlag. Stuttgart.

Enard, W., Prezworski, M., Fisher, S. E., Lai, C. S. L., Wiebe, V., Kitano, T., Monaco, A. P. und Pääbo, S.: *Molecular evolution fo FOXP2, a gene involved in speech and language*. Nature 418: 869-872, 2002

Fan, E., Levin, D. B., Glickman, B. W. und Logan, D. M.: *Limitations in the use of SSCP analysis*. Mutat Res 288: 85-92, 1993

Fleming, A. und Vilain, E.: *The endless quest for sex determination genes*. Clin Genet 67: 15-25, 2004

Fraccaro, M., Lindsten, J., Ford, C. E. und Iselius, L.: *The 11q;22q Translocation: A European Collaborative Analysis of 43 Cases*. Hum Genet 56: 21-51, 1980

Frank, J., Pignata, C., Panteleyev, A. A., Prowse, D. M. und Baden, H.: *Exposing the human nude phenotype*. Nature 398: 473-474, 1999

Giannotti, A., Digilio, M. C., Mingarelli, R. und Dallapiccola, B.: *An autosomal recessive syndrome of cleft palate, cardiac defect, genital anomalies, and ectrodactyly (CCGE)*. J Med Genet 32: 72-74, 1995

Greenberg, F., Gresik, M. V., Carpenter, R. J., Law, S. W., Hoffmann, L. P. und Ledbetter, D. H.: *The Gardner-Silengo-Wachtel or Genito-Palato-Cardiac Syndrome: Male*

Pseudohermaphroditism With Micrognathia, Cleft Palate, and Conotruncal Cardiac Defect. Am J Med Genet 26: 59-64, 1987

Hatini, V., Huh, S. O., Herzlinger, D., Soares, V. C. und Lai, E.: *Essential role of stromal mesenchyme in kidney morphogenesis revealed by targeted disruption of Winged Helix transcription factor BF-2.* Genes Dev 10: 1467-78, 1996

Hauffa, B. P.: *Klinische und laboranalytische Messwerte* H. Stolecke. Endokrinologie des Kindes- und Jungendalters. 2, Springer Verlag. Berlin- Heidelberg- New York.

Hayashi, K.: *PCR-SSCP: A Simple and Sensitive Method for Detection of Mutations in the Genomic DNA*. PCR Methods Appl 1: 34-38, 1991

Hayashi, K. und Yandell, D. W.: *How Sensitive Is PCR-SCCP?* Hum Mutat 2: 338-346, 1993

Hegde, P., Qi, R., Abernathy, K., Gay, C., Dharap, S., Gaspard, R., Hughes, J. E., Snesrud,E., Lee, N. und Quackenbush, J.: A Concise Guide to cDNA Mikroarray Analysis.Biotechniques 29: 548-562, 2000

Heikkilä, M., Prunskaite, R., Naillat, F., Itäranta, P., Vuoristo, J., Leppäluoto, J., Peltoketo,
H. und Vainio, S.: *The Partial Female to Male Sex Reversal in Wnt-4-Deficient Females Involes Induced Expression of Testosterone Biosynthetic Genes and Testosterone Production, and Depends on Androgen Action.* Endocrinology 146: 4016-4026, 2005

Hellqvist, M., Mahlapuu, M., Samuelsson, L., Enerbäck, S. und Carlsson, P.: *Differential Activation of Lung-specific Genes by Two Forkhead Proteins, FREAC-1 and FREAC-2.* J Biol Chem 271: 4482-4490, 1996

Hellqvist, M., Mahlapuu, M., Blixt, A., Enerbäck, S. und Carlsson, P.: *The Human Forkhead Protein FREAC-2 Contains Two Functionally Redundant Activation Domains and Interacts with TBP and TFIIB.* J Biol Chem 273: 23335-23343, 1998 Hellwinkel, O. J.-C., Holterhus, P.-M., Struve, D., Marschke, C., Homburg, N. und Hiort,
O.: A Unique Exonic Splicing Mutation in the Human Androgen Receptor Gene Indicates a Physiologic Relevance of Regular Androgen Receptor Transcript Variants. J Clin
Endocrinol Metab 86: 2569-2575, 2001

Hiort, O.: Vom Genotyp zum Phänotyp: Molekulargenetische Diagnostik bei Intersexualität. Monatsschr Kinderheilkd 146: 86-91, 1998

