

Aus der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck

Direktor: Prof. Dr. med. Egbert Herting

---

**Molekulargenetische Untersuchungen zur Rolle des WNT2 Gens bei der  
menschlichen Geschlechtsentwicklung**

Inauguraldissertation

zur

Erlangung der Doktorwürde

der Universität zu Lübeck

- Aus der Medizinischen Fakultät -

Vorgelegt von

Leonie Kunow, geb. Franke

aus Hamburg

Lübeck 2007

1. Berichterstatter: Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus
2. Berichterstatter / Berichterstatterin: Prof. Dr. rer. nat. Christine Zühlke

Tag der mündlichen Prüfung: 05.02.2008

Zum Druck genehmigt: Lübeck, den 05.02.2008

gez. Prof. Dr. med. Werner Solbach

- Dekan der Medizinischen Fakultät -



<b>INHALTSVERZEICHNIS</b>	<b>I</b>
Abbildungs- und Tabellenverzeichnis	III
Abkürzungsverzeichnis	V
<b>1. Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1. Geschlechtsdeterminierung	1
1.2. Geschlechtsdifferenzierung	4
1.3. Entwicklung des Genitalhöckers	6
1.4. Die WNT-Gene	7
1.4.1. Einteilung	9
1.5. WNT2	11
1.6. Fragestellung	14
<b>2. Material und Methoden</b>	<b>15</b>
2.1. Patienten und Normalkontrollen	15
2.1.1. Patientenkollektiv	15
2.1.2. Klinische Daten	16
2.1.3. Normalkontrollen	23
2.2. Materialien	24
2.2.1. Chemikalien und Gebrauchslösungen	24
2.2.2. Einmalartikel	26
2.2.3. Geräte	26
2.2.4. Kits	27
2.2.5. Primer	27
2.3. Methoden	28
2.3.1. DNA-Isolierung	28
2.3.2. Ansetzen der Gebrauchslösungen	28
2.3.2.1. Stammlösungen	28
2.3.2.2. Färbelösungen	28
2.3.2.3. Sonstige Lösungen	28
2.3.3. Primerherstellung	29
2.3.3.1. Erste Stammlösung (Super-Stock-Lösung)	29
2.3.3.2. Zweite Stammlösung (Stock-Lösung)	29
2.3.3.3. Arbeitverdünnung	29

2.3.4. Amplifikation der DNA	29
2.3.5. Agarosegelelektrophorese	31
2.3.5.1. Prinzip	31
2.3.5.2. Durchführung	31
2.3.6. SSCP-Analyse	31
2.3.6.1. Prinzip	31
2.3.6.2. Durchführung	32
2.3.7. Sequenzierung	34
2.3.7.1. Prinzip	34
2.3.7.2. Durchführung	34
<b>3. Ergebnisse</b>	<b>36</b>
3.1. Ergebnis der molekulargenetischen Analyse	36
3.1.1. Exon 1: Base 1011: -/G	36
3.1.2. Exon 5: Base 45859: G/A und Base 45884: C/T	37
3.1.3. Exon 5: Base 45905: C/T	39
3.1.4. Exon 5: Base 46517: C/T	39
3.1.5. Darstellung der gefundenen Sequenzen	40
<b>4. Diskussion</b>	<b>45</b>
4.1. Methoden	45
4.2. Polymorphismen im WNT2 Gen	48
4.3. WNT2 und Intersexualität	51
4.4. Ausblick	53
<b>5. Zusammenfassung</b>	<b>55</b>
<b>6. Literaturverzeichnis</b>	<b>56</b>
<b>Anhang:</b> Publizierte Sequenz des WNT2 Gens	
<b>Danksagung</b>	
<b>Lebenslauf</b>	
<b>Eigene Veröffentlichungen</b>	

## **Abbildungs- und Tabellenverzeichnis**

### **Abbildungen**

- Abbildung 1: Prinzip der Geschlechtsdeterminierung
- Abbildung 2: Prinzip der Geschlechtsdifferenzierung
- Abbildung 3: Entwicklung des äußeren männlichen Genitals
- Abbildung 4: Der Genitalhöcker
- Abbildung 5: Signaltransduktion durch WNT Proteine
- Abbildung 6: Clusteranalyse nach Holterhus et al. 2003
- Abbildung 7: Ausprägungsgrade der Intersexualität
- Abbildung 8: Darstellung des SNPs Base 1011: -/G in homozygoter und heterozygoter Form
- Abbildung 9: Bandenmuster im Exon 5, Abschnitt B
- Abbildung 10: Darstellung des Ergebnisses der Sequenzierung des SNPs Base 45859
- Abbildung 11: Darstellung des C-zu-T-Austausches der Base 45884 im Exon 5
- Abbildung 12: Darstellung des SNPs Base 45905: C/T in heterozygoter Form im Vergleich zur Normalkontrolle
- Abbildung 13: SSCP-Analyse und Sequenzierung im Exon 5, Abschnitt E
- Abbildung 14: Identifizierte Sequenzen in Exon 1
- Abbildung 15: Identifizierte Sequenzen in Exon 2
- Abbildung 16: Identifizierte Sequenzen in Exon 3
- Abbildung 17: Identifizierte Sequenzen in Exon 4
- Abbildung 18: Identifizierte Sequenzen in Exon 5
- Abbildung 19: Beispiel einer heterozygoten Gensequenzvariation
- Abbildung 20: Beispiel eines möglicherweise ungenau sequenzierten DNA-Abschnitts

### **Tabellen**

- Tabelle 1: Übersicht über die Gene WNT1-3
- Tabelle 2: Übersicht über die Gene WNT3A-5B
- Tabelle 3: Übersicht über die Gene WNT6-8A
- Tabelle 4: Übersicht über die Gene WNT8B-10A
- Tabelle 5: Übersicht über die Gene WNT10B-16
- Tabelle 6: Klinische Daten der untersuchten Patienten 10-169
- Tabelle 7: Klinische Daten der untersuchten Patienten 170-276

Tabelle 8:	Klinische Daten der untersuchten Patienten 293-335
Tabelle 9:	Klinische Daten der untersuchten Patienten 353-441
Tabelle 10:	Klinische Daten der untersuchten Patienten 442-451
Tabelle 11:	Klinische Daten der untersuchten Patienten 476-513
Tabelle 12:	Klinische Daten der untersuchten Patienten 529-553
Tabelle 13:	Klinische Daten der untersuchten Patienten 611-727
Tabelle 14:	Klinische Daten der untersuchten Patienten 763-903
Tabelle 15:	Klinische Daten der untersuchten Patienten 913-1105
Tabelle 16:	Klinische Daten der untersuchten Patienten 1131-1160
Tabelle 17:	Klinische Daten der untersuchten Patienten 1226 und 1342
Tabelle 18:	Zusammensetzung eines PCR-Ansatzes
Tabelle 19:	PCR-Bedingungen für die Exons 1A-5E des WNT2 Gens
Tabelle 20:	Zusammensetzung der SSCP-Gele
Tabelle 21:	Ablauf der Silbernitratfärbung
Tabelle 22:	PCR-Programm für die Sequenzierung
Tabelle 23:	Häufigkeitsverteilung des SNPs in Exon 1
Tabelle 24:	Häufigkeitsverteilung des SNPs Base 45859: G/A, Exon 5
Tabelle 25:	Häufigkeitsverteilung des SNPs Base 45884: C/T, Exon 5
Tabelle 26:	Häufigkeitsverteilung des SNPs Base 46517: C/T, Exon 5

## Abkürzungsverzeichnis

AGS	Adrenogenitales Syndrom
AIS	androgen-insensitivity syndrome
AMH	Anti-Müller-Hormon
APS	Ammoniumpersulfat
ASF	abdominal skin fibroblast
Bmp	Bone morphogenetic protein
bp	Basenpaare
cDNA	Komplementäre DNA
CISS	Kooperative Intersexualitätsstudie
CRD	Cystein-reiche Domäne
DAX-1	Dosage-sensitive sex reversal locus-adrenal hypoplasia congenita-critical region on the X-1
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleotidphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleotidphosphat
dpc	days post coitum
Dsh	Protein, das durch das Gen Dishvelled kodiert wird
DUE	distales Urethralepithel
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ESPED	Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland
Fgf	Fibroblast growth factor
Fgfr	Rezeptoren des Fibroblast growth factors
FTZ1-F1	Drosophila Fushi-Tarazu factor-1
FrzB	Frizzled Rezeptor
FSF	forearm skin fibroblast
GOF	gonadal fibroblast
GSF	genital skin fibroblast
GSK 3	Glycogen Synthase Kinase 3
GH	Genitalhöcker
hCG	humanes Choriongonadotropin
HFGS	Hand-Foot-Genital-Syndrom

HOX	homeobox Gen
LEF 1	lymphoid enhancer factor 1
LIM-1	Gen, benannt nach Eigennamen des Erstbeschreibers „Lim“
N4	Normalkontrolle 4
NK	Normalkontrolle
PCR	Polymerase Kettenreaktion
Porc	Protein, das durch das Porcupine Gen kodiert wird
PRF	prostate fibroblast
Ptch1	patched homolog 1 Gen
Rfz9	Frizzled-9-Rezeptor bei der Ratte
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SF-1	Steroidogenic factor-1
SHBG	sexualhormonbindendes Globulin
Shh	Sonic hedgehog Gen
SNP	single-nucleotide polymorphism
SOX-9	SRY-box-related 9
SRY	Sex determining region of the Y-chromosome
SSCP	Single Strand Conformation Polymorphism analysis
TBE	Trizma®Base, Borsäure, EDTA
Tcf	Transcription factor
TDF	Testis Determining Factor
TE	Trizma®Base, EDTA
TEMED	N’N’N’N’-Tetramethylethylendiamin
UTR	untranslatierte Region
UV	ultraviolett
VSD	Ventrikelseptumdefekt
W	Watt
WNT	wingless-type MMTV integration site family
WNT 2	wingless-type MMTV integration site family member 2
WT-1	Wilms-Tumor-1 Gen

## Nukleinsäuren

A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin

## Aminosäuren

A	Ala	Alanin
R	Arg	Arginin
N	Asn	Asparagin
D	Asp	Aspartat
C	Cys	Zystein
Q	Gln	Glutamin
E	Glu	Glutamat
G	Gly	Glyzin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
F	Phe	Phenylalanin
P	Pro	Prolin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin
V	Val	Valin

## Schreibweise

Die in der vorliegenden Arbeit untersuchten Kinder haben alle ein genetisch männliches Geschlecht. Durch eine Virilisierungsstörung weicht das äußere Genital vom genetischen Geschlecht ab, es ist intersexuell. Um Missverständnisse zu vermeiden, werden alle untersuchten Kinder als Patienten bezeichnet, auch wenn das äußere Geschlecht zum Teil komplett weiblich ist. Dies stellt keinerlei Wertung in Bezug auf die Geschlechtsidentität dar.

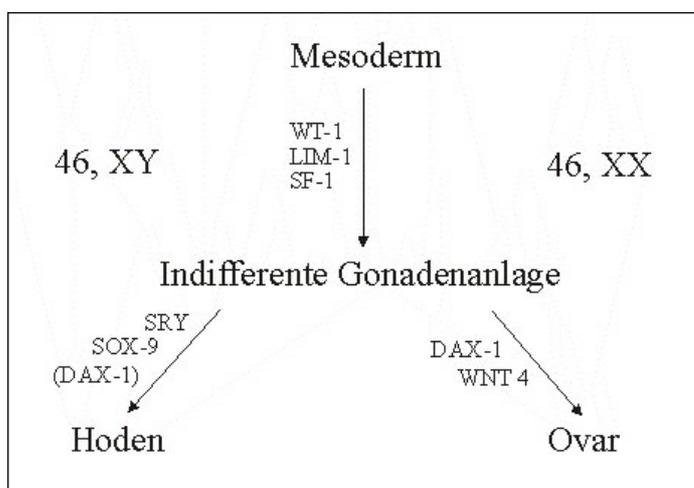
## 1 EINLEITUNG

Die Geschlechtsentwicklung des Menschen erfolgt in den ersten Wochen der Embryonalzeit. Sie beginnt mit der Befruchtung der Eizelle, wird nach der Geburt fortgeführt und endet in der Pubertät mit der Geschlechtsreife. Dabei bestehen bei jedem Embryo zunächst die Anlagen zur Differenzierung in weibliche oder männliche Richtung. Während der Geschlechtsdeterminierung entwickeln sich entweder Hoden oder Ovarien. Im Weiteren differenziert sich das innere und äußere Genitale. Für diesen Vorgang sind eine intakte Synthese und Wirkung von Sexualhormonen eine unabdingbare Voraussetzung.

Es existieren zahlreiche Störungen, die den Mechanismus der männlichen Geschlechtsentwicklung beeinträchtigen. Dabei sind die klinischen Auswirkungen abhängig vom Zeitpunkt bzw. dem Stadium der Entwicklung, in dem die Störung auftritt. Neben endokrinologischen Ursachen sind auch Entwicklungsgendefekte möglich.

### 1.1 Geschlechtsdeterminierung

Mit der Fusion von Eizelle und Spermium wird das genetische Geschlecht bestimmt. Es entsteht ein diploider Chromosomensatz mit zwei Geschlechtschromosomen, woraus entweder ein weiblicher (46, XX) oder ein männlicher (46, XY) Karyotyp entsteht. Unabhängig vom Karyotyp entwickelt sich nach der Befruchtung aus dem Mesoderm zunächst die indifferente Gonadenanlage, aus der später Hoden oder Ovar entstehen (Abbildung 1).



**Abb.1**

Prinzip der Geschlechtsdeterminierung. Aus dem Mesoderm entwickelt sich die indifferente Gonadenanlage, aus der später Hoden oder Ovar hervorgehen. Dabei beeinflussen verschiedene Gene die einzelnen Entwicklungsschritte.

SF-1: Steroidogenic Factor-1, DAX-1: Dosage sensitive sex reversal locus-adrenal hypoplasia congenita-critical region on the X-1, SRY: Sex determining region of the Y-chromosome, SOX-9: SRY-box-related-9, WT-1: Wilms-Tumor-1, LIM-1: Eigenname, WNT4: wingless type MMTV integration family member 4

Für die Entwicklung der bipotenten Gonadenanlage sind verschiedene Faktoren von Bedeutung. Hierzu gehören das LIM-1, das SF-1 Protein (Steroidogenic Factor-1) und das WT-1 (Wilms-Tumor) (Dong et al. 1997, Zusammenfassung bei Birnbaum 2002). Störungen der Gonadenentwicklung werden durch Defekte der zugrunde liegenden Gene verursacht, es kommt zur Gonadendysgenese. Bei der kompletten Form der Gonadendysgenese zeigt sich ein weiblicher Phänotyp bei 46, XX oder 46, XY Karyotyp. Die Gonaden sind lediglich als bindegewebige Stränge angelegt („Streak“-Gonaden). Bei inkompletter Gonadendysgenese hingegen ist das äußere Genitale weiblich, ambivalent oder männlich (Sinnecker 1999, Hiort 1998).

Bei Mutationen des LIM-1 Gens wurden bei Mäusen Fehlentwicklungen von Gonaden und Nieren beschrieben. Defekte dieses Gens bei Menschen sind bisher nicht veröffentlicht worden (Zusammenfassung bei Hiort und Holterhus 2000).

Beim SF-1 Protein handelt es sich um das Produkt des FTZ1-F1 Gens (Drosophila Fushi-Tarazu factor-1). Es dient als Hormonrezeptor (Taketo et al. 1995, Parker 1998). Versuche mit SF-1 „knockout“-Mäusen zeigten, dass SF-1 nicht nur in der frühen Entwicklung der männlichen Gonade von Bedeutung ist, sondern zusätzlich einen Einfluss auf die spätere Geschlechtsdifferenzierung nimmt. Eine heterozygote Mutation des FTZ1-F1 Gens, die einen Bindungsverlust des SF-1 Proteins zur Folge hat, zeigte bei Menschen mit einem 46, XY Karyotyp ein klinisches Bild mit weiblichem Phänotyp, weiblichem inneren Genitale und primärer Nebenniereninsuffizienz (Achermann et al. 1999, Parker et al. 1999).

Defekte des WT-1 Gens können verschiedene Syndrome zur Folge haben. Das Denys-Drash-Syndrom ist durch die partielle oder komplette Gonadendysgenese und Wilms-Tumoren gekennzeichnet. Beim Frasier-Syndrom kommt es zur Bildung von Gonadoblastomen. Das WAGR-Syndrom äußert sich klinisch mit Wilms-Tumoren, Aniridie, genitalen Abnormitäten und mentaler Retardierung. Dabei ist die unterschiedliche phänotypische Ausprägung Folge unterschiedlicher Mutationsmechanismen (Denys et al. 1967, Drash et al. 1970, Glaser et al. 1986, Klamt et al. 1998).

Für die Entwicklung des Hodens aus der bipotenten Gonadenanlage ist das Y-Chromosom von entscheidender Bedeutung. Der sogenannte TDF (Testis Determining Factor) wurde bereits in den 1960er Jahren vermutet (Jacobs et al. 1966, McElreavy et al. 1995) und die dafür verantwortliche Region auf dem Y-Chromosom in der Folge weiter eingegrenzt (Wachtel et al. 1975, McLaren et al. 1984, Page et al. 1987, Palmer et al. 1989). 1990 beschrieben Sinclair und Mitarbeiter das auf dem kurzen Arm des Y-Chromosoms

lokalisierte SRY (Sex-determinierende Region des Y-Chromosoms) (Sinclair et al. 1990). SRY kodiert für den TDF, einem Protein mit einem DNA-Bindungsmotiv, welches als Transkriptionsfaktor die Expression autosomaler Gene reguliert. Diese wiederum kontrollieren die Hodendifferenzierung (Sinclair et al. 1990, McElreavy et al. 1995). Defekte des SRY Gens führen bei 46, XY Individuen zu einer kompletten Umkehr des inneren und äußeren Genitals (Hiort und Holterhus 2000). Durch den Transfer des SRY Gens in das Genom von Mäusen konnten männliche XX-Mäuse erzeugt werden (Koopmann et al. 1991), was die Relevanz von SRY für die männliche Gonadendeterminierung unterstreicht.

Allerdings ist für die männliche Gonadenentwicklung das SRY Gen alleine nicht ausreichend. Es werden eine Reihe weiterer Gene im Zusammenspiel mit dem SRY Gen benötigt (Zusammenfassung bei Boehmer 2000). Es handelt sich dabei um das DAX-1 (Dosage-sensitive sex reversal locus-adrenal hypoplasia congenita-critical region on the X-1), das SOX-9 (SRY-box-related 9) und das oben bereits erwähnte WT-1. Es ist zu vermuten, dass zusätzlich eine Reihe weiterer, bisher unbekannter Faktoren, in diesen Prozess eingreifen.

Das DAX-1 Gen hat Einfluss auf die Entwicklung der Ovarien. In der männlichen Entwicklung wird es durch die Wirkung des SRY Gens inaktiviert (Übersicht bei Hiort und Holterhus 2000). Geschieht dies nicht ausreichend, z.B. bei einer Duplikation des DAX-1, kommt es zu Störungen der testikulären Differenzierung (Yu et al. 1998). Inaktivierende Mutationen des DAX-1 Gens führen hingegen zu hypogonadalem Hypogonadismus mit Nebennierenhypoplasie bei normal männlichem Phänotyp und 46, XY Chromosomensatz (Lim und Hawkins 1998).

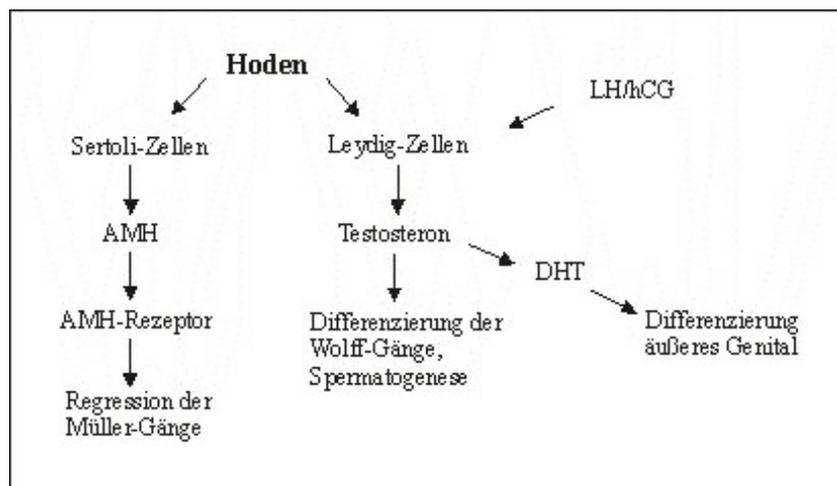
Bei Defekten im SOX-9 Gen kommt es zu gestörter Hodenentwicklung und Skelettfehlbildungen (campomele Dysplasie) (Lim et al. 1998).

Ist ein intaktes SRY Gen vorhanden und sind die beschriebenen Gene intakt, kommt es in der 7. Embryonalwoche normalerweise zur Entwicklung des Hodens aus der indifferenten Gonadenanlage. An dieser Stelle beginnt der Vorgang der normalen männlichen Geschlechtsdifferenzierung.

## 1.2 Geschlechtsdifferenzierung

Sind die Hoden in der 7. Embryonalwoche vollständig entwickelt, beginnen sie mit der Bildung von Testosteron und Anti-Müller-Hormon (AMH). Diese Hormone bestimmen die Differenzierung des männlichen Genitals (Abbildung 2).

AMH, welches in den Sertoli-Zellen gebildet wird, wirkt über zwei Rezeptoren auf die Zellen des Müllerschen Gangsystems und führt dabei zur Regression der Müllerschen Derivate, die sich beim weiblichen Embryo zu Uterus, Eileiter und oberer Vagina entwickelt hätten (Josso et al. 1977, Josso et al. 1990, Josso et al. 2001). Dabei wird die Bildung von AMH durch die Gene SF-1 und SOX-9 stimuliert (Shen et al. 1994, De Santa Barbara et al. 1998a und b). Wird AMH vermindert gebildet, führt dies zum Syndrom der persistierenden Müllerschen Strukturen (Berkowitz und Seeherunvong 1998). Zu den Ursachen gehören Mutationen des AMH-Gens oder des AMH-Rezeptor-Gens (Typ II) (Josso 1992, Rey und Picard 1998). Eine verminderte Sertoli-Zellanzahl kann ebenfalls für eine unzureichende AMH-Produktion verantwortlich sein. Die äußeren Geschlechtsmerkmale bleiben bei dieser Störung unbeeinflusst (Rey und Picard 1998). Ist kein AMH vorhanden, wie bei der normal weiblichen oder abnormen männlichen Differenzierung oder bei kompletter Gonadendygenese, kommt es zur Entwicklung der inneren Geschlechtsorgane zum weiblichen Phänotyp. Eine Überexpression von AMH über Rezeptoren an den Leydig-Zellen führte bei Mäusen zu einer Störung der Virilisierung und erniedrigten Testosteronwerten (Josso et al. 1998, Racine et al. 1998).

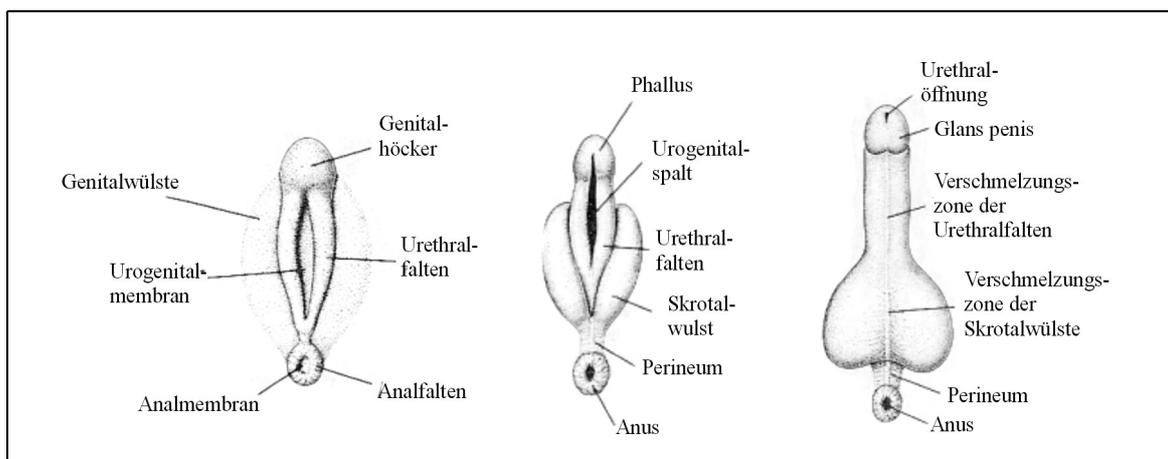


**Abb.2** Prinzip der Geschlechtsdifferenzierung. Aus dem Hoden entwickeln sich Sertoli-Zellen unter dem Einfluss von SRY. Durch Produktion von AMH induzieren sie die Regression der Müller-Gänge. Unter der Wirkung von hCG und später LH werden die Leydig-Zellen im Hoden stimuliert und bilden Testosteron, welches zur Virilisierung des inneren und über DHT des äußeren Genitals führt. AMH: Anti-Müller-Hormon, DHT: Dihydrotestosteron,

LH: Luteinisierendes Hormon, hCG: humanes Choriongonadotropin.

Die Leydig-Zellen im Hoden sind ab der 8. Woche für die Produktion von androgenen Steroidhormonen verantwortlich. Stimuliert werden sie zunächst durch das in der Plazenta gebildete humane Choriongonadotropin (hCG). Später, im dritten Trimenon der Schwangerschaft, wird diese Aufgabe durch das hypophysäre luteinisierende Hormon (LH) des Feten übernommen. Beide Hormone aktivieren den LH/hCG-Rezeptor. Er ist molekulargenetisch untersucht und charakterisiert worden (Minegishi et al. 1990). Die intakte Funktion dieses Rezeptors ist für eine normale Sexualentwicklung erforderlich (Rey und Picard 1998). Mutationen können zu einer LH-Resistenz führen, sodass die Androgenbiosynthese vermindert ist oder fehlt (Themmen und Brunner 1996, Min et al. 1998, Themmen et al. 1998). Eine Leydig-Zell-Hypoplasie mit meist weiblichem Phänotyp ist die Folge (Misrahi et al. 1998).

Ist die Stimulation durch hCG bzw. LH auf die Leydig-Zellen ausreichend, wird Testosteron sezerniert. Testosteron nimmt Einfluss auf die Differenzierung der Wolffschen Strukturen, woraus sich die Nebenhoden, der Samenleiter und die Bläschendrüse entwickeln. In den Zielorganen kann es in das potentere Androgen DHT (Dihydrotestosteron) umgewandelt werden. Es bewirkt die Virilisierung des äußeren Genitals und bewirkt die sexuelle Reifung während der Pubertät (Abbildung 3). Testosteron induziert neben der Differenzierung der Wolffschen Strukturen die Spermatogenese und hat Einfluss auf die Gonadotropin-Ausschüttung (Sinnecker 1999). Beide wirken über den Androgenrezeptor.



**Abb.3** Entwicklung des äußeren männlichen Genitals (modifiziert nach Langman und Sadler 1998). Beendet ist die Entwicklung zwölf Wochen nach Konzeption.

### 1.3 Entwicklung des Genitalhöckers

Die molekularen Mechanismen, die der Entwicklung des äußeren Genitals zugrunde liegen, sind heute noch weitestgehend unbekannt. Der Genitalhöcker (GH), eine mediale Vorwölbung, während der Embryogenese ventral der Kloake gelegen, stellt die Anlage für den Penis beim männlichen und für die Klitoris beim weiblichen Säugetier dar (Dolle et al. 1991, Haraguchi et al. 2000, Haraguchi et al. 2001, Kondo et al. 1997) (Abbildung 4). Durch koordiniertes Wachstum und Ausdifferenzierung des GHs entsteht eine hoch entwickelte Struktur, die eine Kopulation und damit effiziente Befruchtung gewährleistet (Haraguchi et al. 2000, Haraguchi et al. 2001, Ogino et al. 2001, Suzuki et al. 2003). Aus dem GH bildet sich außerdem die Urethra, die für Urese und Ejakulation unerlässlich ist (Haraguchi et al. 2001). Obwohl Androgene in der Genitalentwicklung eine Schlüsselrolle spielen, beginnt die Ausbildung des GHs weit vor Beginn der Androgenproduktion (Perriton et al. 2002). Der Vorgang der Entwicklung der äußeren Geschlechtsorgane scheint in zwei Schritte unterteilt zu sein. Zunächst kommt es im Rahmen eines hormonunabhängigen Prozesses zur Ausbildung der Anlage, dem Genitalhöcker. Der zweite Schritt stellt die geschlechts-dimorphe Entwicklung des äußeren Genitals dar, welche durch Steroidhormone reguliert wird (Ogino et al. 2001). Neueste Studien konnten zeigen, dass Androgene nicht die einzigen Regulatoren der Geschlechtsentwicklung sind. Viele Gene, deren Proteine wichtige Faktoren in der Gliedmaßenentwicklung darstellen, spielen auch Schlüsselrollen während der Entwicklung des Genitalhöckers (Morgan et al. 2003).

Die polarisierende Aktivität des GHs ist auf wenige Zellen reduziert und befindet sich im Bereich des distalen Urethralepithels (DUE) (Perriton et al. 2002) (Abbildung 4). Das DUE spielt eine essentielle Rolle bei der Ausdifferenzierung und dem Wachstum des Genitalhöckers (Suzuki et al. 2002). Zahlreiche Gene werden hier exprimiert, so z.B. Fgf (Fibroblast growth factor) 8 und 10, Bmp (Bone morphogenetic protein) 4 und das Shh (Sonic hedgehog Gen) (Haraguchi et al. 2001, Suzuki et al. 2003).

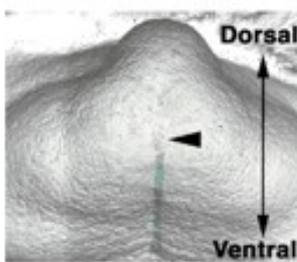
Die Gene des Fgf-Systems haben im Laufe der Jahre immer mehr an Bedeutung für die Entwicklung der äußeren Geschlechtsorgane gewonnen und spielen eine Schlüsselrolle bei der Ausdifferenzierung des GHs (Haraguchi et al. 2000, Morgan et al. 2003). In der Studie von Haraguchi et al. 2000 zeigte bei Mäusen vor allem Fgf 8 eine hohe Expression im Genitalhöcker. Es reguliert während der Entwicklung weitere im GH exprimierte Gene, so auch Fgf 10, Bmp 4 und HOXD13 (homeobox D13 Gen). Satoh et al. 2004 analysierte die Expressionsmuster von Fgf 8, 9 und 10, sowie der Rezeptorgene Fgfr1, Fgfr2IIIb und

FgfrIIIc. All diese Gene wurden im GH exprimiert. Bei Mäusen führten gezielte Mutationen im FgfrIIIb Gen zu Fehlbildungen der Urethra (Sato et al. 2004).