Hiort, O., Holterhus, P.-M., Sinnecker, G. H. G. und Kruse, K.: *Androgenresistenzsyndrom- Klinische und molekulare Grundlagen*. Deutsches Ärzteblatt 96(Heft119): A-686-692, B-526-531, C-484-489, 1999

Hiort, O. und Holterhus, P.-M.: *The molecular basis of male sexual differentiation*. Eur J Endocrinol 142: 101-110, 2000

Hiort, O., Holterhus, P.-M., Werner, R., Marschke, C., Hoppe, U., Partsch, C.-J., Riepe, F.
G., Achermann, J. C. und Struve, D.: *Homozygous Disruption of P450 Side-Chain Cleavage (CYP11A1) Is Associated with Prematurity, Complete 46,XY Sex Reversal, and Severe Adrenal Failure*. J Clin Endocrinol Metab 90: 538-541, 2005

Holterhus, P.-M., Hiort, O., Demeter, J., Brown, P. O. und Brooks, J. D.: *Differential geneexpression patterns in genital fibroblasts of normal males and 46,XY females with androgen insensitivity syndrom: evidence for programming involving the androgen receptor.* Genome Biol 4: Article R37, 2003

Hughes, I. A., Houk, C., Ahmed, S. F., Lee, P. A. und Group, L. E. C.: *Consensus* statement on the management of intersex disorders. Arch. Dis. Child. 91: 554-563, 2006

Hulander, M., Wurst, W., Carlsson, P. und Enerbäck, S.: *The winged helix transcription factor Fkh10 is required for normal development of the inner ear*. Nat Genet 20: 374-376, 1998

Jackson, I. J.: *Homologous pigmentation mutations in human, mouse and other model organisms*. Hum Mol Genet 6: 1613-1624, 1997

Jacobson, Z., Glickstein, J., Hensle, T. und Marion, R. W.: Further Delineation of the Opitz G/BBB Syndrome: Report of an Infant With Complex Congenital Heart Disease and Bladder Exstrophy, and Review of the Literature. Am J Med Genet 78: 294-299, 1998

Josso, N., di Clemente, N. und Gouedard, L.: *Anti-müllerian hormone and its receptors*. Mol Cell Endocrinol 179: 25-32, 2001

Joss, S. K., Paterson, W., Donaldson, M. D. C. und Tolmie, J. L.: *Cleft Palate, Hypotelorism, and Hypospadias: Schilbach-Rott Syndrome*. Am J Med Genet 113: 105:107, 2002

Kaestner, K. H., Knöchel, W. und Martinez, D. E.: Unified nomenclature for the winged helix/forkhead transcription factors. Genes Dev 14: 142-146, 2000

Katoh, M. und Katoh, M.: Human FOX gene family. Int J Oncol 25: 1495-1500, 2004

Kaufmann, E. und Knöchel, W.: *Five years on the wings of fork head*. Mech Dev 57: 3-20, 1996

Khalifa, M. M., Cappon, S., Soboleski, D. und Armstrong, D.: *Clinical Report: New Mental Retardation Syndrome Associated With Ocular Colobomas, Cleft Palate, and Genital, Skeletal, and Craniofacial Abnormalities.* Am J Med Genet 107: 237-242, 2002a

Khalifa, M. M. und Cappon, S.: *Reply to the Letter to the Editor by Chodirker et al.-"A Not So 'New' Mental Retardation Syndrome"*. Am J Med Genet 111: 107-108, 2002b

Knower, K. C., Kelly, S. und Harley, V. R.: *Turning on the male- SRY, SOX9 and sex determination in mammals*. Cytogenet Genome Res 101: 185-198, 2003

Kobayashi, A. und Behringer, R. R.: *Developmental Genetics of the Female Reproductive Tract in Mammals*. Nat Rev Genet 4: 969-980, 2003 Kobayashi, A., Shawlot, W., Kania, A. und Behringer, R. R.: *Requirement of Lim1 for femal reproductive tract development*. Development 131: 539-549, 2004

Kreidberg, J. A., Sariola, H., Loring, J. M., Maeda, M., Pelletier, J., Housman, D. und Jaenisch, R.: *WT-1 Is Required for Early Kidney Development*. Cell 74: 679-691, 1993

Kulkarni, M. L. und Reddy, S.: *Images in Clinical Practice- Robinow Syndrome*. Indian Pediatr 41: 89, 2004

Kume, T., Deng, K.-Y., Winfrey, V., Gould, D. B., Walter, M. A. und Hogan, B. L. M.: *The Forkhead/Winged Helix Gene Mf1 Is Disrupted in the Pleiotropic Mouse Mutation congenital hydrocephalus*. Cell 93: 985-996, 1998

Kume, T., Deng, K.-Y. und Hogan, B. L. M.: *Minimal Phenotyp of Mice Homozygous for* a Null Mutation in the Forkhead/Winged Helix Gene, Mf2. 2000

Kunst, C. B., Leeflang, E. P., Iber, J. C., Arnheim, N. und Warren, S.: *The effect of FMR1 CGG repeat interruptions on mutation frequency as measured by sperm typing*. J Med Genet 34: 627-631, 1997

Lanz, K.: Epidemiologie der Intersexualität und Genitalfehlbildungen bei Neugeborenen in Deutschland. Med. Diss. Lübeck, 2004

Lee, M. M. und Donahoe, P. K.: *Mullerian Inhibiting Substance: A Gonadal Hormone with Multiple Functions*. Endocr Rev 14: 152-164, 1993

Lehmann, O. J., Ebenezer, N. D., Jordan, T., Fox, M., Ocaka, L., Payne, A., Leroy, B. P., Clark, B., Hitchings, R. A., Povey, S., Khaw, P. T. und Bhattacharya, S. S.: *Chromosomal Duplication Involving the Forkhead Transcription Factor Gene FOXC1 Causes Iris Hypoplasia and Glaucoma*. Am J Hum Genet 67: 1129-1135, 2000

Lidral, A. C., Romitti, P. A., Basart, A. M. und Doetschmann, T.: *Association of MSX1 and TGFB3 with Nonsyndromic Clefting in Humans*. Am J Hum Genet 63: 557-568, 1998

Lim, H. N. und Hawkins, R. J.: *Genetic control of gonadal differentiation*. Baillieres Clin Endocrinol Metab 12: 1-16, 1998

Lim, H. N., Chen, H., McBride, S., Dunning, A. M., Nixon, R. M., Hughes, I. A. und Hawkins, R. J.: *Longer polyglutamine tracts in the androgen receptor are associated with moderate to severe undermasculinized genitalia in XY males.* Hum Mol Genet 9: 829-934, 2000

Lin, A. E., Siebert, J. R. und Graham, J. M.: *Central Nervous System Malformation in the CHARGE Association*. Am J Med Genet 37: 304-310, 1990

Little, S., Hanks, S., King-Underwood, L., Picton, S., Cullinane, C., Rapley, E., Rahman, N. und Pritchard-Jones, K.: *A WT1 exon 1 mutation in a child diagnosed with Denys-Drash syndrome*. Pediatr Nephrol 20: 81-85, 2005

MacDermot, K. D., Bonora, E., Sykes, N., Coupe, A.-M., Lai, C. S. L., Vernes, S. C., Vargha-Khadem, F. und McKenzie, F.: *Identification of FOXP2 Truncation as a Novel Cause of Developmental Speech and Language Deficits*. Am J Hum Genet 76: 1074-1080, 2005

MacLaughlin, D. T. und Donahoe, P. K.: *Sex Determination and Differentiation*. N Engl J Med 350: 367-378, 2004

Mahlapuu, M.: Forkhead transcription factors in mammalian development. Med. Diss. Göteborg, 2001a

Mahlapuu, M., Ormestad, M., Enerbäck, S. und Carlsson, P.: *The forkhead transcription factor Foxf1 is required for differentiation of extraembryonic and lateral plate mesoderm*. Development 128: 155-166, 2001b

Mallet, D., Bretones, P., Michel-Calemard, L., Dijoud, F., David, M. und Morel, Y.: Gonadal Dysgenesis Without Adrenal Insufficiency in a 46,XY Patient Heterozygous for the Nonsense C16X Mutation: A Case of SF1 Haploinsufficiency. J Clin Endocrinol Metab 89: 4829-4832, 2004 Malpuech, G., Demeocq, F., Palcoux, J. B. und Vanlieferinghen, P.: A Previously Undescribed Autosomal Recessive Multiple Congenital Anomalis/Mental Retardation (MCA/MR) Syndrome With Growth Failure, Lip/Palate Cleft(s), and Urogenital Anomalies. Am J Med Genet 16: 475-480, 1983