Das Shh (Sonic hedgehog Gen) und seine Signalgene werden ebenfalls während der Genitalentwicklung exprimiert. In Organkulturen zeigte sich, dass Shh andere, mesenchymal exprimierte Gene im GH regulieren kann, Ptch 1 (patched homolog 1 Gen), Bmp 4, HOXD13 und Fgf 10. Es konnte gezeigt werden, dass Shh eine Rolle bei Wachstum und Ausdifferenzierung der Genitalanlage spielt. Shh Knockout-Mäuse zeigten eine komplette GH-Agenesie, es kam zu verstärktem Zelltod und reduzierter Zellproliferation (Haraguchi et al. 2001). In einer weiteren Arbeit kam es aufgrund einer gezielten Deletion von Shh zu einem fehlenden Genital (Perriton et al. 2002).

Einige Gene der Bmp (Bone morphogenetic protein)-Familie scheinen sich mit regulatorischen Funktionen auf Zellproliferation und Apoptose negativ auf die Entwicklung des Genitalhöckers auszuwirken (Suzuki et al. 2003). In dieser Studie bewirkte z.B. das ebenfalls im GH exprimierte Bmp 4 eine verminderte Expression von WNT5A und Fgf 8 mit vermehrter Apoptose und verminderter Teilung der Zellen.

Als essentiell für die Expression von Fgf 8 und Bmp 7 zeigte sich HOXA13 (homeobox A13 Gen). Bei Mutation dieses Gens kam es bei Mäusen aufgrund von Fehlfunktion von Fgf 8 und Bmp 7 zu einer Hypospadie. Des Weiteren bewirkte der Defekt das sogenannte Hand-Foot-Genital-Syndrom (HFGS) mit Malformationen des Rektums, der Müllerschen Derivate und Ureteren mit Blase (Morgan et al. 2003).



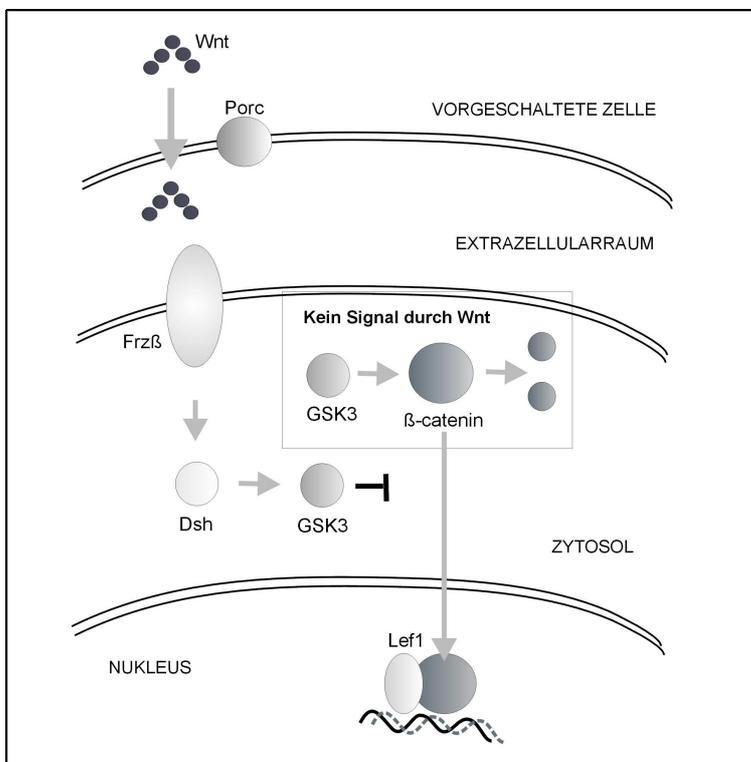
**Abb.4** Der Genitalhöcker: Anlage für die Entwicklung der äußeren Geschlechtsorgane (modifiziert nach Suzuki et al. 2003). Embryonaler Genitalhöcker am 12.5 dpc, die Linie markiert die Urethralplatte, die Pfeilspitze zeigt das distale Urethralepithel (DUE) an.

#### 1.4 Die WNT Gene

Die Familie der WNT (wingless-type MMTV integration site family) Gene besteht aus strukturell verwandten Genen, welche alle für Signalproteine kodieren. Bei diesen Glykoproteinen handelt es sich um hoch konservierte Moleküle. Sie regulieren Zell-zu-Zell-Interaktionen während verschiedener Vorgänge der embryonalen Entwicklung und bei der Entstehung von Krebs (Nusse und Varmus 1992, Moon et al. 1997). Neben zahlreichen

Spezies wie der Maus, der Drosophila oder dem Zebrafisch, wurden die WNTs vor allem beim Menschen beschrieben. Bis heute sind 19 humane WNT Gene analysiert, wobei über viele von ihnen noch wenig bekannt ist.

Die WNT Proteine triggern eine Kaskade von intrazellulären Signalen. Es kommt zu einer transkriptionalen Aktivierung einer Vielzahl von Genen (Zusammenfassung bei Jordan et al. 2001). Sie werden mit Hilfe von Porc (kodiert durch das Porcupine Gen) aus der Zelle sezerniert und binden direkt an einen Rezeptor der Frizzled-Familie (Frz $\beta$ ) auf der Oberfläche der Zielzelle. Bei diesem handelt es sich um eine extrazelluläre cystein-reiche Domäne (CRD), die für die Bindung der WNT Proteine verantwortlich ist (Leimeister et al. 1998, Nusse 2003). Dadurch wird ein durch das Dishvelled Gen kodiertes Protein (Dsh) aktiviert. Dsh inhibiert die Kinase GSK 3 (Glykogen Synthase Kinase 3), deren Aufgabe im aktiven Zustand die Induktion des Abbaus von  $\beta$ -Catenin wäre. Dieses kann sich so im Zellkern an den Transkriptionsfaktor (Tcf) LEF1 (lymphoid enhancer factor 1) binden und eine Reihe von Transkriptionsvorgängen induzieren (Karasawa et al. 2002, Nelson und Nusse 2004) (Abbildung 5).



**Abb.5** Signalweg der WNT Proteine. Mit Hilfe von Porc werden sie aus der Zelle sezerniert und binden an den Frizzled-Rezeptor (Frz $\beta$ ) an der Zielzelle. Dsh wird aktiviert, welches die GSK3 aktiviert. Diese induziert sonst den Abbau von  $\beta$ -Catenin. So bindet  $\beta$ -Catenin im Nukleus an den LEF1 und setzt zahlreiche Transkriptionsvorgänge in Gang. Wnt: wingless type MMTV integration site family member, Porc: durch Porcupine Gen kodiert, Frz $\beta$ : Rezeptor der Frizzled Familie, Dsh: durch Dishvelled Gen kodiert, GSK3: Glykogen Synthase Kinase 3, Lef1: lymphoid enhancer factor 1

### 1.4.1 Einteilung

Als erstes WNT Gen wurde das WNT1 beschrieben. Es wurde damals als Protoonkogen in der Entstehung von Brustkrebs diskutiert (Nusse und Varmus 1982, van Ooyen und Nusse 1984). Das Homolog zu diesem Gen entspricht dem Wg (Wingless) der Drosophila-Fliege, ein Gen welches als wichtiger Faktor in der embryonalen Entwicklung bei Fliegen bekannt ist (Zusammenfassung bei Monkley et al. 1996). WNT1 spielt eine entscheidende Rolle bei der Nierenentstehung. Es induziert dort die Ausbildung der Nierentubuli (Zusammenfassung bei Kispert et al. 1996). Des Weiteren ist es wichtig für die Entwicklung des Nervensystems. Knockout-Mäuse zeigten Defekte des Kleinhirns sowie ein fehlendes Mittelhirn (Zusammenfassung bei Monkley et al. 1996, Smolich et al. 1993). Neben WNT1 wurde die Beteiligung von WNT2B, 4, 7B und 11 in der Nierenentwicklung diskutiert, wobei die Wirkung von WNT7B und 11 bis auf deren Expression in der Nachniere (Metanephros) nicht weiter bekannt ist (Kispert et al. 1996). WNT2B stimuliert das Ureterwachstum und deren Verzweigung (Lin et al. 2001). WNT4 dagegen wird in der Urniere (Mesonephros) exprimiert und führt bei inaktivierenden Mutationen zu einer Nierenagenesie (Biason-Lauber et al. 2004). Vainio et al. 1999 publizierte die Bedeutung des WNT4 in der Genitalentwicklung bei weiblichen Individuen. So kam es bei Mäusen mit 46, XX Chromosomensatz mit Defekten im WNT4 Gen zu einer Maskulinisierung der Geschlechtsorgane. Neben differenzierten Wolffschen Derivaten und einer Androgenproduktion durch die Hoden, fehlten die Müllerschen Strukturen vollständig. Bei Mutationen des Gens bei einem 46, XY Karyotyp kam es zu keinen pathologischen Veränderungen. Aufgrund der Notwendigkeit von WNT4 in der Nephrogenese starben die homozygoten Träger kurz nach Geburt an Nierendefekten, während die heterozygoten Träger den oben geschilderten Phänotyp vorwiesen. WNT4 stimuliert das DAX-1 Gen in Leydig- und Sertolizellen und antagonisiert damit den TDF, woraus sich eine gemeinsame Rolle von WNT4 und DAX-1 in der weiblichen Geschlechtsentwicklung ergibt (Jordan et al. 2001). Anhand einer Patientin mit einem WNT4 Defekt und einem klinischen Bild mit einseitiger Nierenagenesie, fehlenden Müllerschen Derivaten und Zeichen eines Androgenüberschusses konnten die oben genannten Studien bestätigt und auf den Menschen übertragen werden (Biason-Lauber et al. 2004). Nach WNT4-Regulation spielt WNT7A eine Rolle bei der geschlechtsspezifischen Entwicklung der Müllergänge (Vainio et al. 1999). Knockout-Mäuse (46, XX) zeigten eine Infertilität und eine ungenügende Entwicklung der Müllerschen Derivate, aufgrund von Fehlen des AMH-Rezeptors (Parr und McMahon 1998). Bei Defekten von WNT3 kommt es zu einem Störungsbild mit

Tetra-Amelie, kraniofazialer Dysmorphie und urogenitaler Fehlbildung. Das zeigte eine Untersuchung an einer Familie mit konsanguinen Eltern. Hier wurde zum ersten Mal die Vererbung einer WNT-Mutation nach den Mendelschen Gesetzen publiziert (Niemann et al. 2004). WNT5A wird in den Anlagen der Gliedmaßen und im Genitalhöcker (GH) exprimiert. Ein Defekt des WNT5A Gens führte im Mausmodell zu Fehlentwicklung der Gliedmaßen, des Gesichts und Fehlen von Fingern (Yamaguchi et al. 1999), als auch zu einer genitalen Agenesie (Suzuki et al. 2003). WNT5B sowie 10B spielen eine Rolle bei der Bildung von Fettgewebe, indem sie auf die Vorläuferzellen der Adipozyten Einfluss haben (Zhou et al. 2004). Bei WNT5B wurde der Zusammenhang mit der Entstehung von Diabetes Typ 2 diskutiert (Kanazawa et al. 2004). In den Tabellen 1-5 ist eine Übersicht über alle WNT Gene aufgeführt.

**Tabelle 1:** Übersicht über die Gene WNT1-3

Gen	WNT1	WNT2	WNT2B/13	WNT3
<b>Anzahl der Exons</b>	4	5	5	5
<b>chromosomale Lokalisation</b>	12q13	7q31.2	1p13	17q21-22
<b>bevorzugtes Gewebe</b>	Neuralleiste	Herz, Gehirn, Brustdrüse, Genitaltrakt, Lunge	Isotyp1: fetales Gehirn und Lunge, Isotyp2: zusätzl. Niere, Hoden	Gehirn, Hoden
<b>Hauptfunktion/Wirkort</b>	fetale Entwicklung Nervensystem, Nieren	fetale Entwicklung Perikard, Allantois, Urogenitaltrakt	fetale Entwicklung Lunge, Nieren	fetale Entwicklung Gliedmaßen, Skelett

**Tabelle 2:** Übersicht über die Gene WNT3A-5B

Gen	WNT3A	WNT4	WNT5A	WNT5B
<b>Anzahl der Exons</b>	4	5	4	6
<b>chromosomale Lokalisation</b>	1q42	1p36.21-p35.1	3p21.1	12p13.3
<b>bevorzugtes Gewebe</b>	Milz, Prostata, Lunge, Skelettmuskulatur	Herz, Ovarien, Uterus, Lunge, Auge	Gehirn, Lunge, Genitalhöcker	Herz, Darm, Leber, Pankreas, Gehirn, Ovarien, Prostata, Fettgewebe, Lunge, Nieren
<b>Hauptfunktion/Wirkort</b>	nicht bekannt	Entwicklung weiblicher Urogenitaltrakt	fetale Entwicklung Fazies, Gliedmaßen, Urogenitaltrakt	fetale Entwicklung, Regulation von Fettzellen

**Tabelle 3:** Übersicht über die Gene WNT6-8A

Gen	WNT6	WNT7A	WNT7B	WNT8A
Anzahl der Exons	4	4	3	7
chromosomale Lokalisation	2q35	3p25	22q13.2-13.3	5q31
bevorzugtes Gewebe	Milz, lymphatisches Gewebe	Gehirn, Lymphgefäße, Hoden, Leukozyten	Gehirn, Prostata, Lunge	nicht bekannt
Hauptfunktion/Wirkort	Karzinogenese	Entwicklung weiblicher Genitaltrakt	fetale Entwicklung, Lunge, Nieren, Ektoderm	Karzinogenese (Teratokarzinom)

**Tabelle 4:** Übersicht über die Gene WNT8B-10A

Gen	WNT8B	WNT9A/14	WNT9B/15	WNT10A
Anzahl der Exons	6	4	4	4
chromosomale Lokalisation	10q24	1q42	17q21	2q35
bevorzugtes Gewebe	nicht bekannt	karzinöse Zellen (Magen)	Nieren, Gehirn	Milz, Nieren, Ovarien, Prostata, lymphatisches Gewebe
Hauptfunktion/Wirkort	fetale Entwicklung Gehirn	Karzinogenese, fetale Entwicklung	fetale Entwicklung Nieren	fetale Entwicklung

**Tabelle 5:** Übersicht über die Gene WNT10B-16

Gen	WNT10B	WNT11	WNT16
Anzahl der Exons	5	5	4
chromosomale Lokalisation	12q13.1	11q13.5	7q31
bevorzugtes Gewebe	Gehirn, peripheres NS, Knochen, Herz- und Skelettmuskulatur	Herz, Leber Pankreas, Drüsengewebe, Skelettmuskulatur	Milz, Herz, Darm, Gehirn, Nieren, Lymphknoten
Hauptfunktion/Wirkort	fetale Entwicklung, kindl. Wachstum	fetale Skelettentwicklung	fetale Entwicklung

## 1.5 WNT2

Obwohl WNT2 (wingless-type MMTV integration site family, member 2) als zweites aller WNT Gene identifiziert wurde, sind seine Funktionen noch nicht vollständig verstanden. Es wurde zufällig während der Suche nach einem Gendefekt bei zystischer Fibrose entdeckt (Wainwright et al. 1988). Bis heute ist das WNT2 Gen bei der Maus, der Ratte, dem Seeigel, dem Blutegel und dem Menschen beschrieben (Zusammenfassung bei Monkley et al. 1996). Bei Ratten bindet es an den Frizzled-9-Rezeptor (Rfz9) an der Zelloberfläche und aktiviert so den WNT/ $\beta$ -Catenin-Signalweg (Karasawa et al. 2002). Das humane WNT2 Gen besitzt die Lokalisation 7q31. Die 5 Exons kodieren für ein

Glykoprotein aus 360 Aminosäuren.

Gezielte Manipulationen des WNT2 Gens führten bei Knockout-Mäusen zu Plazentadefekten und Tod unmittelbar nach der Geburt. Obwohl WNT2 in den Herzanlagen exprimiert wird, konnten bei derselben Studie keine Fehlbildungen des Herzens bei den Mutanten gefunden werden (Monkley et al. 1996).

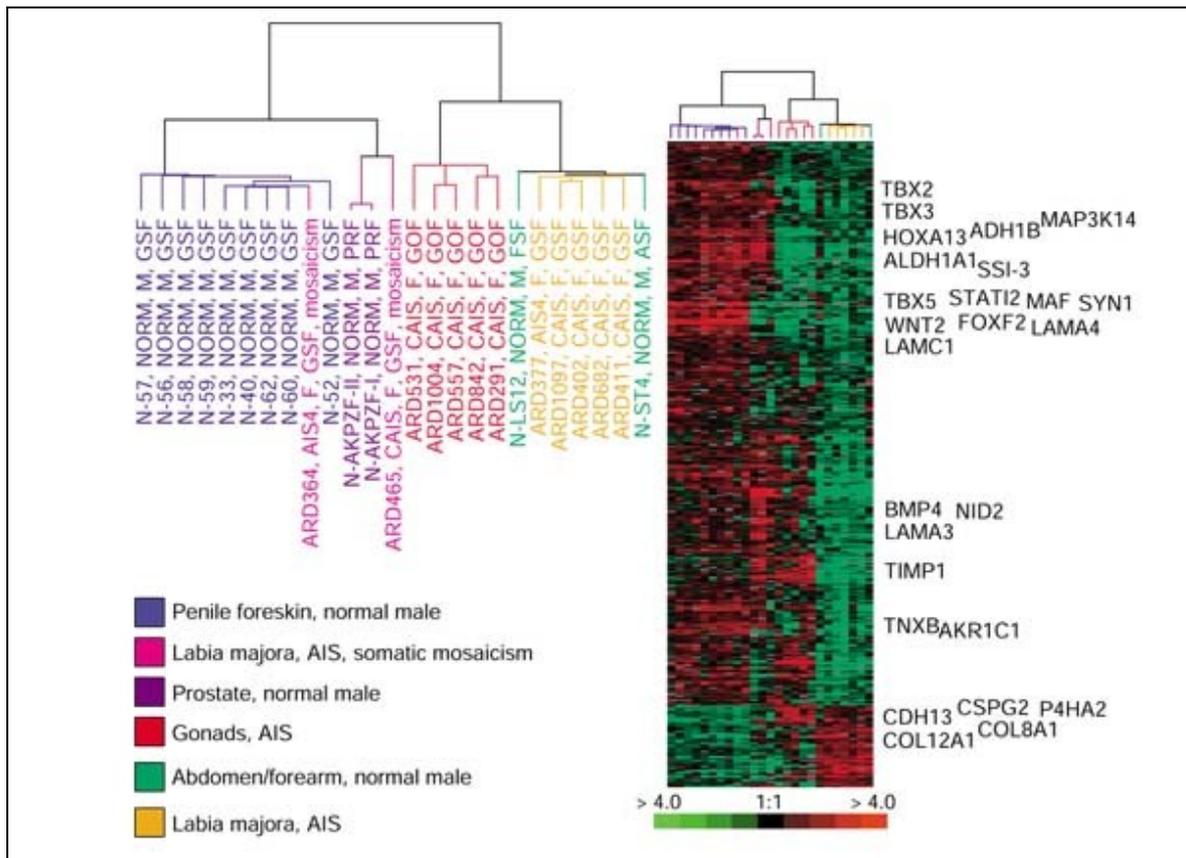
Wassink et al. 2001 brachte Defekte dieses Gens mit der Entstehung von Autismus in Verbindung. Er beschrieb zwei Mutationen: Leu5Arg und Arg299Trp. Die funktionelle Konsequenz dieser Mutationen für die Funktion des WNT2 Gens wurde jedoch nicht bewiesen. In zwei weiteren Studien konnten keine signifikanten Zusammenhänge zwischen WNT2 und Autismus bestätigt werden (McCoy et al. 2002, Li et al. 2004).

Bei der Drosophila-Fliege ist das WNT2 Gen (hier: DWnt2) erforderlich für die Determinierung und Differenzierung der männlichen Geschlechtsorgane (Kozopas et al. 1998). Aufgrund von Defekten des Gens können Muskelvorläufer- und Pigmentzellen nicht vollständig in die Genitalanlagen einwandern. Bei dieser Untersuchung kam es durch Mutationen von DWnt2 bei Fliegen mit 46, XY Karyotyp zu strukturellen Abnormitäten des Skrotums und zu Sterilität. Die Hoden waren von abnormer Morphologie und in der Größe deutlich vermindert.

Holterhus et al. (2003) untersuchten die mRNA-Expressionsmuster in kultivierten menschlichen Genitalhautfibroblasten. Sie entdeckten dabei, dass in allen Proben männlicher Probanden eine signifikant höhere Expression von WNT2 im Vergleich zu denen weiblicher Probanden (46, XY) vorlag. Von besonderem Interesse ist dabei, dass die männlichen Genitalhautfibroblasten von der Vorhaut stammten. Somit liegt beim Menschen eine sehr hohe Expression von WNT2 in diesem Derivat des Genitalhöckers vor (Holterhus et al. 2003, Abbildung 6).

Die vorangehend dargestellten Fakten zur Rolle der WNT Gene sowie die Ergebnisse der Studie von Holterhus et al. 2003 führten zu der in dieser Arbeit überprüften Hypothese, WNT2 könne als neues Kandidatengen der hormonunabhängigen Entwicklung der Urogenitalanlage eine Rolle spielen. Ein möglicher Defekt dieses Gens würde zu einem sehr frühen Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung Einfluss auf die Bildung der bipotenten Anlagen des äußeren Genitals (Genitalhöcker) nehmen. In einer Umfrage der ESPED (Erhebungseinheit für seltene pädiatrische Erkrankungen in Deutschland) wurde die Epidemiologie von Intersexualität und schweren Genitalfehlbildungen untersucht. Die Studie schloss Neugeborene (Alter <4 Wochen) mit uneindeutigem Phänotyp der äußeren Geschlechtsmerkmale oder eindeutigem Phänotyp bei abweichendem Genotyp ein.

Insgesamt konnten 80 Fragebögen ausgewertet werden. In 35 von 80 Fällen (entsprechend 44 %) konnten assoziierte Fehlbildungen, vor allem der Nieren und der Extremitäten, beobachtet werden (ESPED-Umfrage: „Intersexualität und schwere Genitalfehlbildungen“, 2000-2002).



**Abb.6** Hierarchische Cluster-Analyse zeigt signifikante Unterschiede zwischen der Expression von Genen in normalen männlichen Genitalhautfibroblasten (Vorhaut, Genitalhöcker) und den Genitalhautfibroblasten von weiblichen Patienten mit AIS (Labia majora, Genitalwülste). Übersicht über 472 identifizierte Transkripte. Der Farbcode des Dendrogramms und die Namen der Kollektive repräsentieren die Herkunft des Fibroblastenmaterials.

Die Skala geht von -4 bis +4 im log<sub>2</sub>, wobei eine ansteigende Rotintensität für eine ansteigende Gen-Expression spricht. WNT2 weist hier eine hohe Expression für die normalen Genitalhautfibroblasten (Vorhaut, Genitalhöcker) auf, während die Expression für die Genitalhautfibroblasten der weiblichen AIS-Patienten (Labia majora, Genitalwülste) gering ausfällt.

NORM: normal male external genitalia, F: female external genitalia, M: normal male external genitalia, AIS: androgen-insensitivity syndrome, GSF: genital skin fibroblasts, PRF prostate fibroblast, GOF: gonadal fibroblast, FSF: forearm skin fibroblast, ASF: abdominal skin fibroblast (Holterhus et al. 2003).

## 1.6 Fragestellung

Über die genauen molekularen und genetischen Mechanismen der Entwicklung des äußeren Genitals aus dem Genitalhöcker ist bis heute noch sehr wenig bekannt. Sicher ist die Tatsache, dass die Ausdifferenzierung der Anlage bereits vor der ersten Wirkung von Steroidhormonen, also Androgenen, beginnt. Das frühe Stadium der Genitalentwicklung muss daher hormonunabhängig geschehen.

Die bereits erwähnte Umfrage der ESPED (ESPED-Umfrage: „Intersexualität und schwere Genitalfehlbildungen“, 2000-2002) zeigte deutlich die Vielfalt der Diagnosen und die Häufigkeiten assoziierter Fehlbildungen bei Intersexualitätspatienten. Dieses Ergebnis stellt einen klaren Hinweis auf die Existenz möglicher nicht primär endokrinologischer sondern genetischer Entwicklungsgendefekte dar, da Entwicklungsgene zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Entwicklung agieren. Dies führt bei Gendefekten insbesondere zu vielfältigen Fehlbildungskombinationen.

WNT2 spielt eine gesicherte Rolle in der embryonalen Entwicklung. Defekte führten bei Drosophila-Fliegen zu einer Störung der Geschlechtsdeterminierung und –differenzierung der männlichen Geschlechtsorgane. Des Weiteren weist es in Vorhautfibroblasten des Menschen, die dem Genitalhöcker entstammen, bei normal männlichen Individuen eine sehr hohe Expression auf, wohingegen es bei phänotypisch weiblichen Patienten mit 46, XY Karyotyp eine geringe bis keine Expression zeigt.

Somit ist das WNT2 Gen ein potentiell interessantes Kandidatengen der hormonunabhängigen Entwicklung der Genitalanlage. Um dieses weiter zu erhärten, sollten anhand selektierter Indexpatienten (46, XY, schwere Virilisierungsstörung, normale Steroidbiosynthese, Ausschluss eines Androgenrezeptordefektes) der Lübecker Datenbank von Betroffenen mit schweren Virilisierungsstörungen CISS (kooperative Intersexualitätsstudie) folgende Fragen untersucht werden:

- Welche Rolle spielen Mutationen des WNT2 Gens bei genitalen Anlagestörungen des Menschen?
- Welche Veränderungen des WNT2 Gens lassen sich im selektierten Patientengut identifizieren?
- Welche klinischen Befunde sind charakteristisch für Patienten mit WNT2-Veränderungen?
- Welche Bedeutung haben die gefundenen WNT2-Veränderungen für den Phänotyp?

## 2 MATERIAL UND METHODEN

Die Studie ist ein Teil von Arbeiten zu den molekularen Grundlagen der menschlichen Geschlechtsentwicklung, die im Rahmen der klinischen Forschergruppe „Intersex – Vom Gen zur Geschlechtsidentität“ (DFG KFO) durchgeführt wurden. Alle Projekte der oben genannten Forschergruppe wurden mehrfach von den Ethikkommissionen der Universität in Lübeck und Kiel bewilligt, u.a. unter den Kennzeichen D429/05 (in Kiel) sowie 01-065 (in Lübeck, 19.7.2001, Erweiterung vom 19.8.2004).

### 2.1 Patienten und Normalkontrollen

#### 2.1.1 Patientenkollektiv

Es wurden 35 Patienten im Alter von 1 Woche bis 22 Jahre molekulargenetisch auf einen Defekt des WNT2 Gens untersucht. Geführt wurden diese in der kooperativen Intersexualitätsstudie (CISS) in Lübeck, in der klinische, laborchemische und molekulargenetische Daten von z. Zt. ca. 1500 Patienten und betroffenen Familien erfasst sind.

Auswahlkriterium für die Untersuchung eines möglichen WNT2 Defekts war eine unklare Störung der Virilisierung des äußeren Genitals bei 46, XY Karyotyp. Ein Defekt des Androgenrezeptor-Gens war bei allen Patienten zuvor ausgeschlossen worden, bei einigen auch eine Mutation des 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gens. Die Bewertung des Testosteronspiegels basal und nach Stimulation mit hCG ist problematisch, da keine allgemein akzeptierten Normalwerte gelten. Die Testosteronbestimmung ist zudem sehr methodenabhängig.

Bei einigen Patienten lag als Angabe nur die Bewertung durch den Einsender ohne Zahlenwert vor. Bei Zugrundelegen publizierter Normalwerte (publiziert durch Hauffa in Stolecke 1992), die sich auf einen Radioimmunoassay nach zuvor durchgeführter Extraktion beziehen, ergeben sich bei den Patienten unterschiedliche Interpretationen. Es kann daher nicht ausgeschlossen werden, dass bei einigen der untersuchten Patienten eine primäre Gonadenstörung vorliegen könnte.

Da es sich bei dem WNT2 Gen um ein Entwicklungsgen handelt, welches zu einem sehr frühen Zeitpunkt der Entwicklung in der Embryogenese eingreift, war das Vorhandensein extragenitaler Fehlbildungen ein weiteres Einschlusskriterium in diese Studie. Ein großer Teil der Patienten wies assoziierte Fehlbildungen von Gesicht, Gliedmaßen und / oder Organen auf und / oder war in der Entwicklung retardiert (Tabelle 6-17). Bei anderen Patienten trat die Intersexualität auch bei weiteren Mitgliedern der Familie auf, sodass hier

möglicherweise eine vererbte Störung vorliegen könnte.

Unter den Patienten fanden sich drei Geschwisterpaare (Patient 169 und 170, Patient 441 und 442, Patient 450 und 451). Zwei Patienten wiesen eine positive Familienanamnese auf (Patient 353: Zwillingbruder betroffen, Patient 437: Bruder und Cousin 1.Grades betroffen).

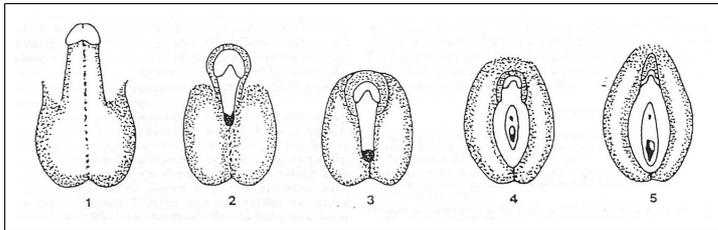
Die erst im Verlauf der Arbeit eingegangenen, kompletten Hormonwerte des Patienten 763 sprachen, im Gegensatz zur initialen Annahme, für einen hypergonadotropen Hypogonadismus. Hier liegt vermutlich eine Gonadendysgenese vor. Die Daten werden dennoch in dieser Arbeit diskutiert.

### **2.1.2 Klinische Daten**

Alle untersuchten Patienten hatten einen 46, XY Chromosomensatz. Der Phänotyp variierte und war in der überwiegenden Zahl der Fälle fast männlich oder intermediär. In den Tabellen 6-17 ist eine Übersicht der klinischen Charakteristika dargestellt. Der Ausprägungsgrad der Intersexualität und die Beurteilung des Phänotyps erfolgte nach der Einteilung von Sinnecker et al. 1996 (Abbildung 7). Bei keinem der Patienten konnten Müllersche Strukturen nachgewiesen werden, was als Zeichen intakter AMH-Bildung und –Wirkung gewertet werden konnte. Das innere Genitale war bei allen Patienten männlich. Dabei waren die Hoden meist im Leistenkanal oder dem Skrotum lokalisiert. Der Differenzierungsgrad der Wolffschen Strukturen war nur bei Patienten bekannt, bei denen eine Gonadektomie oder Probebiopsie aus dem Hoden erfolgt war. Allerdings wurde nicht immer eine Angabe über derartige Eingriffe gemacht. In keinem Fall wurde die Differenzierung der Wolffschen Strukturen verneint.

Da es sich bei dem klinischen Bild der Patienten meist um eine Virilisierungsstörung mit bisher unklarer Ursache handelte, fanden sich in der diagnostischen Vorgeschichte zahlreiche Untersuchungen. Dabei handelte sich in den meisten Fällen um Analysen des Androgenrezeptor-Gens und des 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gens, die in allen Fällen negativ ausfielen. Es konnten bei keinem der Patienten relevante molekulargenetische Veränderungen gefunden werden. Alle weiteren unter „weitere Untersuchungen“ angegebenen Tests blieben ohne pathologischen Befund.

Die extragenitalen Fehlbildungen der Patienten waren von unterschiedlichster Klinik und sind in den Tabellen 6-17 mitaufgeführt.



**Abb.7** Ausprägungsgrade der Intersexualität (nach Sinnecker et al. 1996)

1: männlich, 2: vorwiegend männlich, 3: ambivalent, 4: vorwiegend weiblich, 5: weiblich.

**Tabelle 6:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 10-169

Patient	10	60	169
Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung	1 Woche	22 Jahre	14 Jahre
Karyotyp	46, XY	46, XY	46, XY
Phänotyp (Genitale)	ambivalent (3)	vorwiegend männlich (2)	weiblich (5)
Müllersche Strukturen	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
Wolffsche Strukturen	unbekannt	unbekannt	unbekannt
Hoden(lokalisation)	im Leistenkanal	im Leistenkanal	intraabdominell
Gonadektomie	nein	nein	unbekannt
extragenitale Fehlbildungen	4x Hexadaktylie, kompletter AV-Kanal, auffällige Fazies	Nierenagenesie bds.	psychosomot.Retardierung, Minderwuchs, auffällige Fazies
weitere Untersuchungen	Androgenrezeptor-Gen Cholesterin-Metabolite	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen
Testosteronwert basal (Normwerte)	altersentsprechend normal	altersentsprechend normal	1,8 ng/dl (29-470 ng/dl)
Testosteronwert stimuliert	keine Angabe	keine Angabe	keine Angabe

**Tabelle 7:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 170-276

Patient	170	250	276
<b>Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung</b>	13 Jahre	6 Wochen	1 Jahr
<b>Karyotyp</b>	46, XY	46, XY	46, XY
<b>Phänotyp</b>	weiblich (5)	vorwiegend männlich (2)	ambivalent (3)
<b>Müllersche Strukturen</b>	nicht nachweisbar	fraglich	fraglich
<b>Wolffsche Strukturen</b>	unbekannt	differenziert	unbekannt
<b>Hoden(lokalisation)</b>	intraabdominell	im Leistenkanal	im Leistenkanal
<b>Gonadektomie</b>	unbekannt	nein, nur Probebiopsie	nein
<b>extragenitale Fehlbildungen</b>	psychomot.Retardierung, Minderwuchs	VSD v. Sekundum-Typ, Nierenfehlbildung	Lissenzephalie
<b>weitere Untersuchungen</b>	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen
<b>Testosteronwert basal (Normwerte)</b>	3 ng/dl (11-274 ng/dl)	102 ng/dl (90-255 ng/dl)	52,8 ng/dl (2-13 ng/dl)
<b>Testosteronwert stimuliert</b>	keine Angabe	keine Angabe	157,1 ng/dl

**Tabelle 8:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 293-335

Patient	293	305	335
<b>Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung</b>	3 Jahre	1 Jahr	1 Jahr
<b>Karyotyp</b>	46, XY	46, XY	46, XY
<b>Phänotyp</b>	männlich (1)	vorwiegend männlich (2)	weiblich (5)
<b>Müllersche Strukturen</b>	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar
<b>Wolffsche Strukturen</b>	unbekannt	unbekannt	differenziert
<b>Hoden(lokalisation)</b>	im Leistenkanal	im Leistenkanal	im Leistenkanal
<b>Gonadektomie</b>	nein	nein	ja, beidseits kurz nach der Geburt
<b>extragenitale Fehlbildungen</b>	Minderwuchs, auffällige Fazies, Klinodaktylie	psychomot.Retardierung, Minderwuchs, auffällige Fazies, Klinodaktylie	Mikrocephalus
<b>weitere Untersuchungen</b>	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen
<b>Testosteronwert basal (Normwerte)</b>	2,0 ng/dl (2-9 ng/dl)	altersentsprechend normal	altersentsprechend normal
<b>Testosteronwert stimuliert</b>	12,0 ng/dl	altersentsprechend normal	keine Angabe

**Tabelle 9:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 353-441

Patient	353	437	441
Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung	2 Jahre	3 Wochen	1 Jahr
Karyotyp	46, XY	46, XY	46, XY
Phänotyp	vorwiegend männlich (2)	vorwiegend männlich (2)	ambivalent (3)
Müllersche Strukturen	nicht nachweisbar	keine	fraglich
Wolffsche Strukturen	unbekannt	differenziert	unbekannt
Hoden(lokalisation)	links im Skrotum rechts im Leistenkanal	bds. im Skrotum	im Leistenkanal
Gonadektomie	nein	nein, nur Probenbiopsie	nein
extragenitale Fehlbildungen	keine	keine	keine
weitere Untersuchungen	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen
Testosteronwert basal (Normwerte)	altersentsprechend normal	altersentsprechend normal	3,5 ng/dl (2-13 ng/dl)
Testosteronwert stimuliert	keine Angabe	altersentsprechend normal	95,0 ng/dl

**Tabelle 10:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 442-451

Patient	442	450	451
Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung	7 Jahre	12 Jahre	15 Jahre
Karyotyp	46, XY	46, XY	46, XY
Phänotyp	vorwiegend weiblich (4)	ambivalent (3)	ambivalent (3)
Müllersche Strukturen	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht vorhanden
Wolffsche Strukturen	differenziert	differenziert	differenziert
Hoden(lokalisation)	intraabdominell	im Leistenkanal	im Skrotum/ in den großen Labien
Gonadektomie	ja	ja	nein, nur Probenbiopsie
extragenitale Fehlbildungen	keine	psychomot.Retardierung, Anfallsleiden	psychomot.Retardierung, Anfallsleiden
weitere Untersuchungen	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen
Testosteronwert basal (Normwerte)	3,5 ng/dl (2-9 ng/dl)	1,9 ng/dl (11-274 ng/dl)	2,3 ng/dl (29-470 ng/dl)
Testosteronwert stimuliert	31,0 ng/dl	keine Angabe	keine Angabe

**Tabelle 11:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 476-513

Patient	476	502	513
<b>Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung</b>	5 Jahre	2 Wochen	2 Jahre
<b>Karyotyp</b>	46, XY	46, XY	46, XY
<b>Phänotyp</b>	ambivalent (3)	vorwiegend männlich (2)	vorwiegend männlich (2)
<b>Müllersche Strukturen</b>	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	unbekannt
<b>Wolffsche Strukturen</b>	unbekannt	unbekannt	unbekannt
<b>Hoden(lokalisation)</b>	im Leistenkanal	im Leistenkanal	im Skrotum
<b>Gonadektomie</b>	unbekannt	unbekannt	nein
<b>extragenitale Fehlbildungen</b>	psychomot. Retardierung, cerebrale Fehlbildung	Fußdeformitäten	auffällige Fazies, Femoralhypoplasie
<b>weitere Untersuchungen</b>	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen
<b>Testosteronwert basal (Normwerte)</b>	altersentsprechend normal	3,0 ng/dl (43-236 ng/dl)	altersentsprechend normal
<b>Testosteronwert stimuliert</b>	altersentsprechend normal	340,0 ng/dl	keine Angabe

**Tabelle 12:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 529-553

Patient	529	543	553
<b>Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung</b>	10 Jahre	3 Jahre	10 Jahre
<b>Karyotyp</b>	46, XY	46, XY	46, XY
<b>Phänotyp</b>	ambivalent (3)	vorwiegend weiblich (4)	vorwiegend männlich (2)
<b>Müllersche Strukturen</b>	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	unbekannt
<b>Wolffsche Strukturen</b>	differenziert	differenziert	unbekannt
<b>Hoden(lokalisation)</b>	im Skrotum	intraabdominell	im Skrotum
<b>Gonadektomie</b>	nein, nur Probiopsie	nein, nur Probiopsie	nein
<b>extragenitale Fehlbildungen</b>	mediane Gaumenspalte mit doppelter Uvula	psychomot. Retardierung, auffällige Fazies,	psychomot. Retardierung, auffällige Fazies, Minderwuchs
<b>weitere Untersuchungen</b>	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen
<b>Testosteronwert basal (Normwerte)</b>	5,4 ng/dl (5,5-36 ng/dl)	3,4 ng/dl (2-9 ng/dl)	20 ng/dl (5,5-36 ng/dl)
<b>Testosteronwert stimuliert</b>	38,0 ng/dl	keine Angabe	keine Angabe

**Tabelle 13:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 611-727

Patient	611	681	727
<b>Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung</b>	3 Wochen	4 Jahre	1 Jahr
<b>Karyotyp</b>	46, XY	46, XY	46, XY
<b>Phänotyp</b>	vorwiegend männlich (2)	vorwiegend männlich (2)	ambivalent (3)
<b>Müllersche Strukturen</b>	nicht vorhanden	nicht nachweisbar	fraglich
<b>Wolffsche Strukturen</b>	differenziert	unbekannt	differenziert
<b>Hoden(lokalisation)</b>	im Skrotum	rechts im Leistenkanal links im Skrotum	im Skrotum
<b>Gonadektomie</b>	nein, nur Probebiopsie	nein	nein
<b>extragenitale Fehlbildungen</b>	Vierfingerfurche bds.	mot. Retardierung, Fußdeformität	Nierenagenesie, Daumenanhängsel, Ohrmuschedysplasie
<b>weitere Untersuchungen</b>	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen
<b>Testosteronwert basal (Normwerte)</b>	55,0 ng/dl (43-236 ng/dl)	2,0 ng/dl (2-9 ng/dl)	0,7 ng/dl (2-13 ng/dl)
<b>Testosteronwert stimuliert</b>	187,0 ng/dl	134,0 ng/dl	15,2 ng/dl

**Tabelle 14:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 763-903

Patient	763	794	903
<b>Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung</b>	15 Jahre	< 1 Jahr	4 Monate
<b>Karyotyp</b>	46, XY	46, XY	46, XY
<b>Phänotyp</b>	vorwiegend männlich (2)	ambivalent (3)	vorwiegend weiblich (4)
<b>Müllersche Strukturen</b>	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	unbekannt
<b>Wolffsche Strukturen</b>	differenziert	unbekannt	unbekannt
<b>Hoden(lokalisation)</b>	intraabdominell	unbekannt	in den großen Labien
<b>Gonadektomie</b>	nein, nur Probebiopsie	unbekannt	nein
<b>extragenitale Fehlbildungen</b>	Minderwuchs, ASD, Innenohrschwerhörigkeit, Agranulozytose	auffällige Fazies, Vierfingerfurche bds.	bronchopulmonale Dysplasie, Herzfehlbildung
<b>weitere Untersuchungen</b>	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen, G-CSF-Rezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen
<b>Testosteronwert basal (Normwerte)</b>	19,2 ng/dl (pubertär) (29-470 ng/dl)	7,0 ng/dl (2-13 ng/dl)	12,5 ng/dl (2-13 ng/dl)
<b>Testosteronwert stimuliert</b>	keine Angabe	24,0 ng/dl	keine Angabe

**Tabelle 15:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 913-1105

Patient	913	934	1105
<b>Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung</b>	12 Jahre	< 1 Jahr	1 Woche
<b>Karyotyp</b>	46, XY	46, XY	46, XY
<b>Phänotyp</b>	vorwiegend männlich (2)	ambivalent (3)	vorwiegend männlich (2)
<b>Müllersche Strukturen</b>	unbekannt	fraglich	nicht nachweisbar
<b>Wolffsche Strukturen</b>	unbekannt	unbekannt	unbekannt
<b>Hoden(lokalisation)</b>	Leistenhoden	rechts im Skrotum links im Leistenkanal	im Skrotum
<b>Gonadektomie</b>	nein	nein	nein
<b>extragenitale Fehlbildungen</b>	psychomot.Retardierung, Minderwuchs	Entwicklungsretardierung	Analatresie
<b>weitere Untersuchungen</b>	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen	Androgenrezeptor-Gen
<b>Testosteronwert basal (Normwerte)</b>	altersentsprechend normal	3,5 ng/dl  (2-13 ng/dl)	41,6 ng/dl  (13-50 ng/dl)
<b>Testosteronwert stimuliert</b>	altersentsprechend normal	101,0 ng/dl	keine Angabe

**Tabelle 16:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 1131-1160

Patient	1131	1138	1160
<b>Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung</b>	2 Jahre	3 Jahre	5 Jahre
<b>Karyotyp</b>	46, XY	46, XY	46, XY
<b>Phänotyp</b>	vorwiegend männlich (2)	vorwiegend männlich (2)	vorwiegend männlich (2)
<b>Müllersche Strukturen</b>	nicht nachweisbar	nicht nachweisbar	nicht vorhanden
<b>Wolffsche Strukturen</b>	unbekannt	unbekannt	unbekannt
<b>Hoden(lokalisation)</b>	unbekannt	Leistenkanal	im Skrotum
<b>Gonadektomie</b>	unbekannt	unbekannt	unbekannt
<b>extragenitale Fehlbildungen</b>	auffällige Fazies, mediane Gaumenspalte, Minderwuchs, Vitum	psychomot.Retardierung, auffällige Fazies	VSD
<b>weitere Untersuchungen</b>	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen
<b>Testosteronwert basal (Normwerte)</b>	altersentsprechend normal	altersentsprechend normal	0,14 ng/dl  (2-9 ng/dl)
<b>Testosteronwert stimuliert</b>	keine Angabe	altersentsprechend normal	1,3 ng/dl

**Tabelle 17:** Klinische Daten der untersuchten Patienten 1226 und 1342

Patient	1226	1342
<b>Alter zum Zeitpunkt der Untersuchung</b>	7 Monate	15 Jahre
<b>Karyotyp</b>	46, XY	46, XY
<b>Phänotyp</b>	vorwiegend männlich (2)	ambivalent (3)
<b>Müllersche Strukturen</b>	unbekannt	nicht nachweisbar
<b>Wolffsche Strukturen</b>	unbekannt	unbekannt
<b>Hoden(lokalisierung)</b>	im Leistenkanal	unbekannt
<b>Gonadektomie</b>	nein	unbekannt
<b>extragenitale Fehlbildungen</b>	Gaumenspalte, Sagittalnahtsynostose	psychomot.Retardierung, Gaumenspalte
<b>weitere Untersuchungen</b>	Androgenrezeptor-Gen, 5 $\alpha$ -Reduktase2-Gen	Androgenrezeptor-Gen
<b>Testosteronwert basal</b>	altersentsprechend normal	altersentsprechend normal
<b>Testosteronwert stimuliert</b>	keine Angabe	altersentsprechend normal

### 2.1.3 Normalkontrollen

Um potenzielle Veränderungen in der SSCP-Analyse der Patienten-DNA auch bei klinisch gesunden Individuen zu überprüfen, wurden 20 Normalkontrollen in die Studie miteinbezogen. Diese Gruppe bestand aus 10 Individuen mit einem 46, XX Karyotyp und weiblichem Phänotyp (1w-10w), sowie 10 Kontrollen mit 46, XY Karyotyp und männlichem Phänotyp (1m-10m). Alle Individuen dieser Gruppe waren zufällig gewählte, freiwillige Probanden. Die SSCP-Analyse der Normalkontrollen erfolgte bei allen Abschnitten, in denen Auffälligkeiten bei der molekulargenetischen Untersuchung der Patienten-DNA aufgetreten waren.

Zusätzlich wurde bei jeder PCR und SSCP-Analyse, auch bei der Patientenuntersuchung, die Probe N4 mitgeführt. Zur Vereinfachung war die N4-Probe vor Beginn der Versuchsreihe als „normal“ definiert worden (46, XY, normal männlich). Sie diente dem direkten Vergleich der Bandenmuster.

## 2.2 Materialien

### 2.2.1 Chemikalien und Gebrauchslösungen

Agarose	AGS GmbH, Heidelberg
APS	USB Cop., Cleaveland, USA
Big Dye	
Borsäure	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Bromphenolblau	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
dNTP (Desoxyribonukleotide) Set (100nM) (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	Amersham Pharmacia Biotech, Freiburg
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 ΦX174 RF DNA Hae III Digest	New England Biolabs, USA
Natriumbicarbonat	Merck, Darmstadt
Polyacrylamidlösung (Rotiphorese-Gel 30)	Carl Roth GmbH&Co, Karlsruhe
Salpetersäure	Merck, Darmstadt
Salzsäure	Merck, Darmstadt
SDS	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Silbernitrat	Caesar&Loretz GmbH, Hilden
Taq Polymerase (AmpliTaq®)	Roche, Grenzach Wyhlen
TEMED, Fertiglösung	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Trizma® Base	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim
Xylene Cyanol	Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Steinheim

### 2.2.2 Einmalartikel

Klebeband  
(Electrical Tape)

Biometra, Göttingen

Pipettenspitzen

Sarstedt AG&Co, Nümbrecht

Reagiergefäße 1,5ml  
(Micro Tubes)

Sarstedt AG&Co, Nümbrecht

### 2.2.3 Geräte

Elektrophoresekammer für SSCP  
(Model S2)

Life Technologies, Inc.

Gelkammer und –träger

Whatman Biometra, Göttingen

PCR-Thermocycler  
(PTC-200)

Biozym Diagnostik GmbH,  
Hessisch Oldendorf

Pipetten

Eppendorf AG, Hamburg

Rüttler  
(Vortex Genie – 2)

Scientific Industries

Spannungsgerät für Agarosegele

Micro-Bio-Tec-Brand, Gießen

Spannungsgerät für SSCP  
(ECPS 3000/150)

Amersham Pharmacia Biotech,  
Freiburg

UV-Leuchttisch  
(Macro Vue UV-25)

Hoefer

Zentrifuge

Sigma-Aldrich Chemie GmbH,  
Steinheim

### 2.2.4 Kits

Für die DNA-Aufreinigung

QIA quick® PCR Purification Kit

Qiagen GmbH, Hilden

Für die DNA-Isolierung

QIAamp DNA Blood Maxi Kit

Qiagen GmbH, Hilden

### 2.2.5 Primer

PCR-Primer

TIB® Molbiol Syntheselabor,  
Berlin

Primer-Sequenzen Exon 1 und Exon 3A bis 4B nach Wassink et al. (2001),  
die Primer-Sequenzen Exon 2 und Exon 5A bis 5E wurden neu bestimmt

s = sense, a = antisense

Exon 1:	s	5'-GACCTGATGCAGACGCAAG-3'
	a	5'-GATAAGAGGGCAGTAGCCAG-3'
Exon 2:	s	5'-CGTTGCCCTCACCTCTGTGT-3'
	a	5'-AGTGGAGAGCCATAGGGCTG-3'
Exon 3A:	s	5'-CTGTGATCCAAAGAAGATGG-3'
	a	5'-CCTACAAAATGAGCACCGTTGC-3'
Exon 3B:	s	5'-GCTACCGGACCACTTTTAAG-3'
	a	5'-CCTTTGCATCCACAAATGCG-3'
Exon 4A:	s	5'-GAAAACGGGCGATTATCTCTGG-3'
	a	5'-GAGAGCAGGCTGAAAATACAG-3'
Exon 4B:	s	5'-GCTCGAACCTCACTGAACTTGC-3'
	a	5'-CGTTGGCTTCTTAAACCTCTCG-3'
Exon 5A:	s	5'-CTTGTCTTCCAGGCTCCCTG-3'
	a	5'-GAAGGGAAGGTGGATGGTGAC-3'
Exon 5B:	s	5'-CTGGACAACCGCTACATGACC-3'
	a	5'-CAGTGGTCTGGGCCACCAC-3'
Exon 5C:	s	5'-CTCCTGGCGAGTTCTCTTTG-3'
	a	5'-CCCCTAAGGGTGGTAGCTG-3'
Exon 5D:	s	5'-GACCAAGACTTTTGTCTGATC-3'
	a	5'-CTTCGGATTCTAAGTGAGAAG-3'
Exon 5E:	s	5'-CTTTAGGGAATGAGAGTTCC-3'
	a	5'-CCTTCAAGTCTTTCAGTTATG-3'

## 2.3 Methoden

### 2.3.1 DNA-Isolierung

Die Extraktion genomischer DNA wurde mit dem QIAamp DNA Blood Maxi Kit aus Leukozyten in EDTA-Blut durchgeführt.

### 2.3.2 Ansetzen der Gebrauchslösungen

#### 2.3.2.1 Stammlösungen

**EDTA:** Als Stammlösung wurde 250mM EDTA-Verdünnung verwendet, dabei wurden 93,05g EDTA in einem Liter Aqua bidest gelöst.

**10xTBE:** Zur Herstellung wurden 1090g 0,9M Trizma® Base, 566,6g 0,9M Borsäure und 93g 0,025M EDTA (mit Natrium) in 10 Litern Aqua bidest gelöst und auf einen pH-Wert von 8,3 auftitriert.

**1xTE:** 12,1g 0,1M Trizma®Base und 2,92g 0,01M EDTA (natriumfrei) wurden in einem Liter Aqua bidest gelöst. Der pH-Wert wurde mit Salzsäure auf 7,5 eingestellt.

**Ethidiumbromid:** Das Ansetzen der Stammlösung erfolgte durch Verdünnung von 10mg Ethidiumbromid in 1ml Aqua bidest.

#### 2.3.2.2 Färbelösungen

**Agarose-Färbepuffer:** Als Lösung wurden 25ml Glycerin, 10µl Bromphenolblau, 0,5ml Trizma®Base (pH 8,0), 0,5ml 10%ige SDS und 0,3ml 0,5M EDTA mit Aqua bidest auf 50ml aufgefüllt.

**Bluestop-Färbepuffer:** In 30ml Aqua bidest wurden 28,5ml Formamid, 0,22g EDTA, 0,015g Bromphenolblau und 0,015g Xylene Cyanol gelöst.

#### 2.3.2.2 sonstige Lösungen

**APS:** 10g Ammoniumpersulfat wurden in 100ml ddH<sub>2</sub>O gelöst (10%ige Lösung).

**Längenmarker für Agarose- und SSCP-Gele:** Es wurden 98µl Agarose-Färbepuffer (siehe oben) mit 2µl Marker ΦX174 RF DNA Hae III Digest versetzt.

### 2.3.3 Primerherstellung

#### 2.3.3.1 erste Stammlösung (Super-Stock-Lösung)

Die Lieferung der Primer erfolgte gefriergetrocknet. Es erfolgte das Lösen der gelieferten Menge in 10µl 1xTE-Puffer. Diese Verdünnung mit einer durchschnittlichen Konzentration von 100µg/µl wurde als Stammlösung weiterverwendet.

#### 2.3.3.2 zweite Stammlösung (Stock-Lösung)

1µl der Super-Stock-Lösung wurde mit 9µl 1xTE-Puffer verdünnt. So entstand eine Konzentration von durchschnittlich 10µg/µl (Stock-Lösung).

#### 2.3.3.3 Arbeitsverdünnung

Um eine Primer-Lösung in der Konzentration 20pmol/µl zu erhalten, wurden 1µl der Stock-Lösung mit einer genau errechneten Menge 1xTE verdünnt.

Die Errechnung erfolgte mit folgender Formel:

$$X\mu\text{l } 1x\text{TE} = \frac{[\mu\text{g}/\mu\text{l}]}{(\text{Basenanzahl des Primers} \times 0,0066)}$$

Die resultierende Menge lag bei 50-64µl 1xTE.

### 2.3.4 Amplifikation der DNA

Die Exons 1A-5E wurden mit Hilfe der Polymerase Kettenreaktion (PCR) einzeln amplifiziert (Mullis und Faloona 1987). Die Sequenzen der verwendeten Primer von Exon 2 und Exon 5A-5E wurden für diese Studie neu entworfen, die von Exon 1A und 3A-4B von Wassink et al. (2001) übernommen. Zur Reduzierung der Fragmentlänge erfolgte die Aufteilung einiger Exons in mehrere Abschnitte, die nach dem Alphabet benannt wurden. Als DNA-Polymerase diente Taq-Polymerase (Roche). Der Ansatz einer Probe (Zusammensetzung Tabelle 18) wurde in ein 0,5ml Gefäß (MicroTube) gefüllt.

**Tabelle 18:** Zusammensetzung des PCR-Ansatzes

Reagenzien	Pro Probe (in $\mu\text{l}$ )
DNA-Arbeitsverdünnung [100ng/ $\mu\text{l}$ ]	1
Primer sense (20pmol)	1
Primer antisense (20pmol)	1
10xPuffer	5
dNTPs (200 $\mu\text{M}$ )	5
Taq Polymerase (0,5U)	0,1
ddH <sub>2</sub> O	37

Die Amplifikation erfolgte in einem programmierbaren Thermocycler (Biozym Diagnostik GmbH, Hessisch Oldendorf). Dabei wurde für alle Exons das gleiche Programm mit 36 Zyklen verwendet. In der initialen Phase von 3 min bei 94°C erfolgte die Denaturierung des DNA-Doppelstrangs in zwei Einzelstränge. Danach kam es in der zweiten Phase von 30 sec und einer für jedes Exon varrierenden Anlagerungstemperatur (Annealing-Temperatur) (Tabelle 19) zur Anlagerung der Primer an die DNA-Einzelstränge. Darauf folgte die Elongationsphase von 30 sec bei 72°C. Um für den nächsten Zyklus wieder Einzelstränge zur Verfügung zu haben wurde in einem weiteren Schritt erneut für 30 sec bei 94°C denaturiert. Nach 35maliger Wiederholung des oben beschriebenen Zyklus aus Anlagerung, Elongation und Denaturierung erfolgte abschließend eine Elongationsphase von 5 min bei 72°C. Anschließend wurden die Proben bis zur weiteren Verarbeitung bei 4°C gekühlt. Alle Exons konnten vollständig amplifiziert werden. Eine Normalkontrolle (N4) und eine Leerprobe (=Negativkontrolle) wurden bei jedem Vorgang mitgeführt.

**Tabelle 19:** PCR-Bedingungen für die Exons 1-5E des WNT2 Gens

Exon	Fragment-Länge (bp)	Anlagerungs-Temperatur (°c)	Puffer-pH	[MgCl <sub>2</sub> ] (mmol/l) im Puffer	[dNTP]
1	234	56	8,8	1,0	200 $\mu\text{M}$
2	304	59	8,4	1,0	200 $\mu\text{M}$
3A	213	58	8,8	1,0	200 $\mu\text{M}$
3B	255	55	8,6	2,0	200 $\mu\text{M}$
4A	263	58	8,8	1,0	200 $\mu\text{M}$
4B	244	62	8,4	1,5	200 $\mu\text{M}$
5A	274	60	8,4	2,0	200 $\mu\text{M}$
5B	319	62	8,4	1,5	200 $\mu\text{M}$
5C	310	57	8,4	2,0	200 $\mu\text{M}$
5D	299	55	8,4	2,0	200 $\mu\text{M}$
5E	227	53	8,4	2,0	200 $\mu\text{M}$

### **2.3.5 Agarosegelelektrophorese**

#### **2.3.5.1 Prinzip**

Die Agarosegelelektrophorese wird dazu verwendet, die DNA-Fragmente nach ihrer Größe aufzutrennen und darzustellen. Sie nutzt die Polarität von Molekülen aus um damit eine Wanderung im Elektrischen Feld zu erreichen. Anschließend werden die Banden durch eine Ethidiumbromidfärbung und UV-Licht sichtbar gemacht. Der Erfolg der Amplifikation kann durch visuelle Beurteilung der Banden ermittelt werden. Außerdem ist es mit Hilfe eines DNA-Längenmarkers möglich, die Größe des Fragmentes zu bestimmen.

#### **2.3.5.2 Durchführung**

Zur Herstellung der Agarosegele wurden 2,0g Agarose in 100ml 1xTBE-Puffer erhitzt (Mikrowelle). Zwei Gelträger mussten abgedichtet und mit zwei Kämmen zur Bildung der Geltaschen versehen. Anschließend wurde die etwas erkaltete Gellösung vorsichtig eingefüllt. Nach einer Abkühlzeit von 15 min waren die Gele erstarrt und gebrauchsfertig. Sie wurden in die Elektrophoresekammer eingehängt und diese mit Puffer aufgefüllt.

Zur Vorbereitung der Proben wurden je 5µl der amplifizierten DNA mit 5µl Agarosefärbepuffer vermischt und in die Geltaschen appliziert. In eine Tasche kamen außerdem 10µl eines DNA-Längenmarkers.

Mit einer Spannung von 100 V über 45 min erfolgte die Elektrophorese. Das Gel wurde anschließend 10 min in Ethidiumbromid (2µg/ml) gefärbt und weitere 10 min in Aqua bidest gewaschen. Unter UV-Licht wurden die Banden sichtbar gemacht und durch eine Polaroidaufnahme dokumentiert und ausgewertet.

### **2.3.6 SSCP-Analyse**

#### **2.3.6.1 Prinzip**

Die SSCP (Single Stranded Conformation Polymorphism)-Analyse dient der Darstellung von Konformationsänderungen durch unterschiedliche Basenabfolgen der DNA. Dabei dienen PCR-amplifizierte Fragmente des zu untersuchenden Gens als Ausgangsmaterial. Diese werden durch kurzes Erhitzen auf 95°C in Einzelstränge getrennt (denaturiert) und in einem denaturierenden Ladepuffer auf ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel aufgetragen und einer Elektrophorese ausgesetzt. Treten die DNA-Stränge in das Gel ein, nehmen sie eine Sekundärstruktur an, die sich aufgrund ihrer Basenzahl und -abfolge ergibt (Orita et al. 1989B). Sind Veränderungen in der Basensequenz vorhanden, kommt es durch die Änderung der Sekundärstruktur zu einem veränderten Wanderungsverhalten des

Fragments, einem sogenannten „Gelshift“. Durch eine Silbernitratfärbung lässt sich das spezifische Bandenmuster sichtbar machen (Kanazawa et al. 1986).

Durch den Vergleich der Patientenproben mit einer Normalkontrolle lassen sich Gelshifts erkennen die somit möglicherweise auf einen DNA-Polymorphismus oder eine Mutation hinweisen können.

### 2.3.6.2 Durchführung

#### Gelerstellung

Es wurde ein nicht-denaturierendes Polyacrylamid-Gel verwendet (Zusammensetzung Tabelle 20). Alle Substanzen wurden mit einem Magnetührstab vermischt. Nach dem hinzufügen von TEMED startete die Polymerisierung. Die Polyacrylamidlösung bestand dabei aus 30% Acrylamid und 0,8% Bisacrylamid (Rotiphorese-Gel). Der Glycerinanteil lag bei 10% und sorgte für eine bessere Auftrennung der Fragmente.

Die Gelkammer bestand aus zwei Glasplatten (Maße: 32 x 38cm, 32 x 40cm), die durch einen Spacer (0,8cm dick) voneinander getrennt waren. Diese Konstruktion war an drei Seiten mit Klebeband fixiert. Dabei blieb die Seite, an der die eine Platte die andere überragte, offen. Hier wurde die Gelmischung unmittelbar nach dem Rühren zwischen die Glasplatten luftblasenfrei eingefüllt. Danach erfolgte das vorsichtige Einsetzen des Kammes zur Bildung der Geltaschen und die Polymerisierung des Gels bei Raumtemperatur für 45-60 min. Um bei der Elektrophorese den Stromfluss zu ermöglichen, wurde nach dem Aushärten das Klebeband an der unteren, kurzen Seite entfernt. Der Kamm wurde herausgenommen, das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und mit 1xTBE-Puffer bedeckt. Unmittelbar vor dem Auftragen der Proben erfolgte das Spülen der Geltaschen mittels Pasteurpipette.