Mears, A. J., Jordan, T., Mirzayans, F., Dubois, S., Kume, T. und Parlee, M.: *Mutations of the Forkhead/Winged-Helix Gene, FKHL7, in Patients with Axenfeld-Rieger Anomaly.* Am J Hum Genet 63: 1316-1328, 1998

Medina-Martinez, O., Brownell, I., Amaya-Manzanares, F., Hu, Q., Behringer, R. R. und Jamrich, M.: *Sever defects in proliferation and differentiation of lens cells in Foxe3 null mice*. Mol Cell Biol 25: 8854-8863, 2005

Migeon, C. J. und Wisniewski, A. B.: *Human sex differentiation and its abnormalities*. Best Pract Res Clin Obstet Gynaecol 17: 1-18, 2003

Mingarelli, R., Zuccarello, D., Digilio, M. C. und Dallapiccola, B.: *A New Observation of Acro-Cardio-Facial Syndrome Substantiates Interindividuel Clinical Variability*. Am J Med Genet 136A: 84-86, 2005

Mizusaki, H., Kawabe, K., Mukai, T. und Ariyoshi, E.: *Dax-1 (Dosage-Sensitive Sex Reversal-Adrenal Hypoplasia Congenita Critical Region on the X Chromosome, Gene 1) Gene Transcription Is Regulated by Wnt4 in the Female Developing Gonade*. Mol Endocrinol 17: 507-519, 2003

Mullis, K. B. und Faloona, F. A.: *Specific Synthesis of DNA in Vitro via a Polymerase-Catalyzed Chain Reaction*. Methods Enzymol 155: 335-350, 1987

Myers, R. H.: Huntington's Disease Genetics. J Am Soc Exp Neur Ther 1: 255-262, 2004

Nef, S. und Parada, L. F.: *Hormones in male sexual development*. Genes Dev 14: 3075-3086, 2000

Nehls, M., Pfeifer, D., Schorpp, M., Hedrich, H. und Boehm, T.: *New member of the winged-helix protein family disrupted in mouse and rat nude mutations*. Nature 372: 103-106, 1994

Orita, M., Suzuki, Y., Sekiya, T. und Hayashi, K.: *Rapid and Sensitive Detection of Point Mutations and DNA Polymorphisms Using the Polymerase Chain Reaction*. Genomics 5: 874-879, 1989

Ormestad, M., Astorga, J. und Carlsson, P.: *Differences in the Embryonic Expression Patterns of Mouse Foxf1 and -2 Match Their Distinct Mutant Phenotypes*. Dev Dyn 229: 328-333, 2004

Ottolenghi, C., Omari, S., Garcia-Ortiz, E. J., Uda, M., Crisponi, L., Forabosco, A., Pilia, G. und Schlessinger, D.: *Foxl2 is required for commitment to ovary differentiation*. Hum Mol Genet 14: 2053-2062, 2005

Oziski, G., Achermann, J. C., Meeks, J. J. und Jameson, L.: *SF1 in the Development of the Adrenal Gland and Gonads*. Horm Res 59: 94-98, 2003

Pagon, R., Graham, J. M., Zonana, J. und Yong, S.-L.: *Coloboma, congenital heart disease, and choanal atresia with multiple anomalies: CHARGE association.* J Pediatr 99: 223-227, 1981

Parker, K. L., Schimmer, B. P. und Schedl, A.: *Genes essential for early events in gonadal development*. Cell Mol Life Sci 55: 831-838, 1999

Patton, M. A. und Afzal, A. R.: Robinow syndrome. J Med Genet 39: 305-310, 2002

Pelletier, J., Bruening, W., Kashtan, C. E., Mauer, M., Manivel, J. C., Striegel, J. E. und Houghton, D. C.: *Germline Mutations in the Wilms` Tumor Suppressor Gene Are Associated with Abnormal Urogenital Development in Denys-Drash Syndrom*. Cell 67: 437-447, 1991 Penning, T. M.: *Molecular Endocrinology of Hydroxysteroid Dehydrogenases*. Endocr Rev 18: 281-305, 1997

Pierrou, S., Hellqvist, M., Samuelsson, L., Enerbäck, S. und Carlsson, P.: *Cloning and characterization of seven human forkhead proteins: binding site specificity and DNA bending*. EMBO J 13: 5002-5012, 1994

Ross, A. J. und Capel, B.: *Signaling at the crossroads of gonad development*. Trends Endocrinol Metab 16: 19-25, 2005

Sadler, T. W. Medizinische Embryologie.9. Auflage, Stuttgart, Georg Thieme Verlag 1998.