**Tabelle 20:** Zusammensetzung der SSCP-Gele

	10% Glycerin
10xTBE	15ml
30% PAA	30ml
Glycerin	15ml
Aqua bidest	89ml
10% APS	1ml
TEMED	70µl

**Probenvorbereitung**

Jeweils 15 µl amplifizierte DNA oder 15 µl SSCP-Marker wurden mit 10 µl Bluestop in einem Reagiergefäß vermischt und zentrifugiert. Dabei diente der Bluestop-Ladepuffer als Vehikel für die DNA und als Indikator für die Laufstrecke während der Elektrophorese. Anschließend erfolgte die Denaturierung bei 95°C für 10 min aller Proben, ausgenommen einem zweiten Ansatz der Normalkontrolle sowie des SSCP-Markers. Um nicht wieder DNA-Doppelstränge entstehen zu lassen wurden die Proben auf Eis gekühlt und unverzüglich jeweils 15 µl in die Geltaschen geladen.

**Elektrophorese**

Bei 9-50 Watt für 8-15 Stunden erfolgte die Auftrennung der aufgetragenen Proben. Die Laufzeit der Proben hing von der Glycerinkonzentration und der Wattzahl ab und wurde daher bei jedem Durchlauf neu bestimmt. Auf eine konstante Umgebungstemperatur von 19-21°C wurde geachtet, um die SSCP-Analyse nicht zu beeinträchtigen (Spinardi et al. 1991).

**Silbernitratfärbung**

Die Anfärbung der DNA-Banden im SSCP-Gel erfolgte durch eine Standard-Silberfärbung (Merril et al. 1981, Bassam et al. 1991). Dazu wurde das Gel zwischen den Glasplatten aus der Elektrophorese-Apparatur herausgenommen. Nach Entfernung der Klebebänder konnten die Glasplatten voneinander gelöst und das Gel mit Hilfe einer Folie in die Färbeschale übertragen werden. Die Färbung erfolgte nach einem genauen zeitlichen Ablauf (Tabelle 21). Zunächst wurde das Gel in Ethanol fixiert und die DNA mit Salpetersäure denaturiert. Aqua bidest diente jeweils zum Auswaschen der Chemikalien. Mit Silbernitrat wurde das Gel gefärbt und anschließend mit Natriumbicarbonat und Formaldehyd entwickelt. Diese Reaktion wurde mit Essigsäure beendet. Danach erfolgte die Fixierung des Gels mit EDTA und gründliches Spülen mit Aqua bidest. Das Gel konnte anschließend in Plastikfolie eingeschweißt und ausgewertet werden.

**Tabelle 21:** Ablauf der Silbernitratfärbung

<b>Zeitablauf</b>	<b>Vorgang</b>
5 min	10% Ethanol
3 min	1% Salpetersäure
2x1 min	Aqua bidest
30-40 min	Silbernitrat
2x1 min	Aqua bidest
kurz	Entwickler (Natriumbicarbonat)
1 min	Aqua bidest
max. 5 min	Entwickler
1 min	Essigsäure
5 min	50mM EDTA pH 8,0
5 min	Aqua bidest

### 2.3.7 Sequenzieren

#### 2.3.7.1 Prinzip

Die Sequenzierung basierte auf dem Prinzip der Kettenabbruchreaktion nach Sanger et al. 1977. Im Unterschied zum traditionellen Sanger-Verfahren wurden keine radioaktiven Bausteine, sondern farblich markierte Didesoxyribonukleotide (ddNTPs) verwendet, wobei jede der vier Basen mit einer unterschiedlichen Farbe versehen war („Four Color Sequencing“). Die Sequenzierung wurde in unserem Labor vorgenommen und danach das Reaktionsprodukt luftgetrocknet in das Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie der Universitätsklinik Hamburg Eppendorf geschickt. Dort erfolgte in einem automatischen Kapillar-Sequenzierer des Typs 377 (Applied Biosystems) das Ablesen der Basenfolge. Das getrocknete DNA-Material wurde dazu jeweils in einem Formamid-Puffer gelöst und in einer gelgefüllte Kapillare einer Elektrophorese ausgesetzt. Dabei wanderten die unterschiedlich langen Fragmente unterschiedlich weit. Ein Laser erkannte jeweils die Laufstrecke und die Farbe der entstandenen Banden. Die Signale wurden digitalisiert, in Kurven umgesetzt und zur Auswertung an unser Labor zurückgesendet.

#### 2.3.7.2 Durchführung

Für die Sequenzierung wurden die gleichen Primer verwendet wie für die Amplifikation mittels PCR. Für die Reaktion wurde aufgereinigte, mittels PCR amplifizierte DNA verwendet. Die Aufreinigung erfolgte durch das QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen). 5 µl DNA wurden in einem 0,5 ml Gefäß (Micro Tube) mit 11 µl Aqua bidest, 6 µl 2,5xPuffer und 0,75 µl Primer (20pmol/ µl) vermischt. Da beim Sequenzieren immer nur ein Strang der DNA abgelesen werden kann, wurde bei der Amplifikation jeweils nur ein

Primer (sense oder antisense) in einen Ansatz pipettiert. Anschließend wurden 2 µl Big Dye (Perkin Elmer) hinzugegeben. Dies enthielt die farblich markierten ddNTPs.

Die Proben wurden dann in den Thermocycler gestellt und somit die Synthese der Abbruchfragmente gestartet. Der zeitliche Ablauf ist in Tabelle 22 dargestellt.

Die Ansätze wurden anschließend in 1,5 ml Gefäße umgefüllt, mit Aqua bidest, 3M Natriumacetat und 100%igem Ethanol vermischt und bei höchster Stufe zentrifugiert. Es entstand ein Absatz am Boden des Gefäßes (Pellet). Nach Abpipettieren des Überstandes wurde das Pellet in 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und der Überstand verworfen. Die Proben wurden luftgetrocknet und nach Hamburg transportiert.

Die Sequenzierung erfolgte bei allen DNA-Abschnitten, die in der SSCP-Analyse auffällige Laufmuster zeigten.

**Tabelle 22:** PCR-Programm für die Sequenzierung

	Temperatur	Zeit	Zykluszahl
<b>initiale Denaturierung</b>	96°C	3 min	1
<b>Denaturierung</b>	96°C	30 sec	25
<b>Anlagerung</b>	50°C	15 sec	
<b>Elongation</b>	60°C	4 min	
<b>Kühlung</b>	4°C	∞	1

### 3 ERGEBNISSE

#### 3.1 Ergebnis der molekulargenetischen Analyse

Die molekulargenetische Untersuchung gelang bei allen untersuchten Patienten. Es konnten alle 5 Exons sowie die Intron-Exon-Übergänge des WNT2 Gens amplifiziert und sequenziert werden. Bei Exon 1 beschränkte sich die Analyse auf den translatierten Bereich und dessen Übergang zur 5'UTR (untranslatierte Region). Die verwendeten Primer für Exon 1 und Exon 3A bis 4B wurden von Wassink et al. (2001) übernommen. Für Exon 2 und Exon 5A bis 5E waren die Primersequenzen neu bestimmt. Die SSCP-Analyse lieferte Anhalt für den Verdacht auf eine Veränderung der Basenabfolge. Sie konnten in der Sequenzierung als SNPs (single-nucleotide polymorphism) identifiziert und charakterisiert werden.

Es wurden keine Mutationen gefunden, die prädiktiv zu einem Aminosäureaustausch führen würden. Weder die SSCP-Analyse noch die anschließende Sequenzierung lieferte Anhalte für den Verdacht eines Gendefektes.

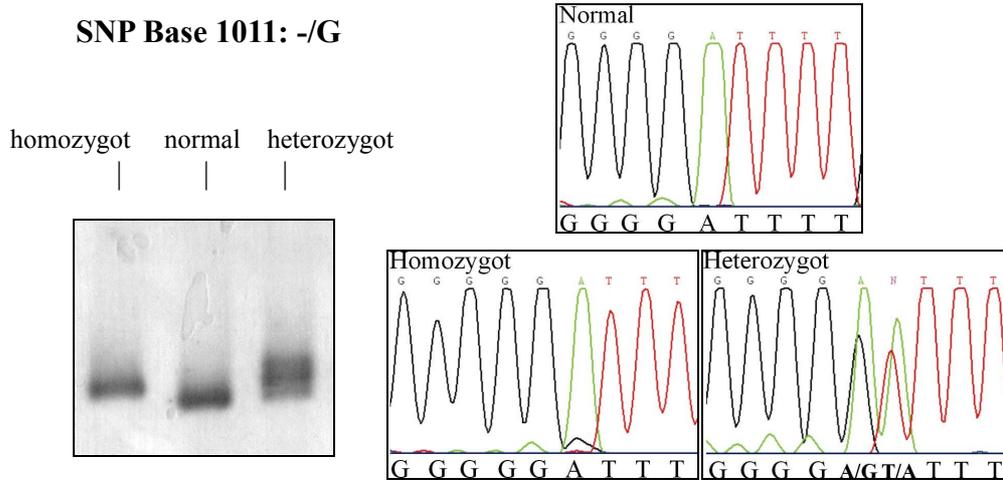
Bei den fünf gefundenen SNPs erfolgte die Bezeichnung und Lokalisation bezogen auf den Sequenzabschnitt NCBI35:7:116510633:116557894:-1 ([www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), Gene ID ENSG00000105989, siehe Anhang). Zwei von fünf SNPs waren zuvor nicht bekannt.

##### 3.1.1 Exon 1: Base 1011: -/G

Die SSCP-Analyse zeigte in diesem Abschnitt bei mehreren Patienten und Normalkontrollen (NKs) Veränderungen im Vergleich zur Normalkontrolle N4. Die Sequenzierung ergab eine Basen-Insertion im Intron zwischen Exon 1 und Exon 2 (Abbildung 8). 25 von 35 Patienten sowie 13 von 20 NKs wiesen hier keine Basen-Insertion auf (-/-). Bei 10 Patienten und fünf NKs fand sich eine heterozygote Veränderung (-/G), die homozygote Form (G/G) war bei keinem der Patienten und drei der Normalkontrollen zu finden (Tabelle 23).

**Tabelle 23:** Häufigkeitsverteilung des SNP in Exon 1

	normal (-/-)	heterozygot (-/G)	homozygot (G/G)	gesamt
<b>Patienten</b>	25 (71,4%)	10 (28,6%)	---	35
<b>Normalkontrollen</b>	13 (62,0%)	5 (23,8%)	3 (14,2%)	21
<b>gesamt</b>	38 (67,9%)	15 (26,8%)	3 (5,4%)	56

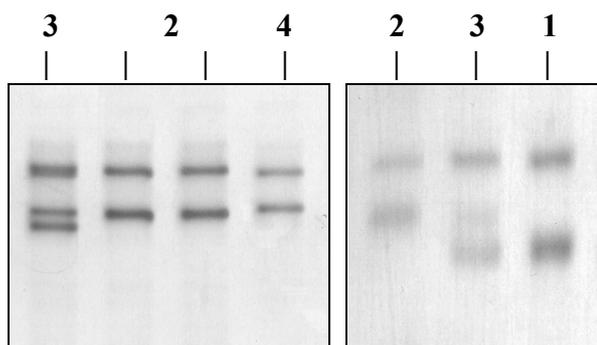


**Abb.8** Darstellung des SNPs Base 1011: -/G in homozygoter und heterozygoter Form, bezogen auf die Normalkontrolle N4. Im linken Teil der Abbildung ist das Ergebnis der SSCP-Analyse, im rechten das der Sequenzierung aufgeführt. Bei diesem SNP kommt es zu einer Basen-Insertion der Base G, wenn die Sequenz N4 als normal zugrunde liegt.

Kurvenpräsentation: ■ Nukleotid A, ■ Nukleotid C, ■ Nukleotid G, ■ Nukleotid T  
 A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Tyrosin

### 3.1.2 Exon 5 : Base 45859: G/A und Base 45884: C/T

Im Exon 5, Abschnitt B, fanden sich bei der SSCP-Analyse vier verschiedene Bandenmuster, die sich nach weiteren Untersuchungen je einer spezifischen DNA-Sequenz zuordnen ließen (Abbildung 9).



**Abb.9** Bandenmuster im Exon 5, Abschnitt B.

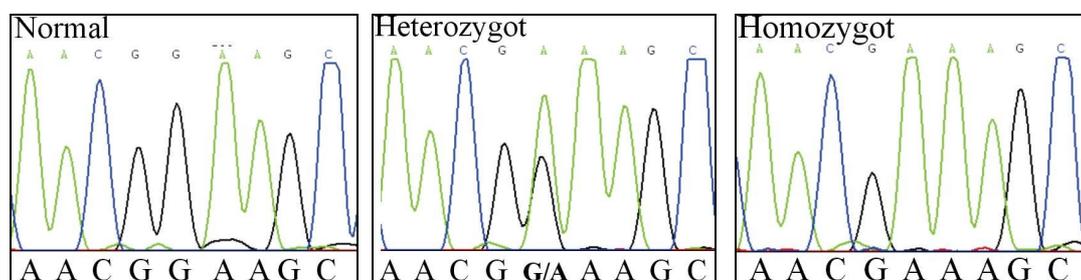
Die SSCP-Analyse ergab vier Varianten, die sich nach Sequenzierung den beiden gefundenen SNPs (Base 45859 und 45884) zuordnen ließen.

1= Normalkontrolle N4 (G/G//C/C), 2= homozygot (A/A//T/T), 3= heterozygot (G/A//C/T), 4= N4 heterozygot/homozygot (G/A//T/T)

Die Sequenzierung ergab zwei SNPs in der 3' untranslatierten Region (3'-UTR). Der G-zu-A-Austausch der Base 45859 lag 124 bp nach dem Stopcodon. Dieser trat bei drei Patienten und zwei NKs in homozygoter Form (A/A) auf, während fünf Patienten, sechs der NKs sowie N4 beide Allele besaßen (heterozygot, G/A). 27 Patienten und 12 Normalkontrollen zeigten eine normale Basenabfolge (G/G) (Tabelle 24, Abbildung 10).

**Tabelle 24:** Häufigkeitsverteilung des SNPs Base 45859: G/A, Exon 5

	normal (G/G)	heterozygot (G/A)	homozygot (A/A)	gesamt
<b>Patienten</b>	27 (77,1%)	5 (14,3%)	3 (8,6%)	35
<b>Normalkontrollen</b>	12 (57,1%)	7 (33,3%)	2 (9,5%)	21
<b>gesamt</b>	39 (69,6%)	12 (21,4%)	5 (8,9%)	56



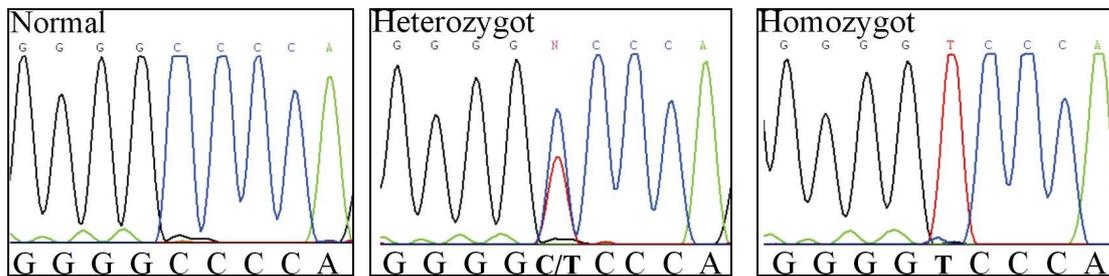
**Abb.10** Darstellung des Ergebnisses der Sequenzierung des SNPs Base 45859. Vergleich der Sequenz von N4 mit der Veränderung in homozygoter und heterozygoter Form.

Kurvenpräsentation: ■ Nukleotid A, ■ Nukleotid C, ■ Nukleotid G  
A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin

149 bp nach dem Stopcodon zeigte sich ein C-zu-T-Austausch der Base 45884. Hier ergab sich für die N4 eine homozygote Veränderung (T/T). Diese fand sich ebenfalls bei drei Patienten und zwei NKs. Bei fünf Patienten sowie sechs Normalkontrollen wies das Bandenmuster auf eine heterozygote Veränderung hin (C/T), was sich in der Sequenzierung bestätigte. Eine normale Basenabfolge (C/C) fand sich bei 27 Patienten und 12 NKs. Eine Übersicht der Häufigkeitsverteilung sowie das Ergebnis der Sequenzierung sind in Tabelle 25 und Abbildung 11 dargestellt.

**Tabelle 25:** Häufigkeitsverteilung des SNPs Base 45884: C/T, Exon 5

	normal (C/C)	heterozygot (C/T)	homozygot (T/T)	gesamt
<b>Patienten</b>	27 (77,1%)	5 (14,3%)	3 (8,6%)	35
<b>Normalkontrollen</b>	12 (57,1%)	6 (28,6%)	3 (14,3%)	21
<b>gesamt</b>	39 (69,6%)	11 (19,6%)	6 (10,7%)	56

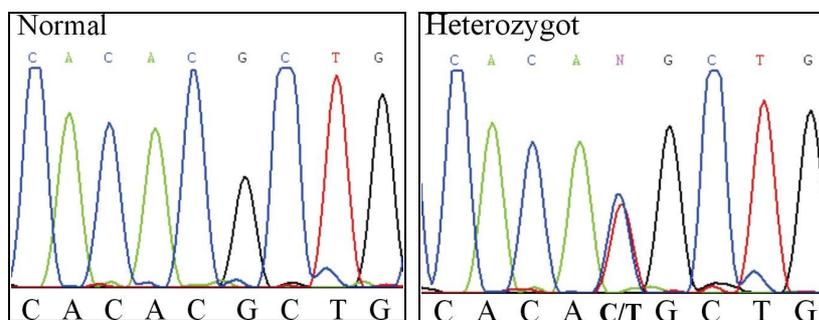


**Abb.11** Darstellung des C-zu-T-Austausches der Base 45884 in Exon 5. Das Ergebnis der Sequenzierung zeigt die Veränderung in heterozygoter und homozygoter Form.

Kurvenpräsentation: ■ Nukleotid A, ■ Nukleotid C, ■ Nukleotid G, ■ Nukleotid T  
 A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thyrosin

### 3.1.3 Exon 5: Base 45905 : C/T

Bei dem Patienten 763 zeigten sich Veränderungen der Banden im Exon 5, Base 45905 im Vergleich zu allen anderen Patienten und Kontrollen. Durch die Sequenzierung konnte ein C-zu-T-Austausch in heterozygoter Form 170 bp nach dem Stopcodon, also ebenfalls in der 3'UTR, identifiziert werden (Abbildung 12). Diese Veränderung trat nur bei diesem Patienten auf.



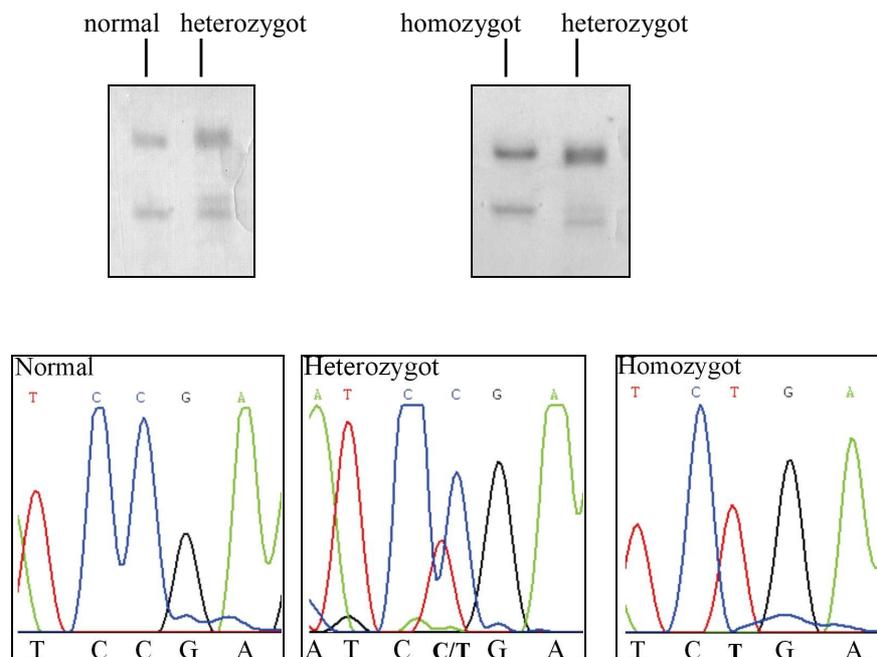
**Abb.12** Darstellung des SNPs Base 45905: C/T in heterozygoter Form bei dem Patienten 763 im Vergleich zur Normalkontrolle.

Kurvenpräsentation: ■ Nukleotid A, ■ Nukleotid C, ■ Nukleotid G, ■ Nukleotid T  
 A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thyrosin

### 3.1.4 Exon 5 : Base 46517: C/T

Die Analyse des Abschnittes E von Exon 5 zeigte Auffälligkeiten bei mehreren Proben, die auf einen weiteren SNP in der 3'-UTR hinwiesen (Abbildung 13). Dies konnte durch Sequenzierung der DNA bestätigt werden. Es handelte sich um einen C-zu-T-Austausch der Base 46517 im untranslatierten Abschnitt des Exons 5 783bp nach dem Stopcodon. Die

wenigsten Patienten und Normalkontrollen wiesen die als normal definierte Basenabfolge (C/C) auf (drei Patienten und eine NK). Bei 14 Patienten, fünf NK sowie N4 zeigte sich das Vorhandensein von beiden Allelen (heterozygot, C/T). Die homozygote Form (T/T) des Basenaustausches fand sich bei 18 Patienten und 14 Normalkontrollen (Abbildung 12, Tabelle 26).



**Abb.13** SSCP-Analyse und Sequenzierung im Exon 5, Abschnitt E.

Oben links ist das normale Bandenmuster im Vergleich zur heterozygoten Form aufgeführt, die Abbildung oben rechts zeigt die unterschiedlichen Gelshifts bei homozygoter und heterozygoter Veränderung auf. Die dazugehörigen Sequenzen sind darunter zu sehen.

Kurvenpräsentation: ■ Nukleotid A, ■ Nukleotid C, ■ Nukleotid G, ■ Nukleotid T  
A: Adenin, C: Cytosin, G: Guanin, T: Thymin

**Tabelle 26:** Häufigkeitsverteilung des SNPs Base 46517: C/T, Exon 5

	normal (C/C)	heterozygot (C/T)	homozygot (T/T)	gesamt
<b>Patienten</b>	3 (8,6%)	14 (40,0%)	18 (51,4%)	35
<b>Normalkontrollen</b>	1 (4,8%)	6 (28,5%)	14 (66,7%)	21
<b>gesamt</b>	4 (7,1%)	20 (35,7%)	32 (57,1%)	56

### 3.1.5 Darstellung der gefundenen Sequenzen

Die durchgeführten Sequenzierungen ermöglichten die Darstellung der gesamten Sequenz der translatierten Anteile, sowie der Übergänge zu den nicht translatierten Sequenzen im WNT2 Gen. Bis auf bei Exon 1, wo der translatierte Bereich nur einen kurzen Abschnitt

des Exons darstellt, wurden alle Intron-Exon-Übergänge sequenziert. Das Ergebnis der Sequenzierung stellte sich für die einzelnen Exons wie folgt dar (Abbildung 14-18):

<b>5'UTR Exon 1 ←</b>
.....CTGACCTGATGCAGACGCAAGGGGGTTAAT↓
→ <b>Exon 1</b>
<u>ATG AAC GCC CCT CTC GGT GGA ATC TGG CTC CCT CTG CTC TTG ACC</u>
Met Asn Ala Pro Leu Gly Gly Ile Trp Leu Pro Leu Leu Leu Thr
<u>TGG CTC ACC CCC GAG GTC AAC TCT TCA TGG TG</u>
Trp Leu Thr Pro Glu Val Asn Ser Ser Trp Trp
<b>Exon 1 ←</b>
→ <b>Intron 1</b>
↓GTAAGTCCACGCGCACGGGCGCGGGGG A/G TTTTGGAGA.....
↳ <i>SNP Base 1011: A/G</i>

Abb.14 Identifizierte Sequenzen in Exon 1

<b>Intron 1 ←</b>
.....TCACCTCTGTGTTGGTTGGTCCCTTATAGG↓
→ <b>Exon 2</b>
<u>TAC ATG AGA GCT ACA GGT GGC TCC TCC AGG GTG ATG TGC GAT AAT</u>
Tyr Met Arg Ala Thr Gly Gly Ser Ser Arg Val Met Cys Asp Asn
<u>GTG CCA GGC CTG GTG AGC AGC CAG CGG CAG CTG TGT CAC CGA</u>
Val Pro Gly Leu Val Ser Ser Gln Arg Gln Leu Cys His Arg
<u>CAT CCA GAT GTG ATG CGT GCC ATT AGC CAG GGC GTG GCC GAG</u>
His Pro Asp Val Met Arg Ala Ile Ser Gln Gly Val Ala Glu
<u>TGG ACA GCA GAA TGC CAG CAC CAG TTC CGC CAG CAC CGC TGG</u>
Trp Thr Ala Glu Cys Gln His Gln Phe Arg Gln His Arg Trp
<u>AAT TGC AAC ACC CTG GAC AGG GAT CAC AGC CTT TTT GGC AGG GTC</u>
Asn Cys Asn Thr Leu Asp Arg Asp His Ser Leu Phe Gly Arg Val
<u>CTA CTC CGA A</u>
Leu Leu Arg Ser
<b>Exon 2 ←</b>
→ <b>Intron 2</b>
↓GTAAGTCTCCTGCCTTCACCCAGCCCTATG.....

Abb.15 Identifizierte Sequenzen in Exon 2

<b>Intron 2 ←</b>
.....CCACTTTTAAGAAAAGCATTTTTGTTCAG↓
<b>→ Exon 3</b>
<u>GT</u> <u>AGT</u> <u>CGG</u> <u>GAA</u> <u>TCT</u> <u>GCC</u> <u>TTT</u> <u>GTT</u> <u>TAT</u> <u>GCC</u> <u>ATC</u> <u>TCC</u> <u>TCA</u> <u>GCT</u> <u>GGA</u>
Ser Arg Glu Ser Ala Phe Val Tyr Ala Ile Ser Ser Ala Gly
<u>GTT</u> <u>GTA</u> <u>TTT</u> <u>GCC</u> <u>ATC</u> <u>ACC</u> <u>AGG</u> <u>GCC</u> <u>TGT</u> <u>AGC</u> <u>CAA</u> <u>GGA</u> <u>GAA</u> <u>GTA</u>
Val Val Phe Ala Ile Thr Arg Ala Cys Ser Gln Gly Glu Val
<u>AAA</u> <u>TCC</u> <u>TGT</u> <u>TCC</u> <u>TGT</u> <u>GAT</u> <u>CCA</u> <u>AAG</u> <u>AAG</u> <u>ATG</u> <u>GGA</u> <u>AGC</u> <u>GCC</u> <u>AAG</u>
Lys Ser Cys Ser Cys Asp Pro Lys Lys Met Gly Ser Ala Lys
<u>GAC</u> <u>AGC</u> <u>AAA</u> <u>GGC</u> <u>ATT</u> <u>TTT</u> <u>GAT</u> <u>TGG</u> <u>GGT</u> <u>GGC</u> <u>TGC</u> <u>AGT</u> <u>GAT</u> <u>AAC</u> <u>ATT</u>
Asp Ser Lys Gly Ile Phe Asp Trp Gly Gly Cys Ser Asp Asn Ile
<u>GAC</u> <u>TAT</u> <u>GGG</u> <u>ATC</u> <u>AAA</u> <u>TTT</u> <u>GCC</u> <u>CGC</u> <u>GCA</u> <u>TTT</u> <u>GTG</u> <u>GAT</u> <u>GCA</u> <u>AAG</u>
Asp Tyr Gly Ile Lys Phe Ala Arg Ala Phe Val Asp Ala Lys
<u>GAA</u> <u>AGG</u> <u>AAA</u> <u>GGA</u> <u>AAG</u> <u>GAT</u> <u>GCC</u> <u>AGA</u> <u>GCC</u> <u>CTG</u> <u>ATG</u> <u>AAT</u> <u>CTT</u> <u>CAC</u>
Glu Arg Lys Gly Lys Asp Ala Arg Ala Leu Met Asn Leu His
<u>AAC</u> <u>AAC</u> <u>AGA</u> <u>GCT</u> <u>GGC</u> <u>AGG</u> <u>AAG</u>
Asn Asn Arg Ala Gly Arg Lys
<b>Exon 3 ←</b>
<b>→ Intron 3</b>
↓GTATGGAAATGCAACGGTGCTCATTTTGTA.....

Abb.16 Identifizierte Sequenzen in Exon 3

<b>Intron 3 ←</b>
.....CACTGAACTTGCCCCTGTCTTTTTCGGCAG↓
<b>→ Exon 4</b>
<u>GCT</u> <u>GTA</u> <u>AAG</u> <u>CGG</u> <u>TTC</u> <u>TTG</u> <u>AAA</u> <u>CAA</u> <u>GAG</u> <u>TGC</u> <u>AAG</u> <u>TGC</u> <u>CAC</u> <u>GGG</u> <u>GTG</u>
Ala Val Lys Arg Phe Leu Lys Gln Glu Cys Lys Cys His Gly Val
<u>AGC</u> <u>GGC</u> <u>TCA</u> <u>TGT</u> <u>ACT</u> <u>CTC</u> <u>AGG</u> <u>ACA</u> <u>TGC</u> <u>TGG</u> <u>CTG</u> <u>GCC</u> <u>ATG</u> <u>GCC</u> <u>GAC</u>
Ser Gly Ser Cys Thr Leu Arg Thr Cys Trp Leu Ala Met Ala Asp
<u>TTC</u> <u>AGG</u> <u>AAA</u> <u>ACG</u> <u>GGC</u> <u>GAT</u> <u>TAT</u> <u>CTC</u> <u>TGG</u> <u>AGG</u> <u>AAG</u> <u>TAC</u> <u>AAT</u> <u>GGG</u> <u>GCC</u>
Phe Arg Lys Thr Gly Asp Tyr Leu Trp Arg Lys Tyr Asn Gly Ala
<u>ATC</u> <u>CAG</u> <u>GTG</u> <u>GTC</u> <u>ATG</u> <u>AAC</u> <u>CAG</u> <u>GAT</u> <u>GGC</u> <u>ACA</u> <u>GGT</u> <u>TTC</u> <u>ACT</u> <u>GTG</u> <u>GCT</u>
Ile Gln Val Val Met Asn Gln Asp Gly Thr Gly Phe Thr Val Ala
<u>AAC</u> <u>GAG</u> <u>AGG</u> <u>TTT</u> <u>AAG</u> <u>AAG</u> <u>CCA</u> <u>ACG</u> <u>AAA</u> <u>AAT</u> <u>GAC</u> <u>CTC</u> <u>GTG</u> <u>TAT</u> <u>TTT</u>
Asn Glu Arg Phe Lys Lys Pro Thr Lys Asn Asp Leu Val Tyr Phe
<u>GAG</u> <u>AAT</u> <u>TCT</u> <u>CCA</u> <u>GAC</u> <u>TAC</u> <u>TGT</u> <u>ATC</u> <u>AGG</u> <u>GAC</u> <u>CGA</u> <u>GAG</u> <u>GCA</u> <u>G</u>
Glu Asn Ser Pro Asp Tyr Cys Ile Arg Asp Arg Glu Ala Gly
<b>Exon 4 ←</b>
<b>→ Intron 3</b>
↓GTAAGTTCAAAAGACTTTCTTTATAGTACC.....