Saleem, R. A., Murphy, T. C., Liebmann, J. M. und Walter, M. A.: *Identification and Analysis of a Novel Mutation in the FOXC1 Forkhead Domain*. Invest Ophthalmol Vis Sci 44: 4608-4612, 2003a

Saleem, R. A., Banerjee-Basu, S., Berry, F. B., Baxevanis, A. D. und Walter, M. A.: Structural and functional analyses of disease-causing missense mutations in the forkhead domain of FOXC1. Hum Mol Genet 12: 2993-3005, 2003b

Sanger, F., Nicklen, S. und Coulson, A. R.: *DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors*. Proc Natl Aca Sci 74: 5463-5467, 1977

Schilbach, U. und Rott, H. D.: Ocular Hypotelorism, Submucosal Cleft Palate, and Hypospadias: A New Autosomal Dominant Syndrome. Am J Med Genet 31: 863-870, 1988

Schrander, J., Schrander-Stumpel, C., Berg, J. und Frias, J. L.: *Opitz BBBG syndrome: new family with late-onset, serious complication*. Clin Genet 48: 76-79, 1995

Schutte, B. C. und Murray, J. C.: *The many faces and factors of orofacial clefts*. Hum Mol Genet 8: 1853-1859, 1999

Sedano, H. O. und Gorlin, R. J.: *Opitz Oculo-Genital-Laryngeal Syndrome (Opitz-BBB/G Compound Syndrome)*. Am J Med Genet 30: 847-849, 1988

Semina, E. V., Brownell, I., Mintz-Hittner, H. A., Murray, J. C. und Jamrich, M.: *Mutations in the forkhead transcription factor FOXE3 associated with anterior segment ocular dysgenesis and cataracts.* Hum Mol Genet 10: 231-236, 2001

Shu, W., Cho, J., Jiang, Y., Zhang, M., Weisz, D., Elder, G. A., Schmeidler, J., De Gasperi, R., Sosa, M. A. G., Rabidou, D., Santucci, A., Perl, D., Morrisey, E. und Buxbaum, J. D.: *Altered ultrasonic vocalization in mice with a disruption in the Foxp2 gene*. Proc Natl Acad Sci USA 102: 9643-9648, 2005

Silengo, M., Kaufman, R. L. und Kissane, J.: A 46,XY Infant with Uterus, Dysgenetic Gonads and Multiple Anomalies. Humangenetik 25: 65-68, 1974

Sinnecker, G. H. G.: *Störung der Keimdrüsen und der sexuellen Entwicklung* K. Kruse. Pädiatrische Endokrinologie. 2. Auflage, Seite:167-226 Thieme. Stuttgart.

Smith, R. S., Zabaleta, A., Kume, T., Savinova, O. V., Kidson, S. H., Martin, J. E., Nishimura, D. Y., Alward, W. L. M., Hogan, B. L. M. und John, S. W. M.: *Haploinsufficiency of the transcription factors FOXC1 and FOXC2 results in aberrant ocular development*. Hum Mol Genet 9: 1021-1032, 2000

Spinardi, L., Raoul, M. und Theillet, C.: *Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP*. Nucleic Acids Res 19: 4009, 1991

Stanier, P. und Moore, G. E.: *Genetics of cleft lip and palate: syndromic genes contribute to the incidence of non-syndromic clefts.* Hum Mol Genet 13: R73-R81, 2004

Stavrou, S. S., Zhu, Y.-S., Cai, L.-Q., Katz, M. D., Herrera, C., Defillo-Ricart, M. und Imperto-McGinley, J.: *A Novel Mutation of the Human Luteinizing Hormone Receptor in 46XY and 46XX Sisters*. J Clin Endocrinol Metab 83: 2091-2097, 1998

Stevens, C. A. und Wilroy, R. S.: *The telecanthus-hypospadias syndrome*. J Med Genet 25: 536-542, 1988

Strachan, T. und Read, A. P.: *Die Instabilität des menschlichen Genoms: Mutationen und DNA-Reparatur*. Molekulare Humangenetik. 3, Elsevier GmbH. München.