Abb.17 Identifizierte Sequenzen in Exon 4



## 4 DISKUSSION

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war die molekulargenetische Untersuchung des im Genitalhöcker hoch exprimierten WNT2 Gens bei Patienten mit ungeklärter Intersexualität mit 46, XY Karyotyp. Nach Ausschluss eines Androgenrezeptordefektes bei überwiegend normalen bis hochnormalen Testosteronspiegeln und vielfach vorhandenen extragenitalen Fehlbildungen könnten WNT2 Mutationen eine Ursache primärer Entwicklungsstörungen der Genitalanlage darstellen.

Dabei konnten bei dem ausgewählten Patientenkollektiv keine Defekte im kodierenden Bereich der Gensequenz gefunden werden. Es wurden fünf SNPs identifiziert, davon zwei bisher unbekannte. Ein bisher nicht beschriebener SNP trat nur bei einem einzigen Patienten auf und konnte auch in den Normalkontrollen nicht detektiert werden.

### 4.1 Methoden

Die Darstellung der Gensequenz des WNT2 Gens erfolgte mittels SSCP-Analyse und anschließender Sequenzierung. Aufgrund ihrer einfachen und schnellen Anwendung und der hohen Effizienz in der Detektion von Veränderungen der Basenfolge ist die SSCP-Analyse seit den achtziger Jahren ein weltweit etabliertes Verfahren (Kanazawa et al. 1986, Orita et al. 1989A und 1989B). Sie ermöglicht die Untersuchung mehrerer Proben (20-30 Proben je Durchlauf) und eignet sich daher als Screeningmethode von Mutationen. Der Vergleich mit nur einer Normalkontrolle ist ausreichend, um eine Abweichung in der Basensequenz zu erkennen. Ist für eine bestimmte Mutation eine Positivkontrolle vorhanden, so kann bereits bei der Auswertung des SSCP-Gels erkannt werden, ob diese Mutation in homozygoter oder heterozygoter Form vorliegt oder ob es sich um einen neuen Defekt handelt. Ein weiterer Vorteil der SSCP-Analyse ist, dass das DNA-Material minimal-invasiv aus Leukozyten aus EDTA-Blut gewonnen werden kann (Hiort et al. 1994).

Durch Fan et al. 1993 wurden die Bedingungen für die Durchführung analysiert und optimiert. So konnte herausgefunden werden, dass die Ergebnisse stark von der Konstanz mehrerer äußerer Faktoren abhängen. Einen entscheidenden Wert stellt die Leistung in der Elektrophorese dar. Zu hohe Wattzahlen (>60W) führen zu einem Verschmieren der Banden. Dabei stellen sich die Doppelstrangbanden verstärkt und die Einzelstrangbanden abgeschwächt dar. Die Bandenmuster werden ungenau und die Auswertung erschwert. Glavač und Dean 1993 postulierten zu diesem Thema, dass bereits Wattzahlen von >20W über mehrere Stunden zu verfälschter Auswertung führen können. In der vorliegenden

Arbeit wurden Werte von 50W nie überschritten, Wattzahlen von 12-50W nur für kurze Zeit (<30min) verwendet. Dies führte zu unbeeinträchtigten Ergebnissen.

Die Laufweite im Elektrophoresegel sollte nicht weniger als 16-18cm betragen, da sonst die Effizienz der Detektion reduziert sein kann (Fan et al. 1993). Dies wurde bei den Versuchen der vorliegenden Untersuchung berücksichtigt. Die Laufweite betrug bei allen Durchläufen 20-25cm, sodass eine optimale Auftrennung der DNA-Produkte erreicht werden konnte.

In vielen bisher veröffentlichten Studien wurde kontrovers diskutiert, ob die Umgebungstemperatur einen Einfluss auf die SSCP-Analyse nimmt. Bei Orita et al. 1989B wurden die besten Auswertungen bei Raumtemperatur erzielt. Nach Fan et al. 1993 hingegen spielt die Temperatur keine Rolle für die Ergebnisqualität, was in einer weiteren Studie bestätigt wurde (Hayashi und Yandell 1993). In der vorliegenden Untersuchung erfolgte die Elektrophorese bei Raumtemperatur (19-21°C), wobei sich bei niedrigen Temperaturen die Laufgeschwindigkeit leicht verminderte. Dies wurde bei den Laufzeiten entsprechend berücksichtigt.

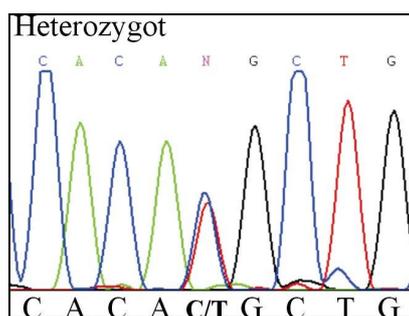
Für ein unbeeinträchtigtes Ergebnis sollte die Fragmentlänge 350bp nicht überschreiten (Fan et al. 1993). Die Längen von <320bp der in dieser Arbeit untersuchten Abschnitte entsprechen diesem optimalen Bereich. Eine DNA-Sequenz kann verschiedene stabile Konformationen annehmen. Besonders bei niedrigen Energieunterschieden kann es zu einem Wechsel dieser Konstellation kommen (Hayashi 1991). Solche Konformationsänderungen stellen sich durch unterschiedliche Bandenmuster eines DNA-Fragments im SSCP-Gel dar (Fan et al. 1993). In der vorliegenden Arbeit konnten derartige Phänomene nicht beobachtet werden, obwohl für einzelne Fragmente mehrere Elektrophoresen durchgeführt wurden.

Die Sensitivität der SSCP-Analyse bei konstanten Bedingungen wird in der Literatur mit 90-96% angegeben (Hayashi 1991, Fan et al. 1993, Hayashi und Yandell 1993). Aufgrund der niedrigen Fallzahl der in dieser Arbeit untersuchten Proben kann darüber keine statistisch signifikante Aussage gemacht werden.

Waren die Laufmuster in der SSCP-Analyse auffällig, d.h. abweichend von der als normal definierten Kontrolle N4, erfolgte anschließend eine Sequenzierung des entsprechenden Genabschnitts. Die Sequenzierung dient der Lokalisierung und Identifizierung von DNA-Sequenzveränderungen. Die verwendete Methode bezog sich auf die weit verbreitete Didesoxysequenzierung nach Sanger et al. 1977. Seit etwa 15 Jahren findet auch die maschinelle und digitale Form dieser Methode Anwendung, was das Vorgehen erheblich

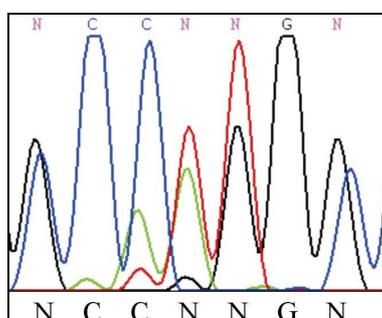
erleichtert. Die Genauigkeit dieses Verfahren wird mit >99% angegeben (McBride et al. 1989, Ketherpal et al. 1996). In dieser Arbeit erfolgte die Analyse der Basenabfolge mit Hilfe von farblich markierten ddNTPs. Diese spezielle Form der Sequenzierung, das „Four Color Sequencing“, hat mittlerweile einen hohen Stellenwert in der Detektion von Basenveränderungen erlangt (Rao et al. 2001). Auch bei der vorliegenden Arbeit konnten sehr positive Erfahrungen mit dieser Methode gemacht werden. Die Sequenzierung erfolgte bei allen Fragmenten ohne Schwierigkeiten.

In der Auswertung wurden nur störungsfreie Kurvenbilder mit eindeutiger Zuordnung eines Nukleotids zu der Sequenz berücksichtigt. Falsch positive Ergebnisse wurden nicht beobachtet. Im Falle einer heterozygoten Veränderung mit Substitution einer Base in einem Allel kommt es per definitionem zu einer Unsicherheit der Zuordnung der Nukleotide des veränderten und des „normalen“ Allels (Abbildung 19). Dabei sind die Ausschläge der beiden Kurven deutlich geringer als die einer nicht veränderten Base. Dies konnte anhand des charakteristischen Kurvenbildes erkannt werden.



**Abb.19** Beispiel einer heterozygoten Gensequenzvariation. Der Ausschlag der Kurven der beiden Nukleotide ist niedriger als bei der normalen Zuordnung. Kurvenpräsentation: ■ Nukleotid A, ■ Nukleotid C, ■ Nukleotid G, ■ Nukleotid T, N keine Zuordnung möglich

In einigen Fällen trat das Phänomen des „Hintergrundrauschens“ auf. Dies ist in einer Verunreinigung des DNA-Produkts begründet und führt zu einer Unsicherheit in der Basenzuordnung (Abbildung 20). In solchen Fällen wurden die Sequenzen bei der Auswertung nicht berücksichtigt.



**Abb.20** Beispiel eines möglicherweise ungenau sequenzierten DNA-Abschnitts. Die tatsächliche Sequenz wird durch starkes „Hintergrundrauschen“ überlagert, welches durch basal hochgezogene Kurven entsteht. Die genaue Basenzuordnung ist erschwert. Der Buchstabe N beschreibt die Unsicherheit zwischen mehreren Nukleotiden. Kurvenpräsentation: ■ Nukleotid A, ■ Nukleotid C, ■ Nukleotid G, ■ Nukleotid T, N keine Zuordnung möglich

Obwohl vom Hersteller ausgetestete Bedingungen für die Kits mitgeliefert wurden, ergab sich bei den Versuchen die Notwendigkeit, PCR-Produktmengen und Anlagerungstemperaturen individuell anzupassen.

Die Sequenzierung dient der diagnostischen Ergänzung der SSCP-Analyse bei auffälligen oder unklaren Befunden. Im Vergleich zur SSCP-Analyse ist sie auch bei maschineller Durchführung und digitaler Auswertung sehr aufwendig. Dazu kommen die hohen Kosten für die erforderlichen Materialien.

Die PCR-SSCP-Analyse mit nachfolgender Sequenzierung stellt ein geeignetes Verfahren zur molekulargenetischen Untersuchung des WNT2 Gens dar. In der vorliegenden Arbeit wurden nur positive Erfahrungen mit dieser Methode gemacht.

#### **4.2 Polymorphismen im WNT2 Gen**

Nachdem die Identifizierung des menschlichen Genoms weitgehend abgeschlossen ist, ist gegenwärtig die Untersuchung der Variabilität der Gensequenz Bestandteil der Forschung. Bei diesen Sequenzveränderungen handelt es sich bei 80% um die Substitution einer Base, auch als SNP (single-nucleotide polymorphism) bekannt (Zusammenfassung bei Landegren et al. 1998). Es wird geschätzt, dass SNPs etwa 90% der genetischen Diversität ausmachen und somit für die individuellen phänotypischen Variationen verantwortlich sind. SNPs sind per definitionem Punktmutationen, die nicht mit Erkrankungen assoziiert sind (Haff und Smirnov 1997). Allerdings scheinen einige von ihnen direkten Einfluss auf Proteinstrukturen und -wirkungen zu haben und eine Rolle bei der Entstehung von Krankheiten zu spielen. So könnte das Vorhandensein eines Allels den Träger für eine Erkrankung prädisponieren oder bei der Diagnosestellung als Marker dienen (Landegren et al. 1998). Die große Anzahl der Varianten macht es allerdings schwer, diejenigen Veränderungen herauszufinden, die tatsächlich bei der Krankheitsentstehung eine Rolle spielen (Freudenberg et al. 2002).

Als SNP bezeichnet man eine Position im Genom, an der alternativ zwei oder mehr Basen mit einer Häufigkeit von mehr als einem Prozent in der Population auftauchen. Nach der Definition von Graur und Li 1999 wird ein Locus in der Sequenz als polymorph bezeichnet, wenn mindestens zwei Varianten vorkommen und davon das häufigere Allel in <99% der Fälle vorhanden ist (Graur und Li 1999). Dies unterscheidet die Polymorphismen, wie auch die Tatsache, dass sie stabil sind und sich über mehrere Generationen kaum verändern, von Punktmutationen.

Durchschnittlich tritt alle 500-1000 Basenpaare ein Polymorphismus auf (Botstein et al.

1980, Cooper et al. 1985), weshalb man bei 3 Milliarden Basenpaaren des menschlichen Genoms etwa 3-6 Millionen SNPs vermutet. Dabei ist die Verteilung keinesfalls gleichmäßig. So findet sich im humanen  $\beta$ -Globulin Gen alle 100bp ein Polymorphismus, während in anderen Genen fast keine zu finden sind (Jeffreys 1979).

In der Literatur wurden zahlreiche Möglichkeiten der SNP-Analyse beschrieben und diskutiert (Zusammenfassung bei Jeffreys et al. 1990 und Landegren et al. 1998). Die PCR-SSCP-Analyse von frei gewählten Fragmenten mit 200-300bp wurde ebenfalls als ein geeignetes Verfahren zur Detektion von SNPs, speziell in den untranslatierten Bereichen, gewertet (Orita et al. 1989A und B). Mit diesem Verfahren und anschließender Sequenzierung wurden auch die fünf SNPs in den nichtkodierenden Abschnitten des WNT2 Gens in der vorliegenden Arbeit identifiziert. Dabei lag ein SNP (Base 1011: -/G) im Intron zwischen Exon 1 und Exon 2, die weiteren vier (Base 45859: G/A, Base 45884: C/T, Base 45905: C/T, Base 46517: C/T) in der 3'UTR des Exons 5. Um auszuschließen, dass es sich um funktionell relevante Mutationen handeln könnte, wurden die jeweiligen Abschnitte zusätzlich bei 20 Normalkontrollen untersucht. Bis auf den SNP der Base 45905: C/T, der nur bei Patient 763 gefunden werden konnte, traten alle in fast der gleichen Frequenz auch bei den klinisch gesunden NKs auf (Tabellen 23-26, Kapitel Ergebnisse). Es kann daher davon ausgegangen werden, dass diese Polymorphismen keine phänotypischen Auswirkungen auf die in dieser Arbeit untersuchten Merkmale haben.

Auffällig war bei den SNPs der Basen 45859 (G-zu-A-Austausch) und 45884 (C-zu-T-Austausch), dass das G-Allel des ersten Polymorphismus fast immer gemeinsam mit dem C-Allel (Normal-Variante) des zweiten Polymorphismus auftrat. Gleiches galt für die homozygoten und heterozygoten Träger der Varianten der beiden SNPs. Lediglich bei der Normalkontrolle N4 waren im ersten SNP beide Allele vorhanden (heterozygot) und im zweiten das Allel T (homozygot). Dieses Phänomen ließe sich durch ein Kopplungsungleichgewicht erklären. Es besagt, dass die einzelnen Allele von Genen abhängig voneinander auftreten können, wenn die betreffenden Abschnitte in enger räumlicher Nähe auf dem Chromosom beieinander liegen. Das Kopplungsungleichgewicht erstreckt sich über Regionen von etwa 20000-40000bp (Freudenberg et al. 2002). Mit einem Abstand von nur 25 Basen wäre dies bei diesen beiden Polymorphismen der Fall. Für die Diagnostik bedeutet diese Tatsache, dass man bei Vorliegen der ersten Variante mit großer Wahrscheinlichkeit auf das Vorhandensein der zweiten Variante schließen kann.

Bei dem nur bei Patient 763 gefundenen C-zu-T-Austausch der Base 45905 muss diskutiert werden, ob es sich hier tatsächlich nur um einen funktionell irrelevanten SNP handelt. Es

ist grundsätzlich möglich, dass die beobachteten Basenveränderung, trotz ihrer Lage in der untranslatierten Region, zu einer Beeinflussung des mRNA-Transkriptes führt. Bei einer Nukleotid-Variation im Exon 8 (AGC → AGT) des Androgenrezeptor-Gens, die nicht zu einem Aminosäureaustausch führte, kam es durch alternatives Splicing zu einer erheblichen Verkürzung der 3'-UTR. Dies hatte eine deutliche Reduzierung der Gendosis und einen intersexuellen Phänotyp zur Folge (Hellwinkel et al. 2001).

Auch bei Patient 763 könnte der SNP die RNA-Stabilität stören, was möglicherweise abnorme Splice-Varianten zur Folge haben könnte. Überprüft werden könnte dies mit Northern Blots oder mit Pulse Chase Experimenten, wofür Zellkulturen oder mRNA aus Leukozyten benötigt würden. Diese Untersuchungen überstiegen allerdings die Zielsetzung der hier vorliegenden Arbeit und könnten in weitere Studien mit einbezogen werden.

Nach Beginn der Experimente wurde bei Patient 763 die Diagnose eines hypergonadotropen Hypogonadismus gestellt, d.h. es besteht bei diesem Patienten eine Fehlfunktion der Gonaden. Eine normale Balance der Gendosis spielt für die Gonadenentwicklung eine wichtige Rolle. Über das WNT4 Gen ist bereits bekannt, dass es wichtig für die Entwicklung der menschlichen Gonaden ist (Biason-Lauber et al. 2004). Mutationen des WNT5A Gens führten in Mausexperimenten zu genitaler Agenesie (Suzuki et al. 2003). Daher ist es möglich, dass auch eine Veränderung der Basenfolge des WNT2 Gens eine Ursache für Störungen in der Entwicklung der Genitalanlagen sein könnte. Diese Annahmen sind rein hypothetisch und müssten in weiteren Untersuchungen geprüft werden. Es wäre eine Überlegung wert, in einer folgenden Studie ein größeres Kollektiv von Patienten mit ungeklärten Fehlfunktionen der Gonaden auf den C-zu-T-Austausch der Base 45905 zu screenen. Dies könnte neue Erkenntnisse über die Rolle des SNPs liefern.

Der SNP der Base 46517: C/T wurde bereits vor Beginn dieser Arbeit von Wassink et al. 2001 identifiziert und veröffentlicht. Der G-zu-A-Austausch der Base 45859 sowie der C-zu-T-Austausch der Base 45884 konnte von Li et al. 2004 gefunden und beschrieben werden (dort bezeichnet als: G124A und C149T, Li et al. 2004).

Die beiden SNPs der Basen 1011: A/G und 45905: C/T wurden in der vorliegenden Arbeit erstmals beschrieben und in der NCBI SNP-Datenbank (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP)) eingetragen.

### 4.3 WNT2 und Intersexualität

Die WNT Gene spielen eine gesicherte Rolle während zahlreicher Vorgänge in der embryonalen Entwicklung (Nusse und Varmus 1992). Sie sind an verschiedensten Mechanismen, wie der Ausreifung des Nervensystems (WNT1, WNT8B), des Skeletts und der Extremitäten (WNT3 und WNT5A) oder des Urogenitaltrakts (WNT4, WNT5A, WNT7A und 7B) beteiligt.

Über die genaue Funktion des WNT2 Gens während der Embryogenese ist noch sehr wenig bekannt. Wassink et al. 2001 brachte WNT2 mit Autismus in Verbindung. Bei der molekulargenetischen Untersuchung mehrerer autistischer Probanden wurden zwei Mutationen gefunden (Leu5Arg und Arg299Trp). Die Patienten wiesen keine weiteren Erkrankungen oder Fehlbildungen auf. Die Assoziation von Autismus mit WNT2-Mutationen konnte in zwei darauffolgenden Arbeiten nicht bestätigt werden (McCoy et al. 2002, Li et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit gaben Ergebnisse vorheriger Studien Anlass zu der Hypothese, das WNT2 Gen könne bei der hormonunabhängigen embryonalen Entwicklung der Urogenitalanlage eine Rolle spielen. So zeigte eine Untersuchung, dass WNT2 bei der Drosophila-Fliege für die Morphogenese der männlichen Geschlechtsorgane benötigt wird. Mutationen des WNT2 Gens führten hier bei männlichen Fliegen zu Fehlbildungen des Skrotums und zu Sterilität. Die Hoden waren von abnormer Morphologie und die Größe vermindert (Kozopas et al. 1998). Daraus könnte die Hypothese gestellt werden, dass das WNT2 Gen auch für die menschliche Geschlechtsentwicklung von Bedeutung ist. Allerdings ist die Geschlechtsentwicklung bei der Fliege noch vielfach ungeklärt, weshalb die Vorgänge mit denen beim Menschen schwer zu vergleichen sind.

Die Tatsache, dass WNT2 in kultivierten Vorhautfibroblasten normal männlicher Individuen eine hohe Expression aufweist, während es bei Patienten mit einem 46, XY Karyotyp und weiblichem Phänotyp eine niedrige bis keine Aktivität zeigt (Holterhus et al. 2003), ließ vermuten, dass WNT2 auch in der menschlichen Geschlechtsentwicklung eine Rolle spielt. Möglicherweise ist die normale Expression von WNT2 notwendig für die normale männliche Geschlechtsentwicklung. Mutationen von WNT2 könnten die Genitalentwicklung direkt beeinflussen.

Die genauen molekulargenetischen Mechanismen der Entwicklung des äußeren Genitals aus der Anlage, dem Genitalhöcker (GH), sind bis heute nicht vollständig erfasst (Haraguchi et al. 2000, Haraguchi et al. 2001). Auch wenn den Androgenen in der Genitalentwicklung eine hohe Bedeutung zukommt, beginnt die Differenzierung des GHs

weit vor Beginn der Androgenproduktion (Perriton et al. 2002). So beginnt die Morphogenese des menschlichen Genitals etwa zwei Wochen vor erstmaliger Testosteronausschüttung (Kalloo et al. 1993). Jüngste Studien haben gezeigt, dass essentielle Regulatorgene einen Einfluss sowohl auf die Entwicklung der Gliedmaßen als auch auf die Ausbildung des Genitalhöckers haben (Yamada et al. 2006) und bereits sehr früh in die Differenzierung und das Wachstum des Genitalhöckers eingreifen. Wie auch Shh (Sonic hedgehog), reguliert auch Fgf 8, aus der Familie der Fibroblast growth factors, weitere im GH exprimierte Gene, Fgf 10, Bmp 4 und HOXD13 (Haraguchi et al. 2001). Eine Mutation von Shh führte bei Mäusen zu einer kompletten Agenesie des GHs und damit fehlendem Genital (Haraguchi et al. 2001, Perriton et al. 2002). Ein weiteres Entwicklungsgen, das Bmp 4 (bone morphogenetic protein), führte über die Drosselung von Fgf 8 und WNT5A zu erhöhtem Zelltod und verminderter Zellproliferation bei der Genitalentwicklung. Für die Expression von Fgf 8, und auch Bmp 7, essentiell zeigte sich das HOXA13 (homeobox A13 Gen). Durch Fehlen dieses Gens kam es in einer Studie von Morgan et al. 2003 bei Mäusen zu einem klinischen Bild mit Hypospadie und HFGS (Hand-Foot-Genital-Syndrom).

Die verwendeten Patienten-Daten stammten aus einer bereits vorhandenen Datenbank, der CISS Lübeck. Neben einem 46, XY Chromosomensatz und einer äußeren Virilisierungsstörung erfüllten alle Patienten weitere Kriterien. Durch meist normale Hormonwerte, insbesondere des Testosterons konnte das Vorliegen einer hormonellen Ursache für die Genitalfehlbildung vielfach ausgeschlossen werden. Im Einzelfall ist die Bewertung der Hormonwerte aufgrund zuvor diskutierter Schwierigkeiten bezüglich Bestimmungsmethode und Normalwerte nur sehr eingeschränkt möglich. Außerdem war bei keinem der Patienten trotz ausführlicher Diagnostik eine alternative Störung bekannt, die für die genitale Entwicklungsstörung verantwortlich gemacht wurde. Ein wichtiges Einschlusskriterium ( aber nicht *conditio sine qua non*) stellten extragenitale Fehlbildungen dar. Die WNT Gene werden mit zahlreichen Entwicklungsstörungen jeglicher Form in Verbindung gebracht. Auch bei einem Defekt des WNT2 Gens könnte daher neben einer Entwicklungsstörung des äußeren Genitals mit weiteren Fehlbildungen zu rechnen sein. Es ist anzunehmen, dass WNT2 bereits zu einem frühen Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung in zahlreiche Vorgänge eingebunden ist. So würde ein Gendefekt nicht nur zu einer isolierten Fehlentwicklung des äußeren Genitals führen, sondern könnte auch weitere assoziierte Fehlbildungen zur Folge haben. Interessant zu diesem Aspekt ist die Umfrage

der ESPED (ESPED-Umfrage: „Intersexualität und schwere Genitalfehlbildungen“, 2000-2002). Demnach weisen 44% der Intersexualitätspatienten assoziierte Fehlbildungen auf. Dieses Ausmaß assoziierter Fehlbildungen war zuvor völlig unbekannt und spricht dafür, dass ein erheblicher Teil der Ursachen für genitale Entwicklungsstörungen im Bereich von Entwicklungsendefekten zu suchen sind. Das WNT2 Gen macht hier nur eines von vielen möglichen Kandidatengenen aus (Holterhus et al. 2003).

Bei der molekulargenetischen Analyse der ausgewählten Patienten fanden sich keine eindeutig funktionell relevanten Mutationen. In den translatierten Regionen des WNT2 Gens waren keine Veränderungen der Basenabfolge zu identifizieren. Die vorliegenden Daten an dem vorliegenden Patientenkollektiv sprechen also nicht dafür, dass zwischen dem humanen WNT2 und einer Virilisierungsstörung von genotypisch männlichen Individuen ein Zusammenhang besteht. Da nur Abschnitte sequenziert wurden, die in der SSCP-Analyse auffällige Bandenmuster zeigten, ist nicht auszuschließen, dass eventuell vorhandene Mutationen nicht identifiziert werden konnten. Um die Möglichkeit auszuschließen, dass aufgrund der geringen Probandenzahl Mutationen nicht erfasst wurden, könnte in weiteren Studien das WNT2 Gen bei einem deutlich größeren Kollektiv untersucht werden.

#### **4.4 Ausblick**

Der Anteil der Patienten mit Intersexualität ohne eine bekannte genetische Ursache stellt noch immer die größte Gruppe der Patienten dar. Noch lange sind nicht alle Ursachen für die Fehlentwicklung der Genitalanlagen während der Embryogenese bekannt. Das Erforschen der genetischen Grundlagen von Störungen der Geschlechtsentwicklung kann die Erkenntnisse für die Erklärung dieser Erkrankungen erweitern und ermöglicht in Zukunft eine verbesserte Diagnostik. Genauere Kenntnisse über die Ursachen der Intersexualität sind die Grundlage für die Beratung und Behandlung betroffener Individuen. Für die Patienten sowie deren Angehörige ist eine exakte Diagnose häufig von großer Bedeutung und spielt eine entscheidende Rolle im Umgang mit dem Krankheitsbild. Die molekulargenetische Untersuchung des WNT2 Gens bei dem hier ausgewählten Patientenkollektiv ergab bei der vorliegenden Arbeit keinen sicheren Hinweis auf relevante Veränderungen der Genstruktur. Da die untersuchten Abschnitte nicht bei allen Patienten sequenziert wurden, ist es möglich, dass einige Patienten unbekannte Veränderungen aufweisen, die durch die SSCP-Analyse nicht erfasst wurden.

Das WNT2 Gen stellt nur eines von vielen möglichen Kandidatengenen dar, die bereits zu

einem frühen Zeitpunkt der embryonalen Entwicklung in zahlreiche Prozesse der Organbildung eingreifen könnten und damit auch die Genitalentwicklung in einem frühen Stadium beeinflussen würden. Daher sollten in Zukunft in zunehmendem Maße diese Tatsache berücksichtigt und Entwicklungsgene untersucht und die Differenzierung von Entwicklungsgendefekten in die Ursachenforschung der Intersexualität mit einbezogen werden. Die Unterscheidung von genitalen Fehlbildungen aufgrund von hormonellen Störungen, z.B. durch Defekte der Hormonbildung oder Defekte von Hormonrezeptoren, oder aufgrund von Anlagestörungen, z.B. durch Entwicklungsgendefekte, spielt potentiell eine entscheidende Rolle bei der klinischen Betreuung der Betroffenen. So ist davon auszugehen, dass bei Entwicklungsgendefekten, die nicht die Hormonbildung oder Hormonwirkung einbeziehen, die extragenitale Hormonwirkung, z.B. auf das Gehirn, erhalten sind. Diese Tatsache ist z.B. für die Geschlechtszuweisung relevant und wurde u.a. bei der Blasenexstrophie diskutiert (Reiner und Gearhart 2004). Die Entscheidung der Geschlechtszuweisung hängt von vielen Faktoren ab, kann jedoch durch genauere Kenntnisse der Ursache noch präziser und mit langfristigem Vorteil für den Patienten getroffen werden. Lässt sich die Ursache der Intersexualität auf eine definierte Veränderung der Genstruktur zurückführen, so stellt dies die Basis für eine humangenetische Beratung dar.

Die Möglichkeit von Entwicklungsgendefekten sollte daher bei der Forschung und Ursachenfindung bei Patienten mit intersexuellem Genitale in Zukunft stärker berücksichtigt werden.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

In der vorliegenden Arbeit wurde ein Patientenkollektiv mit 35 Patienten zwischen < 1 und 22 Jahren auf einen möglichen Defekt des WNT2 Gens untersucht. Einschlusskriterien für die Analyse waren ein 46, XY Chromosomensatz mit unklarer Virilisierungsstörung des äußeren Genitals bei überwiegend als normal zu bewertenden Testosteron-Werten in der endokrinologischen Diagnostik und dem Ausschluss einer Androgenrezeptormutation. Alle Patienten hatten assoziierte Fehlbildungen, was auf einen primären Entwicklungsgendefekt hinwies. Ein Patient wurde trotz der Diagnosestellung eines hypergonadotropen Hypogonadismus nach Studienbeginn im Kollektiv belassen. Die DNA-Proben wurden mittels PCR- und SSCP-Analyse auf Veränderungen im translatierten Bereich des WNT2 Gens untersucht. Die auffälligen Abschnitte wurden anschließend sequenziert und die Abweichungen charakterisiert. Um funktionell relevante Mutationen ausschließen zu können wurden die entsprechenden Bereiche zusätzlich bei 20 Normalkontrollen, davon 10 männliche und 10 weibliche Individuen, untersucht.

Bei der Analyse konnten fünf Polymorphismen (SNPs) gefunden werden, davon zwei erstmalig. Die weiteren drei waren bereits bekannt und in der Literatur veröffentlicht (Wassink et al. 2001, Li et al. 2004). Ein SNP wurde nur bei einem Patienten gefunden. Dieser Patient wurde trotz der Diagnose eines hypergonadotropen Hypogonadismus in der Studie belassen. Die funktionellen Untersuchungen, ob ein Zusammenhang zwischen dieser Diagnose und dem Polymorphismus besteht, überstiegen den Rahmen dieser Arbeit. Es konnten keine Mutationen im kodierenden Teil des WNT2 Gens identifiziert werden. Weder die SSCP-Analyse, noch die Sequenzierung gaben Anlass für den Verdacht auf Veränderungen der Basenabfolge in den translatierten Abschnitten.

Die vorliegende Studie zeigt somit, dass bei den untersuchten Patienten keine sichere Assoziation zwischen einem Defekt des WNT2 Gens und ihrer Virilisierungsstörung bei 46, XY Karyotyp besteht.

Es kann allerdings nicht ausgeschlossen werden, dass potentielle WNT2 Defekte durch die angewandten Methoden nicht erfasst wurden, da nicht alle Abschnitte jedes Patienten sequenziert wurden und nur ein begrenztes Kollektiv untersucht wurde.

**6 LITERATURVERZEICHNIS**

1. **Achermann JC, Ito M, Ito M, Hindmarsh PC und Jameson JL.** A mutation in the gene encoding steroidogenic factor-1 causes XY sex reversal and adrenal failure in humans. *Nat Genet* 22: 125-126 (1999)
2. **Bassam BJ, Caetano-Anolles G und Gresshoff PM.** Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* Jul 196: 80-83 (1991)
3. **Berkowitz GD und Seeherunvong J.** Abnormalities of gonadal differentiation. *Baillières Clin Endocrinol Metab* 12: 133-142 (1998)
4. **Biason-Lauber A, Konrad D, Navratil F und Schoenle EJ.** A WNT4 mutation associated with Mullerian-duct regression and virilization in a 46,XX woman. *N Engl J Med* 351: 792-798 (2004)
5. **Birnbaum W.** Klinische, endokrinologische und molekulargenetische Befunde bei 17 $\beta$ -Hydroxysteroid-Dehydrogenase-3 Mangel. *Med. Diss. Lübeck / Deutschland* (2002)
6. **Boehmer ALM.** Familial disorders of sexual differentiation. *Med. Diss. Rotterdam / Niederlande* (2000)
7. **Botstein D, White RL, Skolnick M und Davis RW.** Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Amer J Hum Genet* 32: 314-331 (1980)
8. **Cooper DN, Smith BA, Cooke HJ, Niemann S und Schmidtke J.** An estimate of unique DNA sequence heterozygosity in the human genome. *Hum Genet* 69: 201-205 (1985)
9. **Denys P, Malvaux P, Van Den Berghe H, Tanghe W und Proesmans W.** Association of an anatomic-pathological syndrome of male pseudohermaphroditism, Wilms'tumor, parenchymatous nephropathy and XX/XY mosaicism. *Arch Fr Pediatr* 24: 729-739 (1967)
10. **De Santa Barbara B, Bonneaud N, Boizet B, Desclozeaux M, Moniot B, Sudbeck, Scherer G, Poulat F und Berta P.** Direct interaction of SRY-related protein SOX9 and steroidogenic Factor 1 regulates transcription of the human Anti-müllerian hormone gene. *Mol Cell Biol* 18: 6653-6665 (1998A)
11. **De Santa Barbara PS, Joniot 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 (1998B)

12. **Dolle P, Izpisua-Belmonte JC, Brown JM, Tickle C und Duboule D.** HOX-4 genes and the morphogenesis of mammalian genitalia. *Genes Dev* 5: 1767-1767 (1991)
13. **Dong WF, Heng HH, Lowsky R, Xu Y, DeCoteau JF, Shi XM, Tsui LC und Minden MD.** Cloning, expression and chromosomal localization to 11p12-13 of a human LIM/HOMEBOX gene, hLIM-1 DNA. *Cell Biol* 16: 671-678 (1997)
14. **Drash A, Sherman F, Hartmann WH und Blizzard RM.** A syndrome of pseudohermaphroditism, Wilms' tumor, hypertension, and degenerative renal disease. *J Pediatr* 76:585-593 (1970)
15. **Fan E, Levin DB, Glickman BW und Logan DM.** Limitations in the use of SSCP analysis. *Mutat Res* 288: 85-92 (1993)
16. **Freudenberg J, Cichon S, Nöthen MM und Propping P.** Blockstruktur des menschlichen Genoms – Ein Organisationsprinzip der genetischen Variabilität. *Dtsch Arztebl* 99: A3190-3195 (2002)
17. **Glaser T, Lewis WH, Bruns GA, Watkins PC, Rogler CE, Shows TB, Powers VE, Willard HF, Goguen JM und Simola KO et al.** The beta-subunit of follicle-stimulating hormone is deleted in patients with aniridia and Wilms' tumour, allowing a further definition of the WAGR locus. *Nature* 2; 321: 882-887 (1986).
18. **Glavač D und Dean M.** Optimization of the Single-Strand Conformation Polymorphism (SSCP) technique for detection of point mutations. *Hum Mutat* 2: 404-414 (1993)
19. **Graur D und Li WH:** Fundamentals of molecular evolution. 2.Aufl., Sinauer Associates, Sunderland, MA (1999)
20. **Haff LA und Smirnov IP.** Single-nucleotide polymorphism identification assays using a thermostable DNA polymerase and delayed extraction MALDI-TOF Mass Spectrometry. *Genome Res* 7: 378-388 (1997)
21. **Haraguchi R, Suzuki K, Murakami R, Sakai M, Kamikawa M, Kengaku M, Sekine K, Kawano H, Kato S, Ueno N und Yamada G.** Molecular analysis of external genitalia formation: the role of fibroblast growth factor (Fgf) genes during genital tubercle formation. *Development* 127: 2471-2479 (2000)
22. **Haraguchi R, Mo R, Hui C, Motoyama J, Makino S, Shiroishi T, Gaffield W und Yamada G.** Unique functions of Sonic hedgehog signaling during external genitalia development. *Development* 128: 4241-4250 (2001)

23. **Hayashi K.** PCR-SSCP: a simple and sensitive method for detection of mutations in the genomic DNA. *PCR Methods Appl* 1: 34-38 (1991)
24. **Hayashi K und Yandell DW.** How sensitive is PCR-SSCP? *Hum Mutat* 2: 338-346 (1993)
25. **Hellwinkel OJC, Holterhus PM, 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 transcripts variants. *J Clin Endocrinol Metab* 86: 2569-2575 (2001)
26. **Hiort O.** Androgenresistenz: Physiologie und Pathophysiologie der Androgenwirkung. Med. Habil. Schr. Klinik für Pädiatrie (Direktor Prof. Dr. med. K. Kruse) der Medizinischen Universität zu Lübeck (1998)
27. **Hiort O und Holterhus PM.** The molecular basis of male sexual differentiation. *Eur J Endocrinol* 142: 101-110 Review (2000)
28. **Hiort O, Wodtke A, Struve D und Sinnecker GHG.** Nicht-radioaktive SSCP zum Nachweis von Androgenrezeptor Genmutationen – Ein Diagnostikum bei Androgenresistenz. *Verh Dtsch Ges Pathol* 78: 200-203 (1994)
29. **Holterhus PM, Hiort O, Demeter J, Brown PO, Brooks JD.** Differential gene-expression patterns in genital fibroblasts of normal males and 46,XY females with androgen insensitivity syndrome: evidence for early programming involving the androgen receptor. *Genome Biol* 4: R37 Epub (2003)
30. **Jacobs PA und Ross A.** Structural abnormalities of the Y chromosome in man. *Nature* 210: 352 (1966)
31. **Jeffreys AJ, Neumann R und Wilson V.** Repeat unit sequence variation in minisatellites: a novel source of DNA polymorphism for studying variation and mutation by single molecule analysis. *Cell* 9; 60: 473-485 (1990)
32. **Jordan BK, Mohammed M, Ching ST, Délot E, Chen XN, Dewing P, Swain A, Rao PN, Elejalde BR und Vilian E.** Up-regulation of WNT-4 signaling and dosage-sensitive sex reversal in humans. *Am J Hum Genet* 68: 1102-1109 (2001)
33. **Josso N.** Anti-müllerian hormone: hormone or growth factor? *Prog Growth Factor Res* 2: 169-179 (1990)
34. **Josso N.** Anti-müllerian hormone and Sertoli cell function. *Horm Res* 38 Suppl 2: 72-76 (1992)
35. **Josso N, di Clemente N und Gouedard L.** Anti-müllerian hormone and its receptors. *Mol Cell Endocrinol* 179: 25-32 (2001)

36. **Josso N, Picard JY und Tran D.** The anti-müllerian hormone. *Birth Defects Orig Artic Ser* 113: 59-84 (1977)
37. **Josso N, Racine C, di Clemente N, Rey R und Xavier F.** The role of anti-müllerian hormone in gonadal development. *Mol Cell Endocrinol* 145: 3-7 (1998)
38. **Kaloo NB, Gearhart JP und Barrack ER.** Sexually dimorphic expression of estrogen receptors, but not of androgen receptors in human fetal external genitalia. *J Clin Endocrinol Metab* 77: 692-698 (1993)
39. **Kanazawa H, Noumi T und Futai M.** Analysis of *Escherichia coli* mutants of the H(+)-transporting ATPase: determination of altered site of the structural genes. *Methods Enzymol* 126: 595-603 (1986)
40. **Kanazawa A, Tsukada S, Sekine A, Tsunoda T, Takahashi A, Kashiwagi A, Tanaka Y, Babazono T, Matsuda M, Kaku K, Iwamoto Y, Kawamori R, Kikkawa R, Nakamura Y und Maeda S.** Association of the gene encoding wingless-type mammary tumor virus integration-site family member 5B (WNT5B) with type 2 diabetes. *Am J Hum Genet* 75: 832-843 (2004)
41. **Karasawa T, Yokokura H, Kitajewski J, Lombroso PJ.** Frizzled-9 is activated by Wnt-2 and functions in Wnt/ $\beta$ -catenin signaling. *J Biol Chem* 277 Oct 4: 37479-37486 (2002)
42. **Kheterpal I, Scherer JR, Clark SM, Radhakrishnan A, Ju J, Ginther CL, Sensabaugh GF und Mathies RA.** DNA sequencing using a four-color confocal fluorescence capillary array scanner. *Electrophoresis* 17: 1852-1859 (1996)
43. **Kispert A, Vainio S, Shen L, Rowitch DH und McMahon AP.** Proteoglycans are required for maintenance of Wnt-11 expression in the ureter tips. *Development* 122: 3627-3637 (1996)
44. **Klamt B, Koziell A, Poulat F, Wieacker P, Scambler P, Berta P und Gessler M.** Fraser syndrome is caused by defective alternative splicing of WT1 leading to an altered ratio of WT1 +/- KTS splice isoforms. *Hum Mol Genet* 7: 709-714 (1998)
45. **Kondo T, Zakany J, Innis JW und Duboule D.** Of fingers, toes and penises. *Nature* 390: 29-29 (1997)
46. **Koopman P, Gubay J, Vivian N, Goodfellow P und Lovell-Badge R.** Male development of chromosomally female mice transgenic for SRY. *Nature* 351: 117-121 (1991)

47. **Kozopas KM, Harryman Samos C, Nusse R.** DWnt-2, a Drosophila Wnt gene required for the development of a male reproductive tract, specifies a dimorphic cell fate. *Gene&Development* 12: 1155-1165 (1998)
48. **Landegren U, Nilsson M und Kwok PY.** Reading bits of genetic information: Methods for single-nucleotide polymorphism analysis. *Genome Res* 8: 769-776 (1998)
49. **Langman J und Sadler T:** Medizinische Embryologie. 2.Auflage, Kapitel 15: 277-321, Thieme, Stuttgart (1998)
50. **Leimeister C, Bach A und Gessler M.** Developmental expression patterns of mouse sFRP genes encoding members of a secreted frizzled related protein family. *Mech Ageing Dev* 75: 29-42 (1998)
51. **Lewin B:** Genes VII. Oxford University Press, Oxford/ Großbritannien (2000)
52. **Li J, Nguyen L, Gleason C, Lotspeich L, Spiker D, Risch N und Myers RM.** Lack of evidence for an association between WNT2 and RELN polymorphisms and autism. *Am J Med Genet B Neuropsychiatr Genet* 126: 51-57 (2004)
53. **Lim HN, Freestone SH, Romero D, Kwok C, Hughes IA und Hawkins JR.** Candidate genes in complete and partial XY sex reversal: mutation analysis of SRY, SRY-related genes und FTZ-F1. *Mol Cell Endocrinol* 25; 140: 51-58 (1998)
54. **Lim HN und Hawkins JR.** Genetic control of gonadal differentiation. *Baillières Clin Endocrinol Metab* 12: 1-16 (1998)
55. **Lin Y, Liu A, Zhang S, Ruusunen T, Kreidberg JA, Peltoketo H, Drummond I und Vainio S.** Induction of ureter branching as a response to Wnt-2b signaling during early kidney organogenesis. *Dev Dyn* 222: 26-39 (2001)
56. **McBride LJ, Koepf SM, Gibbs SA, Salser W, Mayrand PE, Hunkapiller MW und Kronick MN.** Automated DNA sequencing methods involving polymerase chain reaction. *Clin Chem* 35: 2196-2201 (1989)
57. **McCoy PA, Shao Y, Wolpert CM, Donnelly SL, Ashley-Koch A, Abel HL, Ravan SA, Abramson RK, Wright HH, DeLong GR, Cuccaro ML, Gilbert JR und Pericak-Vance MA.** No association between the WNT2 gene and autistic disorder. *Am J Med Genet Neuropsychiatr Genet* 114: 106-109 (2002)
58. **McElreavy K, Barbaux S, Ion A und Fellous M.** The genetic basis of murine and human sex determination. *Heredity* 75: 599-611 (1995)
59. **McLaren A, Simpson E, Tomonari K, Chandler P und Hogg H.** Male sexual differentiation in mice lacking H-Y antigen. *Nature* 312: 552-555 (1984)

60. **Merril CR, Dunau ML und Goldman D.** A rapid sensitive silver stain for polypeptides in polyacrylamide gels. *Anal Biochem* Jan 110: 201-207 (1981)
61. **Min KS, Liu X, Fabritz J, Jaquette J, Abell AN und Ascoli M.** Mutations that induce constitutive activation and mutations that impair signal transduction modulate the basal and/or agonist-stimulated internalization of the lutropin/choriogonadotropin receptor. *J Biol Chem* 273: 34911-34919 (1998)
62. **Minegishi T, Nakamura K, Takakura Y, Miyamoto K, Hasegawa Y, Ibuki Y und Igarashi M.** Cloning and sequencing of human LH/hCG receptor cDNA. *Biochem and Biophys Res Commun* 172: 1049-1054 (1990)
63. **Misrahi M, Beau I, Meduri G, Bouvattier C, Atger M, Loosfelt H, Ghinea N, Hai MV, Bougneres PF und Milgrom E.** Gonadotropin receptors and the control of gonadal steroidogenesis. *Physiology and pathology. Baillières Clin Endocrinol Metab* 12: 35-66 (1998)
64. **Monkley SJ, Delaney SJ, Pennisi DJ, Christiansen JH und Wainwright BJ.** Targeted disruption of the Wnt2 gene results in placentation defects. *Development* 122: 3343-3353 (1996)
65. **Moon RT, Brown JD und Torres M.** WNTs modulate cell fate and behavior during vertebrate development. *Trends Genet* 13: 157-162 (1997)
66. **Morgan EA, Nguyen SB, Scott V und Stadler HS.** Loss of BMP7 and Fgf8 signaling in Hoxa13-mutant mice causes hypospadias. *Development* 130: 3095-3109 (2003)
67. **Mullis KB und Faloona FA.** Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol* 155: 335-350 (1987)
68. **Nelson WJ und Nusse R.** Convergence of Wnt,  $\beta$ -Catenin and cadherin pathways. *Science* 303: 1483-1487 (2004)
69. **Niemann S, Zhao C, Pascu F, Stahl U, Aulepp U, Niswander L, Weber JL und Muller U.** Homozygous WNT3 mutation causes tetra-amelia in a large consanguineous family. *Am J Hum Genet* 74: 558-563 (2004)
70. **Nusse R.** Wnts and Hedgehogs: lipid-modified proteins and similarities in signaling mechanisms at the cell surface. *Development* 130: 5297-5305 (2003)
71. **Nusse R und Varmus HE.** Many tumors induced by the mouse mammary tumor virus contain a provirus integrated in the same region of the host genome. *Cell* 31: 99-109 (1982)
72. **Nusse R und Varmus HE.** Wnt genes. *Cell* 69: 1073-1087 (1992)

73. **Ogino Y, Suzuki K, Haraguchi R, Satoh Y, Dolle P und Yamada G.** External genitalia formation: role of fibroblast growth factor, retinoic acid signaling, and distal urethral epithelium. *Ann NY Acad Sci* 948: 13-31 (2001)
74. **Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K und Sekiya T.** Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single-strand conformation polymorphisms. *Proc Natl Acad Sci USA* 86: 2766-2770 (1989A)
75. **Orita M, Suzuki Y, Sekiya T und Hayshi K.** Rapid and sensitive detection of point mutations and DNA polymorphisms using the polymerase chain reaction. *Genomics* 5: 874-879 (1989B)
76. **Page DC, Mosher R, Simpson EM, Fisher EM, Mardon G, Pollak J, McGillivray B, de la Chapelle A und Brown LG.** The sex-determining region of the Y chromosome encodes a finger protein. *Cell* 52: 1091-1104 (1987)
77. **Palmer MS, Sinclair AH, Berta P, Ellis NA, Goodfellow PN, Abbas NE und Fellous M.** Genetic evidence that ZFY is not the testis determining factor. *Nature* 342: 937-939 (1989)
78. **Parker KL.** The roles of steroidogenic factor 1 in endocrine development and function. *Mol Cell Endocrinol* 145: 15-20 (1998)
79. **Parker KL, Schimmer BP und Schedl A.** Genes essential for early events in gonadal development. *Cell Mol Life Sci* 55: 831-838 (1999)
80. **Parr BA und McMahon AP.** Sexually dimorphic development of the mammalian reproductive tract requires Wnt-7a. *Nature* 395: 707-710 (1998)
81. **Perriton CL, Powles N, Chiang C, Maconochie MK und Cohn MJ.** Sonic hedgehog signaling from the urethral epithelium controls external genital development. *Dev Biol* 247: 26-46 (2002)
82. **Racine C, Rey R, Forest MG, Louis F, Ferre A, Huhtaniemi I, Josso N und di Clemente N.** Receptors for anti-müllerian hormone on Leydig cells are responsible for its effects on steroidogenesis and cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci* 95: 594-599 (1998)
83. **Rao TS, Nampalli S, Lavrenov K, Zhang W, Xiao H, Nelson J und Kumar S.** Four color fret dye nucleotide terminators for DNA sequencing. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids* 20: 673-676 (2001)
84. **Reiner WG und Gearhart JP.** Discordant sexual identity in some genetic males with cloacal exstrophy assigned to female sex at birth. *N Engl J Med* 350: 333-341 (2004)

85. **Rey R und Picard JY.** Embryology and Endocrinology of genital development. *Baillières Clin Endocrinol Metab* 12: 17-33 (1998)
86. **Sanger F, Nicklen S und Coulson AR.** DNA-Sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci.* 74: 5463-5467 (1977)
87. **Satoh Y, Haraguchi R, Wright TJ, Mansour SL, Partanen J, Hajhosseini MK, Eswarakumar VP, Lonai P und Yamada G.** Regulation of external genitalia development by concerted actions of FGF ligands and FGF receptors. *Anat Embryol (Berl)* 208: 479-486 (2004)
88. **Shen WH, Moore CC, Ikeda Y, Parker KL und Ingraham HA.** Nuclear receptor steroidogenic factor 1 regulates transcription of the human anti-müllerian inhibiting substance gene: a link to the sex determination cascade. *Cell* 77: 651-661 (1994)
89. **Sinclair AH, Berta P, Palmer S, Hawkins RJ, Griffiths BL, Smith MJ, Foster JW, Frischauf AM, Lovell-Badge R und Goodfellow PN.** A gene from the human sex-determining region encodes a protein with homology to a conserved DNA-binding motif. *Nature* 346: 240-244 (1990)
90. **Sinnecker GHG, Hiort O, Dibbelt L, Albers NN, Dörr HG, Hauß H, Heinrich U, Hemminghaus M, Hoepffner W, Holder M, Schnabel D und Kruse K.** Phenotypic classification of male pseudohermaphroditism due to steroid 5 $\alpha$ -reductase 2 deficiency. *Am J Med Genet* 63: 223-230 (1996)
91. **Sinnecker GHG:** Störungen der Keindrüsen und der sexuellen Entwicklung. In: Kruse K, Dörr HG, Grüters A, Holl R, Kiess W und Sinnecker GHG: *Pädiatrische Endokrinologie*. 2. Aufl., Kapitel 5: 167-226, Thieme, Stuttgart (1999)
92. **Smolich BD, McMahon JA, McMahon AP und Papkoff J.** Wnt family proteins are secreted and associated with cell surface. *Mol Biol Cell* 4: 1267-1275 (1993)
93. **Spinardi L, Mazars R und Theillet C.** Protocols for an improved detection of point mutations by SSCP. *Nucleic Acids Res* 19: 4009 (1991)
94. **Stolecke H:** *Endokrinologie des Kindes- und Jugendalters*. 2. Auflage, Kapitel 25: 829. Berlin, Heidelberg (1992)
95. **Suzuki K, Ogino Y, Murakami R, Satoh Y, Bachiller D und Yamada G.** Embryonic development of mouse external genitalia: insights into a unique mode of organogenesis. *Evol Dev* 4: 133-141 (2002)

96. **Suzuki K, Bachiller D, Chen YP, Kamikawa M, Ogi H, Haraguchi R, Ogino Y, Minami Y, Mishina Y, Ahn K, Crenshaw III EB und Yamada G.** Regulation of outgrowth and apoptosis for the terminal appendage: external genitalia: development by concerted actions of BMP signaling. *Development* 130: 6209-6220 (2003)
97. **Taketo M, Parker KL, Howard TA, Tsukiyama T, Wong M, Niwa O, Morton CC, Miron PM und Seldin MF.** Homologs of *Drosophila* Fushi-Tarazu factor 1 map to mouse chromosome 2 and human chromosome 9q33. *Genomics* 25:565-567 (1995)
98. **Themmen AP und Brunner HG.** Luteinizing hormone receptor mutations and sex differentiation. *Eur J Endocrinol* 134: 533-540 (1996)
99. **Themmen AP, Martens JW und Brunner HG.** Activating and inactivating mutations LH receptors. *Mol Cell Endocrinol* 145: 137-142 (1998)
100. **Van Ooyen A und Nusse R.** Structure and nucleotide sequence of the putative mammary oncogene int-1; proviral insertions leave the protein-encoding domain intact. *Cell* 39: 233-240 (1984)
101. **Vanio S, Heikkila M, Kispert A, Chin N und McMahon AP.** Female development in mammals is regulated by Wnt-4 signaling. *Nature* 397: 405-409 (1999)
102. **Wachtel , Ono S, Koo GC und Boyse EA.** Possible role for H-Y antigene in the primary determination of sex. *Nature* 257: 235-236 (1975)
103. **Wainwright BJ, Scambler PJ, Stanier P, Watson EK, Bell G, Wicking C, Estivill X, Courtney M, Boue A, Pederson PS, Williamson R und Farrall M.** Isolation of a human gene with protein sequence similarity to human and murine int-1 and *Drosophila* segment polarity mutant wingless. *EMBO J* 7: 1743-1748 (1988)
104. **Wassink TH, Piven J, Vieland VJ, Huang J, Swiderski RE, Pietila J, Braun T, Beck G, Folstein SE, Haines JL und Sheffield VC.** Evidence supporting WNT2 as an autism susceptibility gene. *Am J of Med Genet Neuropsychiatr Genet* 105: 406-413 (2001)
105. **Yamada G, Suzuki K, Haraguchi R, Miyagawa S, Satoh Y, Kamimura M, Nakagata N, Kataoka N, Kuroiwa A und Chen Y.** Molecular genetic cascades for external genitalia formation : an emerging organogenesis program. *Dev Dyn* 235: 1738-1752 (2006)

106. **Yamaguchi TP, Bradley A, McMahon AP und Jones S.** A Wnt5a pathway outgrowth of multiple structures in the vertebrate embryo. *Development* 126: 1211-1223 (1999)
107. **Yu RN, Ito M, Saunders TL, Camper SA und Jameson JL.** Role of Ahch in gonadal development and gametogenesis. *Nat Genet* 20: 353-357 (1998)
108. **Zhou S, Eid K und Glowacki J.** Cooperation between TGF-beta and Wnt pathways during chondrocyte and adipocyte differentiation of human marrow stromal cells. *J Bone Miner Res* 19: 463-470 (2004)

# ANHANG

Publizierte Sequenz des WNT2 Gens mit den Exons 1-5 und markierten SNPs

Sequenz aus: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org), 600 bp 5'-flankierende Sequenz

Legende:

- A** Exons 1-5
- A** SNPs, jeweilige Bezeichnung in der rechten Spalte, neue SNPs wurden grau hervorgehoben

>chromosome:NCBI35:7:116510633:116557894:-1

```
CGTAAAAACTGCATCTTTCTGGGTGCTTTGGCAGATACTGCTGGGTTAGGTCCCCGAGGG
TCATGGACCCCTCCAAGTTCCCTCCCTATGGGCTCTGTATTTAAGCCAGCACCAAGGAA
TCAAAGCCAACAGGTCATTTTCGAGAGGCTGGCCCTCCCTAACCTTGCCCTGCATAGA
CGCGGCAGCTCCAAATTTACAAGTGTAGCTCTTCATCCCAGCTTCAGGGAGAGAAGCGA
AGCAATGAGTTGAGAATCATCTCTGGATTCTTGATCCCATGCATAGTAATCTCCTTATC
CCCTGGCCCCCTTCTCGTTTCTCACATTGCACGCTCAGGGACTTGTTTGCCAGCGGAT
GGCTCGGCAATCCGGAACGCACGCTCCGAGAGCCACGGATGCTCTTTGGCTGGAGCT | base_382:A/G
TCCCTAAAGGTTCTGTATTTCGCGTGTGCTCGTAACCATGCAGCGATGTTCCCCCTTCCC
CGCTCACCTCATCCCAGACATCTTGGCCATCATTTTCATGCACCCGTGTCTAAAACCC
CGCGTTTCTCCCCACCCCGCCAGGCGCAGCACCCCTCCCTCGGCTGCGCCCGGAGGGG
AGCAGAGCGGACGGGGCGCGGGGAGGCGCGCAGAGCTTTTCGGGCTGCAGGCGCTCGCTG
CGCTTGGGGAATTGGGCTGTGGGCGAGGCGGTCCGGGCTGGCTTTATCGCTCGCTGGGC
CCATCGTTTAAAATTTATCAGCGAGTCTCGCCACTCGTCGCAGACGCGAGCGGGGGGCG
GGGGCGGGCGAGGCGCCGGCGGCGGTGACGAGGCGCTCCCGGAGCTGAGCGCTTCTGCT
CTGGGCACGCATGGCGCCCGCACACGGAGTCTGACCTGATGCAGACGCAAGGGGGTTAAT
ATGAACGCCCTCTCGGTGGAATCTGGCTCTGGCTCCCTCTGCTCTTGACCTGGCTCACC
CCGAGGTCAACTCTTCATGGTGGTAAGTCCACGCGCACGGGCGCGGGGATTTTGGAGA | base_1011:-/G
TCGGAATGGGACCCCATTTGGCCACATAGACCTTCCCTGGCTGCGTTCCCCCGCGGCGC
AGCAGTCTCGGATCTGGCCGAACCTGGCTACTGCCCCTTATCGCCCCATGGTGAGC
CCCTTCTCTTTTCCCAGAAGATCATTTTCAGCTTTGACAACCTCCATAAAACCACATTCCCC
CTCAAATGAGAGCTCCGATGTTTGGTTTATTTGGATCCAGCTGAGCGACAGCAAATCAG
CCAATTTCTTATCTGTGAGAGACGTGCTAGCCTGGTCTCCAGCTCTAGCACAGCGTG | base_1317:-/GT
TGTGTGTCTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTGTAAATTCACCTGAAAACATAACCGCC | base_1328:-/
TCCCCATCCAGCCCCACCCGCCAAAATGCTCAAGGTAATCGACGGGCCAATTC TGTGTG/TGTG/TG
AGCCAGTCAGGAGTTGTAGAACCTAAAGCGTGTGACTTTGTATTATTTCCCGTCTTCCA
CATTCCAGGTTACCCAGTGGGGCGGAAGAATTTTGTGCTGCCCTCCAGTTAGAGACTAT
GGCTTTAATGCAAAGCTACAGACCCCGGGTCTGTCTTAAGATGTTACCTTGTTCACAA
CCGTCCCCCGGAAGAGTAACCTTGTGCTTTCCCTTTGTACGTTGGTCTGCAATTTATTTA
TTTTATTTTTCATAGTGATGGAATGTTGAACCATACCAGGTCGCTAAAAGTTCCAAAGGC
AGATTCCCTCCCCATCTAGAAAACCGTTCTCCATCTGCCGACTTTCTGGTCTTGAAAGAG
ATAGAGTTGATAGCCCTGTAATTTCCCTTGACCTAAAAGTTTCAGAACAGATATTTAAAT
ATTGATTCAGAGACACCCGTTATCGTGGGCTAATTTTTTAAAGAATCTGGTAAGGGGTCTC
AGCTAAATTACAGACTAGAGCAGGAAATTTTTAGGAAGACACTGGAGCTCTTCAAAGGA
GCAAGGCAATGCGCTGATGGGAAGAGGGGTTCAATTCCTTCCTAAGCCGGCTTTGAACAG
GGAGGCGTTAGCCTTGACATTGCTGACACAGGATCAAAGATTGATTTATCAGACTGACC
ATTTTTCAATAAAAATGACTATTTCTGTTTCCATGGGTGTATAAACATTATTTATTGCTCA
GGCTTTTTGTGCATCTCTCAGCTGTCACTTAAATATATTTTTTTGGAAGTCACAGCT
GTAACGATTTTATGATCATATAAAATAATGAAAATACAAGAAAAAGACATTCTCCTTGT
TGATCGCTTCAAAGACACCTATGGCAGCTTGGGTTATATAAAAGGTACCTTTCTAAACA
TTTCACGACTAATAGAGAACATCTGGGTAGAGATGATGATGTAATTTTTTTGTAAAGTTT
CTTTTCAAAGTACTTTATGGAGTTATAGCACTGTTTGATTCTTCCAAACATTTAGTGT
CCTTAATAACAATAGAAAAGATTTTTTCCAAAGGATCTTTATAAAAGCCAAAAGAGCTA
CAAAATGAAAATATTAAAAAGGCTCTTCAGTAAGGAAAGAACAGCCTGTCTGTGAGGAGA | base_2536:T/A
```