Su, P.-H., Chen, J.-Y., Chen, S.-J. und Hung, H.-M.: *Partial duplication of 3q and distal deletin of 10q inherited from a maternal balanced translocation*. J Formos Med Assoc 103: 853-857, 2004

Tajima, T., Fujieda, K., Kouda, N. und Miller, W. L.: *Heterozygous mutation in the choletsterol side chain cleavage enzyme (P450scc) gene in a patient with 46,XY sex reversal and adrenal insufficiency*. J Clin Endocrinol Metab 86: 3820-3825, 2001

Tellier, A. L., Cormier-Daire, V., Abadie, V., Amiel, J., Sigaudy, S., Bonnet, D., de
Lonlay-Debeney, P., Morriseau-Durand, M. P., Hubert, P., Michel, J. L., Jan, D., Dollfus,
H., Baumann, C., Labrune, P., Lacombe, D., Philip, N., LeMerrer, M., Briard, M. L.,
Munnich, A. und Lyonnet, S.: *CHARGE Syndrome: Report of 47 Cases and Review*. Am J
Med Genet 76: 402-409, 1998

Themmen, A. P. N. und Huhtaniemi, I. T.: *Mutations of Gonadotropins and Gonadotropin Receptors: Elucidatin the Physiology and Pathophysiology of Pituitary-Gonadal Function*. Endocr Rev 21: 551-583, 2000

Tolarova, M. M. und Cervenka, J.: *Classification and Birth Prevalence of Orofacial Clefts*. Am J Med Genet 75: 126-137, 1998

Twesten, W., Holterhus, P.-M., Sippell, W. G., Morlot, M., Schumacher, H., Schenk, B. und Hiort, O.: *Clinical, Endocrine, and Molecular Genetic Findings in Patients with 17beta-Hydroxysteroid Dehydrogenase Deficiency*. Horm Res 53: 26-31, 2000

Uda, M., Ottolenghi, C., Crisponi, L., Garcia, J. E., Deiana, M., Kimber, W., Forabosco, A., Cao, A., Schlessinger, D. und Pilia, G.: *Foxl2 disruption causes mouse ovarian failure by pervasive blockage of follicle development*. Hum Mol Genet 13(11): 1171-1181, 2004

Umehara, F., Tate, G., Itoh, K., Yamaguchi, N., Douchi, T., Mitsuya, T. und Osame, M.: *A novel mutation of desert hedgehog in a patient with 46,XY gonadal dysgenesis accompanied by minifascicular neuropathy.* Am J Hum Genet 67: 1302-1305, 2000

Urioste, M., Martinez-Frias, M. L., Bermejo, E., Jimenez, N., Romero, D., Nieto, C. und Villa, A.: *Short Rib-Polydactyly Syndrome and Pericentric Inversion of Chromosome 4*. Am J Med Genet 49: 94-97, 1994

Vainio, S., Heikkilä, M., Kispert, A., Chin, N. und McMahon, A. P.: *Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signalling*. Nature 397: 405-409, 1999

van den Boogaard, M.-J., Dorland, M., Beemer, F. A. und Van Amstel, H. K. P.: *MSX1 mutation is associated with orofacial clefting and tooth agenesis in humans*. Nat Genet 24: 342-343, 2000

Verloes, A.: *Updated Diagnostic Criteria for CHARGE Syndrome: A Proposal*. Am J Med Genet 133A: 306-308, 2005

Vilain, E.: *Mammalian sex determination: from gonads to brain*. Mol Genet Metab 65: 74-84, 1998

Walley, V. M., Coates, C. F., Gilbert, J. J., Valentine, G. H. und Davies, E. M.: *Brief Clinical Report: Short Rib-Polydactyly Syndrome, Majewski Type*. Am J Med Genet 14: 445-452, 1983

Wang, T., Tamakoshi, T., Uezato, T., Shu, F., Kanzaki-Kato, N., Fu, Y., Koseki, H., Yoshida, N., Sugiyama, T. und Miura, N.: *Forkhead transcription factor Foxf2 (LUN)deficient mice exhibit abnormal development of secondary palate*. Dev Biol 259: 83-94, 2003

Weigel, D., Jürgens, G., Küttner, F., Seifert, E. und Jäckle, H.: *The Homeotic Gene fork head Encodes a Nuclear Protein and Is Expressed in the Terminal Regions of the Drosophila Embryo.* Cell 57: 645-658, 1989 Weigel, D. und Jäckle, H.: *The fork head Domain: A Novel DNA Binding Motif of Eukaryotic Transcription Factors?* Cell 63: 455-456, 1990