GTGTAACATCAGATACCAGCGGGTGTGATTAGACAGATACAGACAGTTTTTAAAGACATT  
CTGTCAAATAATGGGAACGAAGAGCTTCTAAGGTCAGCTTCCCCAAAGCCAAGTCCAGA  
CACATTGTGTCACTGAGATCTGAGCCTTCTTGAGAACAGTCTTCCACACATTCTCCCCAA  
GACACGTTGCTTCTTACCCGTCATTCACCTTCCCCAAATGCCGACTTTGCCTCTGTGCCCC  
TGCCAGAGCATCATCTGGTAGACCTAGCTTCATGTCCAACAGACAGTCATCACAGCATT  
TTGGGGATGACTTCTGCAAGATCACTCACTACGCCTGCCTGCCTTGCCGGTTTTCTCCACT  
AAATTA AAAAGTAAATACCCCTGCTTTCTAATATCACCAGAAGGATAAGGAATTCATATT  
TGAAAAGTGCTTTGAACTCCTTAGTCTCCCAGGAACACTGAGCCAGGCCCTCCCTGTTTAC  
GTTGCCCTCACCTCTGTGTTGGTTGGTCCCTTATAG**GTACATGAGAGCTACAGGTGGCTC**  
**CTCCAGGGTGATGTGCGATAATGTGCCAGGCCGGTGGAGCAGCCAGCGGCAGCTGTGTCA**  
**CCGACATCCAGATGTGATGCGTGCCATTAGCCAGGGCGTGGCCGAGTGGACAGCAGAATG**  
**CCAGCACCAGTTCCGCCAGCACCCTGGAATTGCAACACCCTGGACAGGGATCACAGCCT**  
**TTTTGGCAGGGTCTTACTCCGAA**GTAAGTCTCCTGCCTTACCCAGCCCTATGGCTCTCC  
ACTCATGCACAGCTCCCTCACTCCATCTTCAAAGACCCTGCTTATCTTCTATTGCATTTT  
ATTCCATCAGAAGTTTGTTCAGTTGGGCGTCATTGTCCCTGTTCTACAGGTGAGGACTAG  
AGAAATCAAGGAACATGTCTAGAGGTTTGTAAAGAGGTGAATCAAAGGAAGAAGTAGAAC  
CCCAGGCTGTGTCTTTTCACTCTTTGCTCTGTCCATCACTCCAATATGGCACATCCTCC  
AGGTTCACTCTCGTCTAAGAGACGAGAGGGAGGAGCCACAAGTCTCTTTTGACTTTT  
TCCTTGCTTTCTGGGGCTTCCCTCAGAAGAAATTTGAGCAGATCATCAGCATAGAATCTT  
CAAATCTTTTCTCAGCAAAGGATTATCAGTATTGCAAAAACACCCTTAAGTGATATTA  
GAAGCAGAGACAAAATCTCTACTCACCACCTTTTACCTTCCATTTAGCTACTCAGCCTTG**C**  
TGCTCTGTGTCTAAAATTC AACATTTTCTCCCAACAGATTGTAATTTCTGTAAGGGCA  
GAAACTAACCTATATTCCTGCACCTTGCTTGGTGCCTTGTGTATTGCAGGCCCTGTTC  
TTCATTATGATGAATGAGTGGATAAACTTGTAGTGGCTACCTATTATTTTCCAGCTACAT  
TTTAAAGCAATAAGGATAGCTATGGAGGATAGAGGTGGGAAACATGAATACATAGAGGTTT  
TTTCTTCTTAGCAGGAA**C**CTTAAACATTTTCTAATTACGTAGTAAACTTCTTAAAAGTT  
CTGAATATGGAAAGTACTCACTAGCTAGGACACAATCAAAGAAAATTAATTGAAAATCA  
TATTTCAATTTCAAATAATACCCATCTGCTAACCTGGCATTATTAGCATTCTCCAGGAAA  
CACCACAGTCCATTTGCTATTAGAAAATCTGACAGAAAACACAGCAGTTTATGTGCAAAC  
CCCCAAAATAGGAAACTTTTTACTTGTTTTTGCCTACCC**C**CCCC**C**CAATTCCTAAGAAA  
ATCATCCAGACTGTGCACTTGGTAATGCTTAACAGAGGGTGTTCCTATCATGTAATCATC  
ACAGCCCTAGGGTTTTATGAGGCCAAATGCATAACTGAATGTCTCTAAAATCCCCAAGG  
GCGTAGTACTCTCATCTTAGAGTATCCCTAAAGTTAATTTACTGCGATATCTGCAATT  
TTATCTCTAGTTTAAAGAACTATATCTTCTGCATTCCTTTTGGAGTTTCAATATGACAT  
CGAAAATTTTGAAGGTTAATAATAAAATTTTCACTTTCATGGAATTTTAAAGACTTCACCT  
AGATTATCTTGCAGTGAATCAATTAAGAAACTGGACCTTGTAAAGAGAGTTTGCAAA  
TATCTAGCAGAGTAATCTTTGGATATATTATGCATGGCTCTCAGTGTTTAAAACATATC  
AGGATTTTTTTTTCAAAGTGCTTACAACCATTTTGCAATGATTTCAAATTAGATGTACATC  
TCATTTATGAAAATGATCATCTCTGGATCTATTAAGATATCTACATATTTGAATAAAACCT  
TTAGATCACATATCAAAGGAAGCAATATTGACCAGTGATCCTAAAGAAAATATATCCATC  
AAAGCTGGGGATTCATTTATAAAAATCTGTAACCTTAATCTTGACACTATTATTTTCTTCA  
GAGCTGTAGAATTGCTGAGATGAAGGAGGTTTCAACTAGAGGTAACAGCCAGGCTCACTC  
CTATAATCCCAGCACTTTGGGAGACTGAGGTGGGAGATCACTTGAGGCCAGGAGTTTCA  
GATCAGCCTGGCCAACATGGCGAAACCCATGGGTGTGGTGGTACATGCCCTTAATCCCA  
GCTACTTGGGAGGCTGAGGAATGAAAATCACTTGAACCTGGGAGGAGGAGGTTGCAGTGA  
GCCAACATATTGCCACTGCACCTCCAGCCTGGGTGACAGGACTGGAGGAAACAGAAGTAGT  
TTAAATTAGTCTAGACCTCAGGTAAATAAGAGATTCTAACCTGTACTTCTTCCATCAGATTTT  
TTTTCAGATGAAGCAGAATACTTTGCCACAGTACTCAGAACTTAAACCCTCATGCTACAC  
AATTTCTTTCCATTCTTACAGAAAGGCCAGGTTCCCTCTCAGACATTTATGCAAACCTCTT  
GTGACTGTCACTGATGATTTTGTGTTGGTTATGGGAGGGCTGAATTTGGCCTAAAGCAGC  
TTATCTTGAAAATAATCAAGAAATCCAATGAAGCTATCCAAAGATTTCTACAATTAGTT  
GCTTGAGAAAAAGTTACGTCTTAGAGTTGTGGACACCTAAATATGCTCATAGATGAATA  
GGAAAGGCAAAGGGCAAGACATTTATAAGAAGAACATAAAATTAACAAAATGTCCCCTG  
GTCATAGAGAAAATGGAGAACATTTGCCTGTTTACTTTAGAGAGTCAGAATAAGACAGTA  
CAATTTTATAGAAACATTTGTAATTTACTCATTCAACAGATAGTTACCAGTCACAGGCAGA  
GAAACAAGGACAGAACTAGCAAAAATAAAAATATTCCTGCAAGAATACACCTCCAAAATT  
CTAGAATTAGCCTTAGAAAAACAAAGGTAATTAGTTCTCATCCTTATAAAATATTTTCTT  
ATAAAGCAAACTTTTAAAGAGAAATGAACAACTCATAACCTTCAAGAAACCCTAGCTTC  
TAGAGTTTTGCTTCTTAGGTAACAATCTCTTACCCCAAATAAAAACCTGTGCCTATGTA  
CTTAATAGGCATTTGCTGATTTATCTCCATACAAAATTAGAGAACTTCAATAGCAACA  
CATTAGGAAAATACAGATGTCACCACCTTAGATTTGGATTTTGTTCATTTTGTGATAGCTG

| base 3840:G/T

| base 4099:C/T

| base 4360:C/G

| base 4366:C/G

TAAAAAGGATCTTTCTAAGAAAAGGCCCAAGATCAAAATTTGTTTTGTTACAAAGCCAGC  
TCTTGAAAATGTGCTACTACTTCACACATAACATTTTAGTGATTCATCTAAACACGTAAC  
GAAAACATTTTAGGGCTA**T**TATCTACATGGTACCAAACCATCTGGAGGTA  
AAAATGAAAA  
CCAGTCAATGTGCTAAATTTTAAATTTAAATAAAGGAACATCTAGCTATTTAGTAATGTG  
TTTGAATAATACATGACAAAATTTAGAAAAGTCATATTTTGGCTTTGGAAATTTTCT  
GAAATGAAGCAGATTTGTGATTTGTTTTCTTTCAGTCAACAAGTTAATGTAATTTGTTTCCA  
AGTTATACCAGGATGAATTTCTGCACCTAGACAATTTATTTCTCTTGTGCTTTCGAAATA  
CTGTCTGGTTACCTGATATAGTATCATCCCCGTCTCCATGTCTTTCCCGTAATAGACCA  
CTTCATAAAAATGTCTCTTCTTCTCCTTAAAAAATAAGACTAGTGTCTACATACTTAAGCT  
TTTGGGAATTTCCCTCTATGTGATCTCTAAACATGGGCGCCGGCTTCTAAATCCCA  
AACCAAGCTTTAGAAAGATAAAATGGGGTAACCTATGGAAAAGGTATTTTCCATAACTGTAAA  
ATGGATATAATAAAAGTTTAAATTTATCTGAAAGCCACTATCTGAGATTAAGTCACATTAG  
CATGTATTAGTCGCCTTCTTTTACAAAACATCTCAATTCCACTTAGAATATCTGTGGTCT  
ATATAGTATAAGCTGGGACTCTTTAAAACAGCTCTCGTAACCATCATATTTCCCTCTGGA  
GAGCACTACCTGCTACCTATGGCGAATAGTCATATAATGATTTTACCTAACTACAGGGC  
ATGATTGATTCCTTTTTGATGGTTAGAGGTTTGGGGGTAAATATTTTCTGAAAGCTGA  
GGTAAGTGCCATTTAATATGGTGTAGATATGTTTTCTGATTTTAAATAATGAGACTAGC  
AGAGCAAATATTGCAAGGGATGTATAATAAAATTTTAGCACTGAATGACAAACGGAAACAA  
GCAGGGCTTCAATGTGAAAAGGTGGTTTGTCTCTCCAGCTGTGTGGTTCAAAAAGTCACA  
CTCCTCTTGACATATTGAATCACCAAATGGTTCTCTGTTTTCTGCCTTGCAATTGGCATT  
GGTTATCCAGCTTCTATTTGGATTGTTAATATATTTGCC**C**CAGCAACCATTAATAAAAGG  
GCATGCTAATAACAATGAAAATACAGCTCCACTTGAAAAATGAGGTGCACACGGACCCTAA  
AGAGCCTTATATCTGTCACTATAACCACAACACCGTGTATGAGTTACTACAGATTATTA  
AATAATTTAATGTAGTTATTGCACTGAAATATGTACCTTTAGCCTGTAAGTGAAGTAG  
CCTGTGCTCTAATAAAGAACAATTTCTAAGAAAAGCACCCAAAGGGTTCTTGCCCAAGTCT  
AATTATAGGCGGTAAATTTGTTTCTTCCAGAAAAACCAAAGAAAAACTTTTCACTGTCT  
TTTACCATAACCAGTGATTAGTGCAGGTGTTCCAGAAGAAAGTAAATTCACCTTAATAG  
TTAGACATATAGTATGTAACCTCAAGGATATTGCATACCTGCCTTACGCAATCTCTCAATTA  
CTTATGAAAAGTCAATGCCAAGCCCAAGCTCTCCAGTGTAAATGCAAGGGGCTGGTTACTG  
CCAGAATTTCTCTTCCACCTTAGTCCCTAGATTTCTTTGAATTCAGTATTTTCAATCTCAA  
TAATTTAAGTGCATATGAGTATCTTTCAGTAAGTCTTGGAGGTTTGGAAAGGATATTTGAG  
GAAAAGCTGTGGTGTGATGAGTACCCAACATATTTGTGGAATGATAGAATTTGATGATTTCA  
GACTGTAAAGAAAAAGCCCTAGAGATGCTATGCTCCTCTCTTCTAGGACATCTAGAGCTC  
TCTGTTGAAACAGGGCAAGCCTGT**C**TTTGGAGACTAATGTGAAGCCAGGAGCTGGGCAAGG  
CCATCTTTTCTTTGATACTGCTTATTTAAGAAGAGCTGCCACACAGATACCTAAATTTGA  
CAAAAACCTATATTAGATGGAGATGGTTCATATTAAGAAAGAGCCTGGGCTCTAGAAAA  
GAACCTTCAAGAATATCAGTACCTTGTGTCTAGTGGCAAAGGTTGTCTGAAACAGAGC  
AAATATTAACAATTTGTCATATGAAAGTTATTCAGAAATAGTGTACCGGACCCTTTTA  
AGAAAAGCATTTTTGTTTTAG**GTAGTCGGGAATCTGCC**TTTGT**TTATGCCATCTCCTCAG**  
**CTGGAGTTGTATTTGCCATCACCAAGGGCCTGTAGCCAAGGAGAAGTAAAATCCTGTTCCT**  
**GTGATCCAAAAGAAATGGGAAGCGCCAAGGACAGCAAAGGCATTTTGTGATGGGGTGGCT**  
**GCAGTGATAACATTTGACTATGGGATCAAATTTGCCCGCGCATTTGTGGATGCAAAGGAAA**  
**GGAAAGGAAAGGATGCCAGAGCCCTGATGAATCTTCAACAACAGAGCTGGCAGGAAG**  
TATGAAAATGCAACGGTGTCTATTTGTAGGCTGCATGGCTTTATAAACCCTTAGGCAG  
AGCTTATCTTAAACTTCCCTAGAAATGATAAAATGCTGTGTAGTCACAACCTTCTTCTGT  
CCCCAGCCATTAGCTGTTTGTTCGGAAGAATACCAACAACTAGGTTGAAATATTTCCAC  
CCACACTCCACCTTCTTCTTATAGCTAGTTGAAGGAGTCCACCCATTGTGTTTGGCATT  
GTGTTGATTCAAGTCTTTTATGGTCTCTCTGGACACTGTCATTTAAGCAGAAGATATGAA  
CTGTGGGTTAGGATAGTGTCTCATCCACATAGCAAT**G**TACACTGAATGCTTATATCTA  
AGGGATATAAAGATTAGACCCAGAGCATCTTTTCTTACATGTATCATGAAAACAACCTCAT  
CAAGCATGGTTTGTGGCTTCTTCTAGATTTAGGGATGCCCTCTTTGGGAACCTGACCCA  
AGTCTCACTCATAAAAAGCCACCTTGTGTTTCTGGTGTGGATAAGTAAGTGGACCAG  
GAGAAGACATGATCCTCAGAGGGTATTCTGGCCCTTCTCCTCTAGACCTGACTAACTTC  
CTGGGCTCCAGTCAGTGTACACCTTTAACCATCATTTGTAAATGAGGAACTGAAGCC  
CTCAAGGTACTCAAGGTCAACAAGGAAGTTAGTAGAAAGGACTAGAAAGTTAGGTTTCAAC  
ACGTAGTCCAGGGGTGCTTTACCCTAGGATTAACCATTTCAATGCCAATGTTTCAGACCC  
ACTGATGACCCATGTCTTTTGGTATGGTGGTATGACCAGAATAACTAGAGAATTTAATGC  
TGTAATTTGATGCTTTTGTGTGGAAAGCATTAACCTGGCTGGGTGAATCAAATATTTGTTC  
GAACTATTTAGAAATAATCTAATTTGCCAATAGGAAGAGGTAACGATAATTTGTCTTTTAT  
CAACACAACATAAAAAATGTGTTTATTAATATAAAGAAAGAT**A**AGCATAAAATTTGA  
AAGGTCCCTGGGGGGGCTTTAATAGGAAAAATAATAGAAAAGAAATGGATGAAAACCCCTT

| base 6379:T/-

| base 7480:G/A

| base 8245:G/A

| base 9159:T/G

| base 9827:A/C

TACTAGGCTCCTGGAGAGAACAAATCTCATTAAAGGAAGTTAGAAGGAAAGAACTCTTG  
CTTAGCACATGGTATAACATGAGTGTGACCTGAACTGTTTACAAATAGTACCTTTCTTGA  
ACTTTAAAAATCAACATTCCTAATTTTCATGAATTTATGAACCTTACAGTCACTACTGCCA  
AGAAAAATAGACTATGGTTGTGCAATCCTACAACCTATTGGTAATTACTGTTTGTGCAATGA  
TTTGGATAAAAAAATTTACACTGACCTTTGTCCTAACATTTGATAGTACATGTATAAGTTA  
TAAAGTGTGGTGACTTTGATAGGAGTGTGCTGCTTAATTTGTTCAAACAGGGTATATAGTT  
AGATTTCTCTATTTGGAAAGATAAAAAGATATTGTATCCAAAAGAACATTTGACTTATCAAA  
ATAAATGTTAATTTCACTAAATAGGTCATTAGATATTGAATGTTTCAACTCTTCAAGACA  
ATAGATCATAGCTATTATATTTTAGGCCCTGAATAAACACAACTTTTAATGTAAATCACA  
TGATTTCTCACCGTTAGAGGTGAACAGCTGTCAGGCCTCAGATATTCTCCTGCCTGCTC  
TGCAAAACTTAGGAGGCTACTTTTGATTGGAATAAAAGTGCACACACTGACTTTTTAAAA  
TGTGGCTTTAATTAATGGTGGGTGGGCAGACTTTTTTCAAGGAGATGCATGATGTCAGTGA  
ATATGAACTTTAATGAGAGTAAATGTATTGAGATAAACATGCGTCTCTAATTTCTTCTT  
GCGGTCAATTAGACCCCCAGTCTCTACTCCCCCTTTGTACTAGCAGAAGGTCTGTGGAATC  
AAAATGAGAACAGCCTGGGCTTGTGTTGAAGGCAGGCCTCCTGAGCTAAGCCTCCAACCTGG  
CTTGGCTCTAAGGCTCTAGAAAAGCCCCACCTCCCAGGGCTGACGGTAACATCAGTCCAC  
TTTTTTCTTCTTCTTGTGCTTTTCAGCATTTCCAAATTTGGCCAATATGAACATCTAC  
TTTTTAACTGGGAGGGGTAGGGGAGAGCAATATATTTTCAATTTTTTTTTAAAAACCATCTAT  
TCTAAGATTGCTCTGTTTAGCTAATGTTAAAAGTCAGAATTCATCACTGCCATTCCATAAC  
GGGCTTAATTTTTCCCAATATTTGAACAATTTATTTATTATAGCAGTTGGTTAGAGCA  
CCCTCATGTGCTCTGTAATGTCATTTTAGATCCTCTGTGCTATATCATTTAATC

| base 11161:A/C

A TAGTTT CAGCAGAATTCATAATGATTTCTTTCTTTTCATGTTTACTTAAATGCTCATCCT

| base 11203:T/G

TGATTGAGTCTAGTTTTCCACCTCCAATTAGGACTATGAATAAGTACTAAAAAGATAAGC

| base 11273:A/G

CTGTCTTGTTCAAAACAAATATCTATCAGGAAGGAAATTCATAGCATCCTTCAGCAGC

TCTGTTTAGGTCTAAAGAAAACCATGCTATAAAAACTTCCAAATTACATTTTAAGATAGTT

TTAGGTAAATTACATGCAAAAGGTCAATATCTGCCATTTATTTCTTTGATGAGCTTGCA

AACAAGCACCTTTTAAATTTGTCCACTCTTCCAGCCTGGGCAACATGATGAAACCCCTGTC

TCTACAGAAAAATATAAAAAATTAGCCAGGTGTGGCAGTTCTACTACCACAGCTATTTCAG

CTACTATTCCAGCTATACTCAAGAGGCTGAGGTGGGAGGATCATGTGAGCCAGGGAGGC

| base 11640:C/T

TGAGGCTGCAGTGAGTCTTGATCACACCACAGCATTCCAGCCTGGGTGACAGCACGAGAC

CCTGTCTCAAAAAAACAACAACAACAACAACAACAACAACAACAAGTTAGTTCACTCTTTC

TTCTAAGATGAAATAATGAAATAATCACAACTTCTTTAAATGTTCCCTAAGGGAATCTGTA

TGAAATAACTCATGTTTCCAGTCTTACTGCCCTTCCATCACCTGAAAGTTTCTATAAG

AGTAGGAATTTCCATAAGAATAAGAGGAATTCATGAAAATACTTTCCCTAAAAGGTGCC

TCTAACTTAAAAATAGAAAAGAACATGGGACTTCAAATCAGATGCACCTTTGTTTTAATC

TTACAATAACCAGTGGCTTTGCTCATTGAATCTCGGTTTTTCTCATGTATGGAAGGGCATT

TTGTGGTGCTACGGGAAGACAAGTGTAAAGGCAGATAGCACAGAACCCTGGCATGTAATAGA

TGCTTAATAAAAAGTTCCCTTTCCCTTTTGTGAAGTTAAGATTATTTGTAACCTCAGGTAACA

GAGCTAGGCAGAAGTCCATCCAGCTGGAATTTATTTTAGGATTCAATCTGATCACTCCA

TCTATCTATAGAGTCACTTCTATTCAGTTAAATACTAATAAAACCAAGCATATAGTAT

| base 12273:C/T

TTTTTAATTGATAAAAATACTGTCAAAATGTTTTATAATTTGATATTTCCAAAACCCCTGTA

GGAATAAAAAATAGTATTCATATTTCTACTTTTTCAGATGAGCAACTGGGCCTGAGAGGGA

TGGAGAGACTAAAGCAGGGTCATAGAATCATGAAGTACTAGATCCTGGGAGTTCACATCC

GCTCCTGTCTCCCATGTGCCCTTGTCTACATTTCCATATTGCTTTTGTGAGAATTTCT

GAGAAAAGAAAACAATATTTCTATATGTACGGGGGAAAAACCAGCAGCTACTACCTTTGGA

AGGTAGTTTACTGATGATTTTTTTTCTTTTGTGTGTGCTTTCACACATTTTCTAAAATGAA

TGTGTATCGGTTTTTTAACGACAAGGAAAAGTGGTTTTTAAGTGTGAAAACCTAACTGCCA

GTCATCGTGAGCACACCCAAACCAATTTAGCCTTCTTTTTTGGAGGATTCGCAGAATTTCA

ACAAACAGCACTGCAACTTTTCAGAGCTCTGTTCTTGTATTTTGGGACTAACTTTGGTTCA

ACAGTTATTTTATTAAGGAATTACTTTGGGAAAGGCATCAGTTTTTGGTACTAAATCAATG

TGAAAAGAATAAAAACAAGCAGCCCTGACCATAAGAACTAAATTTTAGTCAAGGAGA

AAAGAGTAATACAATTGCAAGGCAGGCAATGCTATGTGGTATAATAACATAATCAGCCAC

AGGGCCAGTTAGCTGAGGAGATAATGGTTGTATCATAAAAAGAACTGGGTGTTTGGCTG

GAGATAAAAGATTTCCATGGTTGAGATATGGAAAGCACTTTCCAGGATGAAGGGACTTC

AAGACAAAGACAGATATTTGGAGCAGGAAGTGTATCATAAAGTTGAGGCATACAAGAACT

| base 13188:G/A

TAGGGTGGAGTTCAAGACTGAGATTTAATAGGAACTGAGGCTGAAAATTTGAAATTTGAG

TCCCAGCCAGATCTGGAGAGCCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTTT

| base 13307:T/-

GCTTTGTTACCCAGGCTGGAGTGGGTGGCACAATCTCGGCTCACTAGAGCCTGGACCTC

CTGGGCTCAAGCAATCCTCCACCTCAGTCTCAGTAGCCGGGACTACAGGCACTTGCCAC

CATGCCTGACTAATTTGGGGTGTTCCTATTTGTTTGTGTTTTTTTTGGTAGAGATGAGG

TTTCGCCATGTTGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCCGGGCTCAAGAATCTGCCAACCTGT

CCTCTCAAAGTGCTAGGATTACAGGCCTTGAGCCACGGCACCCAGCCTGGAGAGCTCTCAA | [base\\_13614:G/A](#)  
ATACTGTGCAGAGACATTTGGCTGCCACTGGGAAGGCAAGAGGAAGGCATTGAACAGTGG  
GAGAGAAAAGTTAAATACTTAAGTTTAAATTTTCATGCATTTGTTAATTTCTCTAGAGTCCA  
CTTTGAAAAGAGTGATAGCTATCAAAGTTTGACCCCTTCTGTAATATGCTTGAGTTCATGAC  
TTAAAAAATTAAGTGGGCAAGGTGGCATGCAACTGTAATCCCAGCTACTGGGGAGGCTGA  
GGTGGGAGGATCACTTGAGCTCAGGAGTTTGAGACCAGCTTGGGCAACATAGTGAGATCC  
CATATCAAAAAAATAGATTTACTAGGAAAATTTGTGAGAAAATTTGCCCTCTCTTTGAATT  
TATTTTTTGCCTTAAATATACATATAAGTACTGATATAGAAAAGCTTCTGGGTGTTTATT  
AATATTAATAAATCAGCATATGGCAACTGTTGATATTTACATTTTCAACATGATAGTTAA  
TGTTATTATTGGCTACTTACTTCTGAGGCTCTTAGTTTAGGAGTTCTTGACTGAGGC  
ATTATGGAGGATAAGGCCCTGGCATCAGAAAAGTGGCTCTAATACTTGAGCAAAAACCTTG  
CATAAGTTACCAAACTAGGGTTGCCATATAAAAATAAAATACTTATGCATATACACCAGGT  
GGTAAGCAAGCCTCAGGGGTAGGTACCATTATTATACAGTTTGCATATGAGGAGACTGAG  
GTTTAGCAGGGTGGCCAGAATCAGCAAAATAAATTGAATATATTTGCTCATGAAATCATC  
TGAAATTCAACTTAACTTGGCATCCTGTATTTTCTATGGAGAAGCTCAGAGGGTGAGGG  
GGTCCAAAATTTCTAGTTCCTACTACTATCCAAACAAGCACCACCGAAGATCAGTGCTGC  
AGAGCACTAGGGCTGCCCTGAGCATGGCTACCTGGGCGCTGGGACAGACAAGATACT  
TCTAAGTTCACCTACAGAAAAGTGTTCAAAGTAAACAGAAGTGGATGTTGTACTACATG  
TAAGTAAAATTTTACAACTCAAGCAAATCTAAATTTCTAATAAAGACTTAAAAAATTTTTTT | [base\\_14658:G/A](#)  
TTTTTGGAGACAGGGTCTCACCCGTGCACCCAGGCTGGAGTGTGCGGTAGTGCAATCATG  
ACTCACTGCACAGGGCTCAAGTGATCCTCCCACCTCAGCCTCCCAAGGAGCTCAAACCAC  
AGGCATATGCCACTGTGCTCAACTAATTTTTTTTTTTTTTTTTTATGTTTCATAGAGACAGG  
GTCTTACTATGTTGCCAGGGTGGTCTGAAACTCCTGGGCCCAAGTGATCCTCCTGCCAT  
GGCTCCCAAAGTACTAGGATTACAGGCATGAGCCACTGTGCCTGGCCAAGACTTTAAAA  
AATTGATCCCTTGATGCCACTTAAAAATGAATAATAAATAAACAATAAATGGGTCTGACCTA  
AGAAACTGGGGCATGATGACAAAGAAAATCACACTCTTAGAAAAGTAGGGAATATCAATAG  
GAAAGAAAATGCCAAAGCCATACTGAACTGCAGAGCCACGTTGCTTTCCCTCCTTCA  
TCCTGACCCCTCCCTCAACAATCTTGAGCATCTTTGTGGGGCATAAATTTCACTTAGTAG  
GTATTTGTTTACTTACTGGTCTCCTTAGTTCATAAAAATGAAAAGCATTTTTTAAAAGTTAG  
ATCAGTTCTGCCAGGCTCACTTCTGTCTTGTGGACCCCAAAAATAATATGTGCTTGATAT  
TAGAGATCTTTATTTATCATATGAACCAAAAATAACCAGAAGTCAAGTCCCAAGACAGG  
GAATAACTCTTAACAAAATTTGTTGCAGTTCATGTAAGTTCTATTTGTTAGTGGAATG  
TTTTTTAGACTTGCTCATTAGTCAATAAGAATTATTATATATATGGTTAGTCAACGGTA | [base\\_15537:G/A](#)  
ATGTTCTTGAAATTCACAAAATGTAATTTCCACACCTTATATTTTCTAGCTAAGCCCACCC  
ACAGTCACTGTTTTTAAAGAATGACAGTGTCAAGAAATCACAATGTCTTAAGTTAATAA  
ATGTTTGCATAAGCAAATCAGCTGCACAATTTTTTAATAAATTTTTCTTCTTAGTTCAG  
GTGTGATGTTTTAAAAGGTATGAGTTGGCCCAATTTTCAGTAACTTCTATCTGAGAGATG | [base\\_15773:G/T](#)  
TGGACCTGTCAAAAAGGATTCAATTTGTGAATAAATGTACTTGGCTTCAAGCCAGCAGGTGA  
AAATTAATAATATGTTTTTAATGAGAGTTTCCCTCAGGAAAACCTGATATAGAACCAGAA  
ATATATTAGTGACTTTGTAGAAATATACCAACTAAAAGTGAAGTACTAACCTTCTTCA  
AATGCTCAAGTTTAACTAAAATAATTTAGTGAAAACACAGTATATGGGGACCTAAAATAAA  
TTCTAACTAGGATTTCTAAGACAAGTTGTTAAGTTGGCAAATATTTTACACAGCATACAA  
TGGACTGCCTTCTTCTGATAGGAAGAAAATCAGTATGACATGACACAGGGTTCATAAAC  
TTTGCAAAAATGCAGGTACCTACAAGAAAAAAATTTCTCATGTTCTGCAAAGAAGTTTACA  
AAGACACTGTAAAGGGCTGCTTGGGCTCAGTCTTCAAGAAGAACTGACTTAAGAAAACAAAA  
CTTCTTAGGAGAAGTTGTCTTTATAAAGTGGCAATATAAATTTCTTTTAGACTATAAATTA  
GATACGCAAAACACTAAGTGTAAAAGCTTATAGAACTCACTGAATCCAAGGAACATGAGCC  
CCAGAGACTGGCAAAACCTAATATGAAAAACACCAGCAGAGTGATGTCGACTTTGGTGTG  
AGACAGGCTTGGCTTATATCCTGCCTCCCTGGGTTATCTCACTTACTGCCTGTGAGATCT  
AGGGCAAGCTCCTTACTCCTGGGTGTTTCAATATTTCTTATCTATAAAAATGGGATAATAA  
TAGTATATACCTTACGTGGTAGTGTGGACTAAATAAAAATAGTGAATATAAAGTGTAGC  
ATGGTTGATATATGGTAAGAAATTAAGAATGTGATGCCCTCAGTATTATACTGACACAA  
AGTTAGAGCAGAGAAAATATAAATAGAATTGTTCTAGCCTACACAATGCATGTATTTTCT  
TCTTCAATAGCTCTTTTTTTTAAACAGACTTCTGCGTCTGGTATAGAATGCTAATATCTA | [base\\_16748:T/G](#)  
GAAGTTTGTTTAAAAGAAAAAAGAACACTAAAAAATGGAAGTTTCTTAAATTTTTAAAAT  
TAGAAAATAGCCTCTGCAGGTCAAAGGCTTAAAATGCTCAAAAATAAATAAAAAATGAAGG  
GCCACATAAAAAAATCTGCTAAGATTTTAGCACTGAAGCAGTTATGAGCCTATTGAAGAG  
CTTTTGTGAGAAATAGTTATATATTAAGCTAAAATGGTTTCTATGAAGCTAAACACCAA  
AAGAGTCTGCTGTCTTAGAAGTCATCAAAAACTACTTTTTTTAGCATAGCTATGTCAC  
ATGAACAAGTATTTATGACAGGATGCCACGTAGTAAAACCTTAGATGGGATTAAGGCACA  
TGGGGAGGAGTGGGGACTGATTAAGAATTTGTCTGGCCAGTTGGTGATATTAAGAACCAT | [base\\_17177:C/A](#)