Weinstein, D. C., Ruiz i Altaba, A., Chen, W. S., Hoodless, P., Prezioso, V. R., Jessell, T.
M. und Darnell, J. E.: *The Winged-Helix Transcription Factor HNF-3beta Is Required for Notochord Development in the Mouse Embryo.* Cell 78: 575-588, 1994

Wildin, R. S., Ramsdell, F., Peake, J. und Faravelli, F.: *X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy*. Nat Genet 27: 18-20, 2001

Wilkie, A. O. M. und Moriss-Kay, G. M.: *Genetics of Craniofacial Development and Malformation*. Nat Rev Genet 2: 458-468, 2001

Zackai, E. H. und Emanuel, B. S.: *Site-Specific Reciprocal Translocation, t(11;22)* (q23;q11), in Several Unrelated Families With 3:1 Meiotic Disjunction. Am J Med Genet 7: 507-521, 1980

Zitzmann, M. und Nieschlag, E.: *The CAG repeat polymorphism within the androgen receptor gene and maleness*. Int J Androl 26: 76-83, 2003

Danksagung

Drum ist kein Wissen Noch Können so gut, Als dass man alles Schwere Alleine tut.

Hermann Hesse

Danken möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus für das Überlassen dieses Themas und seine stets zuverlässige und freundliche Betreuung.

Ein besonderes Dankeschön geht an Claudia Havel für die geduldige Einarbeitung in die Tricks und Tücken des Laboralltags, sowie an Herrn Dr. Ralf Werner, der immer eine offene Tür und ein offenes Ohr für meine Fragen hatte.

Stellvertretend für die ganze Arbeitsgruppe "Intersexualtiät - vom Gen zur Geschlechtsidentität" möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Olaf Hiort für die Hilfsbereitschaft und Offenheit bedanken, die mir entgegen gebracht wurde.

Den Patienten und ihren Familien danke ich, dass sie mir ihr Vertrauen gegeben haben und dadurch diese Studie überhaupt durchgeführt werden konnte. Bei den betreuenden Ärzten bedanke ich mich für das bereitwillige zur Verfügung stellen der Patientenunterlagen, Dr. med. Anette Richter-Unruh und Dr. med. Eckhard Korsch danke ich für das Einsenden von zusätzlichen Patientenproben.

Außerdem danke ich Herrn Prof. Miura für das Überlassen von bislang nicht publiziertem Bildmaterial.

Meinen Freunden und meiner Familie bin ich dafür dankbar, dass sie mit mir die Höhen und Tiefen bis zum Fertigstellen dieser Arbeit durchlebt haben und ich stets auf ihre Unterstützung zählen konnte.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Ulla Jochumsen geboren am 20.11.1980 in Lüneburg Kirchbühlweg 22 CH-3007 Bern ulla-jochumsen@gmx.de

Schulausbildung	
1987-2000	Besuch der Rudolf-Steiner Schule, Lüneburg
Januar-Juli 1997	Besuch des Ruhapehu College, Neuseeland
Juni 2000	Erwerb der Allgemeinen Hochschulreife
	mit der Note: 1,8
Studium	
Oktober 2000-Juni2007	Studium der Humanmedizin an der Universität zu Lübeck
April 2006-März 2007	Praktisches Jahr
April-Mai 2006	Universitätsklinik Bern, Abteilung Kinderchirurgie
Juni-Juli 2006	Sana Klinik Lübeck, Abteilung Viszeralchirurgie
August-November 2006	Ostschweizer Kinderspital St.Gallen, Abteilung Pädiatrie
Dezember 2006-Januar 2007	Sanaklinik Eutin, Abteilung Innere Medizin
Februar-März 2007	Wellington School of Medicine (University of Otago),
	Abteilung Innere Medizin
Juni 2007	Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, Gesamtnote 1,83
seit Juli 2007	Assistenzärztin in der Universitätsklinik Bern, Abteilung
	Kinderchirurgie
Promotion	
Dezember 2003	Vergabe des Themas, Einarbeitung in die Thematik
April 2004-Dezember 2005	Durchführung der Experimente
Andere Tätigkeiten	
2002-2006	regelmäßige Tätigkeit als Extrawache am
	Universitätsklinikum zu Lübeck

Mitglied im Universitätsorchester Lübeck

2000-2007