GGGGGCTGGGAGAATTGAGAACAGGAGCATACGAGAAGGCTGAAAATGGAATC**T**TGACAG | base 17274:T/G  
CGACCTGCATTAAGAATCAAAGAAAGGAAGTAGAACAGAGACTTTTCAGGAAAGATT  
CAAGAGACAAAATAGAAACCAGGATGTGACTGTGTCATGGGCTATGGCCTTGAGGTTCTG  
AAGGAAGCTTTTCGGTATCCCACATTAGCAAGAGGCAGCAAGTCATTGTAATTGATTCTTA  
TTCTAATTCTTTCTCTTCCCATTGTAAAAACAGTGCCTGCACATAGTATCAAAGCAACA  
GCTTGAGCAGTGCAGAAAATGTATAAATTGGTACCCTTTTCTCCCCTCACAGTCTTGTCT  
CCTTCCAGAACATTTCAAAGTGCAAAGTCAAGAAATGTGAATGGGACATGTAATGTT  
TCCCCTCTTCTCCCCTTCAATTAATAATGTAGTAATAGAAAAAAGGGTTTAAATT  
GACAATAAGAAGAAATAGTAAAAGAAATGAAAGAGCTAAATGAATTTCTGGAAAATGGAAA  
GCAAATGAATAAATTTAGTACACAAAGAGGATGGAGAAGCCACAGTCTAGAAGAATAA  
AAGCAAATGGGGCAACTGCCAACATGGGAGGGAAGAAGCCCTGAGAATGCCTCAGATATA  
AATAAGCCCTGGAGAGAAAACATAGGCCTGAAAATTTGGGAATAACTGAAAATTCATTGAT  
GGAATAGGGAAACCCCAACCCCTCCCTTCTCCCCTAGAGCAGAAGTCCGCGGAAGTCGGTC  
ATTTAACATCCCAGGCTTTCTGGAGTAAGAGTCTTCAGCATAAGAGCCAGTGTCTGGGT  
GCAGTGGCACCTGTGTGTAGTCCCAACTATTTGGGAGGCTGAGGTAGGAGGATCACTCGA  
GCCAGGAGTTCAAAGCTGTAGTGCCCTATTATGGTGCCTATGAATAGTCACTGCACTCT  
AGCCTGGGCAACACAGCAAGAGCTCATCTCAAAAACATAGTCATTGCCCTGCCAACTCAC  
CAGAAAGCAATATTTTTTGGTCCACAAGCCCCACCTCTACAACCAGAGTTCCATAAATGCC  
TTTTTACTACTTCATTCTTAAATATGAAGAGACTGTCCAAGGATTATCATATATTAGATT  
CAATACAGCAGCGTGAAAGAAAAAGACAAATAAATTCAGGAAAATTACTCCTGCAATTA  
CTGCAGGAGAAAATGCAGTAATTCAGGATAAAAAGAACTTTTTTATAGCCTAATCAGTTT  
CCTCACAGAAAACATAATATTGACACCCACAAAATAAGAACGGAAGCTTTGAAAAGTGACG  
ATTAGAGAAAAAGAAAAGAAATTTGGAAAGAGAAAAGCCAAATAAACCTCTCAGAAAGTACATC  
AAAAAGCCAAAAAGATAAATGTTTAAGGAGGTCCATAAACATCCCCTGCTCTTTTCCACT  
TGAGTTTGAACCAACTGAAAAATGGACAAATGGATGGACTAAAAGTATCAGTTTTGTGA  
TTGAAGAAAATGCTGCCCTAGAGGACGCGGGCTGGAAGCACGGTGTCTCCCGAGCAGTCCA  
ACCTGAGCCAGGAGTTCACCTACCACAGGCTGGCCCTGGAGCCCTGCAGCAAGGG  
AGCCACATGCTAGATGGTAGGAGTGTATCACAACCTCATTTCCACAGGCTACCAGATCCCC  
AAAGAGAAAAGAACCCAGGCACACAAGCCCTGCTCCTTCCCTCTAAACTTACCAGTTGGATG  
AATCACTTATCTTCTTCTGGGTAGACATGAGTAAGGGGGTGGAAAGAGCCAGGACTGTTA  
CTCTGATGGAATTTCTTCTCAAGAAATCGGGAAGAAAGTATTGAAAAGATGAGAGAAAA  
CATAAGTGACATAGAGGACCAATTTCCAAAATTTGGCAACCGGCTAATTAGAATGCCATTA  
AAAAAGAAAAAATGACCAGATGCGGTGGCTCACGCCGTGAATCCCAGCACTTTGGGAGG  
CCAAGGCGGGTGATCATCTGAGGTCAGGAGTTCAAGATCAGCCTGGACAACATGGTGAA  
ACCCCGTCTACTGAAAATACAAAATTAGCTGGGCGTGGTGGCGGATGCCTGTAATCC  
CAGCTAGTTGGGAGGCTGAGGCAGGAGAGTTGTTTGAACCTGGGAGGCGGAGTTGCAGTG  
AGCAGAGACCTCGCCATTGCACTCCAGCCTGGCCAACAAGAGTGAAACTCTGTCTCAAAA  
AAAAAAAAAAAAAAAAAATGTGGAGGAGAGGATTGAAAGGGGCTGCTGAGTGTGAACAAG  
ATTAATGGGGAATAATATTGTGATATTTTCCAGAACCAAGAATAAGGGAATGATTCTGGGA  
GCTTTCATAGGGGAAAAAATACAAAGTAAAGTAAAAATAAGAACAATCCATTTTCAAAG  
AATCCACCAGACTTCCCATATCAGACTTCCCATCTGCAAC**A**TTAGAAGCCAAAAGCCTGT | base 19661:A/T  
GGAGGTACTTTCAAAGTTTAAATCCAGAATTCATACCCAGCCAAGCTATTAATCAA  
GTGTGAAGGCTGACTGAAGACATGTCAGACATGCAAGAATTCAGAAAATGCGTCCACGTT  
AAAGGAGTTATTCAACACTGTACTGCAGCAAAAAGGAGGAATACATCAAAGAGAAAAACA  
TGGCATCTAGGATACAGCGTGTCCAGGCTAGCAGGGCATAACGTTAGGTCTGAGCTGTGG  
AGCCAGTCTGGTTGGCACAAAGAGGACGGAAGACTGTGGCTGCCCCAGTAAATGAGGAG  
AAGTGACGAGCAGGTGGAACAATTTGTGAGGTGGAACCGTGAGGTGATAGCCAATGCAAC  
TGGTAGCAAAATAGAACGAGAAAAACCCCAACTTCACTTTAAAGAACATCCTTCATTGATAC  
AAAGGTTTGTGATCTTGGATCAGAGATAATGAACTGCAATCCTGGCACAG**T**TTCTTGGCTG | base 20151:T/A  
TGCAGTTAATAATATATGTAGATGTTTATTGTTTTTAAATTTTGAATCAAATTTACT  
TATAGTTACAGAACAGAGGCTCT**C**GACTTTAGTCACTCATTTCTTTTATCATCAAATAAA | base 20244:C/T  
ATGTCTCCAGTCCCTCCATCAGCGGCTGTGCATGGGAAACCACCTCCCACCCCAACCAA  
GCTCCTTGCCAGTGCCTCTGAAGACCCAGGGGAGTATCCTGCCGCTATAGCCTGTTG  
CTCTGGTGTGGCCACTTATCCATTGATCCATTGGTATTTGGCTTGGACACTGGCCACCA  
CCCATCTTTCATTCCCCTCAAAGCAGCACTAGCAGAGATTGTCACTGGTGACACATTTTC  
CTTGAGATTCTGATGTCTTGGAGGCATAGGGTAGGAAACAATCTCTAATTGAATAACGAT  
TTCCCCGTTCTTAGAAAATGTAATGCCAGCTTCTGCCGAGGAATTTCTCACCGCTGTAAC  
CCTCCATAGGCCCCAGACTCCCGCCACGGTGCAGGGGTTTCTCACCTTCTCCTCTGCATC  
CCTGGGTCTGGATGATTTCTGAACCCCTGACTGCATATTAGAATCAATCAACTGAGGAACCA  
CAAGTACCTTCAAGGCCCAGGCCTCAGTCCACCCTAGGTTCTAATTT**C**CCCAGTCTGGG | base 20809:G/A  
GAGAGGCTGGAAATGATCCCAGGTGATTTTAAATATGTAGCCAGGAGTGACACCTACTGA

CCTGCCCTCTCCAGTTGCCAGGAAGAAAGCCTCAAATTCCTGTTATTTTACTATGTGGAG  
TAATTTACACCTTTTTGTTTTCCCTCTCTTCAAGACCATGAAATCCCTCAAACGTAGC  
CAGATTGTAAGAAACATTTTTCCCTTTTTCCGCCAGCTATACACACATATGCAGGCCTT  
TAAAAACTGGATCATACCACATATATGTTCTACATTTTGCTTTTATCGCTTGACTTTCT  
TTCCTGCCTGTAAGACTGACCTACTTCATTGTTTCAGAGACCACATAATATCCATTATTA  
AGCATATACCCTAATTTGCTTAGCCATTTTCCCTACTGATGTCATTTGGGTTTTTCCTCAT  
ATTTTGCTGTTACTAATATGCAATAGCTGCATGAAGATCCATGTGGGTGTGTATCCTTC  
CAAGCTTGTGCAGATGTTTCCAGAGTGAATCACCAGGTCAAGGATACGTACATTTAACA  
TTTTTGACAGTATTGCAAAAAACACTCTTCATTTAAATGATGGATCGCTATACTCCCCAC  
CAATGGTTTGTAAAGCATCTTCCCTGGACTGTTACTAACACCAAACATTATCAGTC  
TTTTTACTATTTTACTATATTTTTATTTCTTCAAGTTAAAAAAATTGACATTTTTTACAATT | [base 21511:C/A](#)  
TTTTGCTAGGCAAAAAAGGTGTATTATTTTCAGTTTGCATTTCTCCAGTTACTAATGAAGTC  
GAACACCTTTTTGTCTTTTTGTTAGTACTTTGTATTTCTTCTGTGAATTGTTCTAATAAAT | [base 21652:C/T](#)  
TTTTAATGATTAGTTTGGAAAGATGTAATGTAATCCCCATTATTTCTCTCTACCTCTT  
CTTCTCTCTGCCCATTTATAACAGGTATGTAATATTTTAAAGTCAATTTCTTGATTATTC  
AAAAGAATGGAGGGGGTTGGGCACAGTGGCTCACACCTGTAATCCTAGCACTTTGGGAGG | [base 21829:C/T](#)  
CTGAGGCAGATGGATCACCTGAGGACCAGCTGACCAACATGGAGAAACCCCGTCTCTAC  
TAAAAATACAAAAAAATAGCAAGGCGTGCTGGCATGCACCTGTAATCCCAGCTACTCAGG | [base 21929:G/A](#)  
AGGCTGAGGCAGGAGAATCGCTTGAACCTGGGAGGTGGAGGTGGCAGTGAGCCGAGATCA  
CACCATTGCACTCCAGCCTGGGTGACAAGAGCAAGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAA  
AAAAAAAAAAGATGGAGGGAAACAGAATGCATAATTCAAAATCACAATTCAAATCATAATTC  
AAAAATCACAATGTGATTTATAGTAGAATTTTAAAGTGTGTTTTTCAGAAATAGCACACATCT  
GAGATTCACATCTTTGTTCTACCTTTAAATAGCTGGGTGACCAGGGATTTTCTTTCTCTC  
GCAGAGCGCAGGTTTTTCATAAGCATAGAATGGGAACGATAACTTACTTTGCCTGACGGTG  
ATAATTAGATAATATGTGTAACCACCTGGTGTGGAGCCTGGCACATAGTTAAGCACTCA  
CTCAATACATGGTTGTTATTTGTTATCATGTTATAACATTTGAATACTGGAGTTGCTCTAA  
ACTAGGAATCCCTCATTTGTAAGTTTCTTGCCCTCATATCCTTACTCTCACCTCAGTTACTC  
TTGAAAACAGGCTGCCCTCAGCTTACATCCCCCTTCTCTCTGCCTCTCTGATTGAGTACAGT  
TTTTGTCCACTTCAAGGTTAAGGGTTTGAATTTCAAGTCTGCAAACCCAGTACATAGAAGA  
GATGAAGGTAGCCCCAAACTGCAATTTGAGCACTGAACATGCTGTGCGTTAACAGTGGGTG  
CTGGAGAAGTGAGCAAGCCCAATACTAGAGATGCTGTCTCAATTTCTCCAGGTTAATT | [base 22688:C/T](#)  
GTCAGATAAAGCCTGTCATTAATCCACAACCAAGAAGTGACCATGGTACCTGTTGAAATA | [base 22708:G/C](#)  
CTTTCTGTACAAGTAACAGATCCCAAAGGCACTAAAAAAAGGAGGAAAGTTTACTAACT | [base 22841:A/-](#)  
TGGATCACAAAAAGCTGGCGGTAGGGCAGGTCCAAAGTGGGCTCATCGAGCAGCTCAAC | [base 22875:T/C](#)  
AGCATCCCAGAACCAGATCTTCACATCTGTCAAGTGTGCCTGCAGCTTGCTGCCTGTC  
GGCATTGCTGCCCTCAGGTTGCAGAGAGGCTGCTGCAGAAACCAGCATCTAGAGACAGAG  
ACAAGGTATTTCTTCTTATGTGACTCTTTTATTTTATTATATGTTATTTTTTGAGACAAGG  
TCTCACTCTGTCAACCAGGCTGGAGTACAGTGATGCAATCATAGCTCACTGCAGCCTCAA  
ACACCAGACTCAAGCGATCCTCCCACCTCAGCCTCCTGAGTAGCTGAGACCATAGGCACG  
TGCCACCACCTCCGGCTAGTTTTTTCTTTTTTTGTAGAAACAGGGTCTCACTGTGATGCC  
CAGGCTGTTCTTGAACCTTGGGATCAAGTGATCCTTTTGCCTCAGCCTCCCAAAGTGCT  
GGGATTACAGGCATAAGCCACCGTGCACCCACCTCACGTGTCCTTTTTAAAGAGTGAAGA  
AACATGGCCAGGTACGATGGCTCACGCTGTAATCCCAACACTTTGGGAGGCTGAGGCAG  
GTGGATCAAAAAGTCAAGAGATCAAGACCATCCTGGCCAACATGGTGAACCCCATCTCT  
ACTAAAAATACAAAACTTAGCCAGGCGTGGTGACCCGCGCCTGTAGTCCCAGCTATTTCCG  
GAGGTGAGGCAGTAGAATCGCTTGAACCAGGGAGGCATAGGTTGCAGTGAGCTGAGATC  
GCGCCACTGCACTCCACCCTGGCAACAGAGCAAGACACAGTCTCAAAAACACAATAAATA  
AATAAAAAATAAAGAGTGAAGAAACTTTTTTTTTTACAAGACTCCTAAGAGATTTCTCCTA  
TCATAGGATTGGCCAAAACCTGAATCAGCACATGCTCCAAGCTGGAAAAAAGTTAGTGCCA  
AGACAGTGAATTAATACTAGCGATTTAGACTACTCTGGGGTGCAGAAGTCATTTGTAACA  
CAAGGCTGCCCAACAAGCTGAACAAAACTGTTAGCAAGGAAGGGAGGAGTTGCACAGAT | [base 23896:T/C](#)  
GATCCTGTCACCACCACATGTTTTTTTTAAGGATTTATAATGTTATTTTTAAGATCCAATT  
TTAAATTAATATGCAATTTCTCAATTAATTTGTATAAAAAATATCAGTTTTGAAGTTTATG  
ATCTGGAAATTAATACTAGAAAGGGAGGGCAGACCAGATGCATTGGCTCACACCTATAA  
TCCCTCACCATTTTGGGAGGCTGAGATGGGAAGATTACCTGAACCTCAAGACTTAGGGACC  
AGCCTCAGCAACACAGTGAGACCCCATCTCTACAAAATATTTTTTAAAATTAGCTGGGC  
ATGGTGGCATGCACCTGTAGTCTTAGCTATGCAGGAGCCTGAGGCAGGAGGATCGCTTGA  
GCCCAGGAGCTTCAAGGCCGAGTGAGCTACAGTACACCCTCCACTCCAGCCTGGGCAG | [base 24309:G/C](#)  
CAGGGTGAGATTTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAGAAAGAAAGAAAGAGAGGAGGAGC  
AGTAATATTTCTGTCTTTTTAAAGCTAGGGATATTACTTTATGATTAATAACCTAGAT  
TTAAAAAGAAATAAATTTGGAAGAAATGAGCATTATTTAATTCCTAAGTACTTGATGTG

GAGTGAGTTTTGTGTGGTGTCTCCAAGATCTTAGGAGGGACAGCTCCTGGACAGGTGAG  
AGCCACATGGGGAAGAGTGGTGGAGCCAGATGGCACTCCCAGGGTTGTGTCTGTGGCAG  
AGGCCTGCCATCCAGGCCATCCTGTGAGCTTCCCTACCAAACACTCATAATATAAAGATGG  
GGGTGGGGCACATGGGGCAGTGTAATTCGGAAGAGGAATTTCAATCTAAGACATCCTTTA  
AAGATGCCCAGGTCCCTGTAAC TGGGAGAGCCAAGCTAAGCACATGCTTCCCTGCTCACTT  
CTCCATCCTTGCCCTCCAGGGGTGGCTCGTGTGCTGAGGAGGATAAAATTTCAAATGTAGTGG  
GTACCCCATCCACAACGGAGGTGGGGGTAAAGTGGGAAAAACACCTAGTGCCAAGGCCCG  
ACCTGGGGAGAGTGGGAGTGAATTTCTTATTACTGAGCTTGGGCAAGTCACCTGCCTTCCC  
CATCCTGGTTCCTCATCTATAAAATGGGAAGAGCAGTAGATCAAAGTTGTTGTGAGGAC  
CAGGAGTGCTAAATAATCTTCACTTGTAGTGAGCAAAGGAGAAAAATGGGCCAGGGCAGGA  
TAACTCTCACC AAAATTGCTTTGGGGAAAGTGTGCTGCTGCTGGCTCATGAAAACAAAGCA  
GAAGCTTCCCTGGAAGTTTCAGGCCACCTGTCCCCTCTCCTCTCCACAGGCCCTCGCACC  
CACAGAAAAAGGGTCTCTATATTGGGAGCCAGCCGAGATGAGCTTGTCCCAGTTTCCCTT  
GCTTCTGTCTAAGAAAAGATCAAAGCAAACCCACCCCTGTCTAAGCTGAATCTCCCC  
AAGTTACTGTGACCTCAGGGTCACTAACTGACTTTGCAGTACAGCCTGGCTCTGTCTTT  
TCCTGGCTGTGTAAC TTTGGGTGAGTGTCCACCTCTCTCAGCCTTGCTTCTCGGTCTAT  
CTGCAAAAATAAATACAGTAGCATAGAATTGCTATAGTACAATTACCCTGATTGGTTTTATT  
GCAGGATTCGGACTTAGCAGTTATTTTGTAAATTTAATTTGCATAATACATACATTTTTTA  
TATTATTTTATTTTAACTGGACAGCATTAATTGGATAGTATACATTTTTTAATATAATAA  
AGCTCTATTTATTTAGAAAATAATCAATCCCTCACTCTTCTAAGTGGCCACATGCCCTG  
TTAAATTGTGAGGTTTCTGTTATACTGATAGCCAGTGGGGTACACAGTTAGGTGCTATCC  
CTCCCCTCTCCACCCACTGCCCTGCTGCTGCAGTCAAGGCAGGTGGCTAATGTGGCTA  
ACAAGTGACAAGCAATGCTTCAACATTTCCCAGTCACTTGCCCCAGGATCCAGCATCCTG  
AGAATCACTTCTGGATTGCTGGGAGGTAAGGAGAGTTGGAGCATGTGTCACCTGCTCGAA  
CCTCACTGAACTTGCCCTGTCTTTTTTCGGCAG**GCTGTAAAGCGGTTCTTGAACAAGAG**  
**TGCAAGTGCCACGGGGTGAGCGGCTCATGTACTCTCAGGACATGCTGGCTGGCCATGGCC**  
**GACTTCAGGAAAAACGGCGGATTATCTCTGGAGGAAGTACAATGGGGCCATCCAGGTGGTC**  
**ATGAACCAGGATGGCACAGGTTTCACTGTGGCTAACGAGAGGTTTAAGAAGCCAACGAAA**  
**AATGACCTCGTGATTTTTGAGAATTTCCAGACTACTGTATCAGGGACCGAGAGGCAGGT**  
AAGTTCAAAAAGACTTTCTTTATAGTACCTAATTTCTTTCAACAATTGATACTCCACAATTT  
AAATGAGGTTCTGTATTTTCAGCCTGCTCTCTTTAGGTTCAAAGCTCACGATCCTTATCA  
TTCTTATTGAAACTGTACAGGGC**GGGCGCGGTGGCTCATGCCGTGTAATCCCAGCACTTT**  
GGGAGGCCGAAAATGGGCAGATTGCTTGTGAGCTCAGGAGTTCAAGAAAAGCCTGGGCAACTC  
CATCTCTACCAAAAATGCAAAAAATTAGCTGGGCATGGTGGTGCGCATCTGTGGTCCAGC  
TACTCAGGAGGCTGAGGTGCACTCCAGCCTGGGTGACAGAGTGAACCTCATCTCAAAAAA  
AGAATAAAGAAAAGAAAAGAACTGCACAGAGAGCTCTCCTAAGCAACTGGAGAAATGGA  
TTGACAGTGCACAGATTCTGGAGAAAATGAAACCCACAATGTCCAGGGCAAAAAGTCAA  
GATACGCAGATTAGCAAAATTTCTCAGCCTGGGCAGATTTCTAGTTAGTGGACTATGCAC  
ACTAGGGAGAGCAGCCAGCATCTTTTCACTGTGATCCTGAAGCTGAGAGCAGGATACATTA  
AATCCCACCACTGTGACTATGGAAAAATGGTCCCAGGGCTTTAAATTTAGACTCTTCTGAA  
ATCTGCCCTACTTCACCTTCCCTGCTCTTTTCAATATGCTTAGAAAATGGCAAAGATAAA  
AAGCAAGAATGTATCCCCTCTCTTGGCTATAGGTGGGCAGTGTATAATAAAGGCTGTG  
TCAGAGGCCCTTCATTTATTAAGCCACACCATTTCCCTTCCAGATGGTACCTTCTCCATC  
CCTCAAAGAACAGCTCTGTGAGCTCAACACCGCAGCTGTCCACCTATCAGGTTTACAC  
ATGTTCAATGCTCTACCTCACTCCTCTTGATCAACCCCTGAGCTCCAGGTTTAGCTCATT  
CTTTGTAAAGATTCTAGTGCAAAAATAAGAATGAGTACAAGTCTAAATTCATAGGAGGTGA  
TGGGAGTCCACAGCCCAAGTCAATTTCTAAGACTTGGTAGAAAAGCAAAGGAATTCATTAT  
CAGAAAAAAAAT**TCCTCTTAGAGTCTGATTTTTTTTTTTATTTCAAATAAATGCAGAGGCA**  
CCAATAAAATGGTATGGATGGCAGCCAGCTGTGAGTTAGATTGACCAAGAGGCAAAGTTA  
CCAGGGAATGTACAAAGGAAGCCAAAGCCTTTTTTTTGGCCCTGAGTGGTTGAATTGCCTT  
CATGGTTTTGATGAGCTAGTTCTCCGCAGCATTTGAGCAGGTTGCTACATGCAGCCAGGG  
ATTAATGACAACGGAGCAGAGGACCAGATGCTGTGCCCGCTGCATTCCTGACATGCTTT  
GGGACCTCTAACAAGTCACTTACCTGTGAGCCAAAGTTATAGCCAAATCACCATGAAA  
CCTGTGCTTGATACAGGATTGTCCCAGGGGTCTGACCCCTCTACCAGTCACTAGCTG  
TTTAACCTCAGCCTCCTCACACTGAGCATGGAGATGCTGCTGTCTTGATCATTTAAGTCC  
TATGCATTGACTCCTGTGCACTGGGTACTGGGCTGAGATCATTGCACACATGGTCTTATT  
TTATCCTTACAGTAGGATCCTTACAGCAGCCCTATGACAGCAATACATTGAAACTTGTTA  
CTAACCAGAAAAAATGAATAAGAGGTGGCTCCTAGATGATCAACACCAACCAAGAACCA  
CGTTCACATCTTACTTTTTAAGTCAGATAAGCAACCCCTAGATATCACCTTCTCCATTGTA  
CAGATAAGAAAAGTGAATGACCTGCTCACGATCTCACCGGTAGGAGAGGGTGGATGTCTG  
ATCCCTTGGCCTGTGCTTTGACCCATTAGACAGTTGCTCCTGCCCTGCCCTCAAGGACACA

| base 25924:A/G

| base 26424:T/C

| base 27372:A/-



GAAATAGAAAAGCTGGCCAGGGGCAGTGGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTCTGGGAGGC  
CGAGGAGGGCGGCTCACCTGAGTTTGGGAGTTCGAGACCAGCCTGACCAACATGAACAAA | [base 31915:A/G](#)  
CCCCATCTCTACTAAAAATACAAAATTAGCCAGGCGTGGTGGTGCATGCCTGTAATCCCA  
GCTACTCGGGAGGCTGAGTCAGGAGAATTGCTTGAACCTGGGAGGTGGAGGTGTGGTGA  
GCCGAGATCACACCATTGCACTCCAGCCTGGGCAGCAAGAGTAAAACCTCTGTCTCAAAA  
AAAAGAGAAAAAGAAATAGTAAGCTTAAAAACCAATTAAGGAAGATATTATTATGGCAAGA  
ACAACAGCAAAAAGACATTTTCTCTAGTCTTCAACTGAAGAAAGTGAAGTCTGAGGTT  
CAACTATAATTACTCGCCCCATGCAGCTCAGATCTGAAGAGTACGTACAACCGTGTGATG  
TTGTGCATGTGACATTTTGCAGGCCAAATGGAGGCTAGATCTTGAAGCTGGACTGTCT  
GGGATGAGTATCCTGGTGGCTCTATAGTTACTACTCTGGTTACTGCTCCAGGCATCTGT  
AAATCAAAGAAGCCCTTAAGGTACAGATAGGTTTCATCTCTAACTGAGGAATGCTGCTGCT  
CTCCCCCAGAGAAATGCGTCTGCACCTAATCACAGGCCACTTTCCTAGTTATGATGTA  
AAAAACCTGACCTGGGCCAGAGGTCACCTGAGGTCTCCTCTCCAACCTGCAGGAAACAAG  
CCACACTCCACCTCTTCTCCAGTCAAGTTCAAAAAACAAACGGAGCTCAGTCATTTGTTTA  
ATTTGTTGCCGCGAAAAACCCAAAAGCCTGGTTGACAACCTCAGGCTGTGAATGGTGTGA  
AGCACCGAGGTATCACATTTTCCCCACATAAAATCATATTTGGCAAACAGAACTCAGAA  
CCCATGGGTACACAATCCCAATCATGGTTTTTCAGAGACTGGTGTCTCTCATGCCAGTG  
GTGTGGCCTACTTTGCAGAAGCTCATGAATGCCGGGATTGTGTCCACCAGCTGATTAAA | [base 32845:A/G](#)  
AACAAGGGAACATGTTTTTAATGATTAAACATGATTAAAAATATGTCAGCCAATAGCAAT  
GGGTGGATCTTACTTAGATACTAATATGTGAAGTTCCTAACCTGTACACCTTAAGTCCCTC | [base 32982:T/C](#)  
ATTTCTTCATTGCACAAAATATTGATTGAGATCCTCCTATGTGCCAGACACTCTTATAATC | [base 33049:A/G](#)  
ACTGGGAACGCAGGATTGAGGAAAACAGACTCAGTCCCTTATCCTCGTGGTGTGATCGACT  
TCATGGTCCCTGAAAGCAGTAGCCAGGCACTGGGACACAGTCTAGGTGCTGGAGAACCCTC  
ACACTGGGGCAGGAAAAGTGGTGGTGTTTAGGTTTCAGTCCCTTGTGTCATTGCTCTGTTAT  
AAGGTCTTATCTTATATATGTCATTTTGACAAGGTAAAGAATAAGTTATTCATCTCCTTC  
TGCTTTGACACTTATAGAAAATTCATGGATTGATATCTAAAAGGTGCTAAGATAGCTAGAC  
CAGAAGAGAAATTAGAAAAAAATGTTTCACTGAGGCTTATAAGTCAACATTTTTCATGGG  
TAGTATTGATTATACTTAGAATTAGTAGTAATTACTATCCATTGAGCCTTCTTTTCAA  
ACTCTTTAGTGGCATATAGTATAAATTAGCCTTTCCCTCCTTCCCAAAACAGTCTTATTTT  
CTTGACTTTATAACTACACTCCTCTGCTTTTCCCTCCTGCTCCAATAACTAGTCTTTTCTG  
ATTTTCAGTTGCTAGTTTCTCCTTCTCCAAATTTTGAAGATCTTCCAGGCTGTCTGAACTC  
TCTTTGCTCTCTCTGTACTTTCTCCCTGGTTTGGTCTCTCCATTCCTATGGTTTTTAAA  
TGCTGTCCCTGTCTTGTCTGCCTTCTGTACCATCATCCTGTATCCAATTCCTGTCTTGA  
CAGCTTCAACCAGATTTTATACAATTATATCAACCTGCTTCTGCTTAAAACCTGGACTCCT  
TATTTGCCCTGTCCCTGAAACTTGTTTTCCCCAGCCCTCCTCATCTCAGAAAATGGTA  
CTGCCTGCCACCCACTTCCATGGTCAAGCATAAACCTGCGAGTCATTCCTTACACTCCTT  
CCTTGTCACTCCATCATCCCGGGTACCCTGGGACCTCTTAAATGTGTCAAGGACCTAT  
CTGCTTCTCCATCCTTACTACCAACCCCTAGGTCCAAACAGAGCTATGTTCTTTTGGCA  
TAGCATGTGCCACAGTGTGTATAGCGAATTTGTATAAACATGTGTTTGTGACCTGCCTGT  
ACCAATGGAGTCCACTGAGGATCCTGTGACGGCAGGAACGTATCTGCCTTGTCTACTAG  
TTCCCAACTCCTAGTACACAAACATGTGTTGAAGTGAATTTGAATGGCAAATTTAAAAAA  
AACATAAAACAGTTTTCATTAGATTAGCTGCATTTCTCTGTGTGTTAGCGCTGCTTCATAG  
CTTAAAGATAACTTGGTTCCTTTGAAGGGGATTACTAGGCACATCTCCACCCAGCACTGC  
TTAGCTTTTAACTCACAGCTATGAAAATTTCCATTTAAGCTTAAAGTGTTCATGGAATT  
TTTTCTCATATTCAGGCGCATTCATGAGGCATTTATGGAGTTTTCAGATGTTGCTTGCCTG  
GCTATTTCCCTGGAGATAAAAAAGTCTCAAGTGGGCCGGGCGCAGTGGCTCACGCCGTAA  
TACTAGCACTTTGGGAGGCCGAGGCAGGAGGATCATGAGGTCAGGAGATCAGACCATCC | [base 34611:A/G](#)  
TGGCTAACACGGGGAAACCCCGTCTCTACTAAAAATACAAAAAAATTAGCCGGGCGTTGT  
GGTGGGCGCCTGTAGTCCAGCTACTCAGGAGGCTGACAGGAGAATAGCGTGAACCTGGG  
AGGCAGAGCTTGCACTGAGCCGAGATTGTGCCACTGAACCTCAGCCTGAGCAACAGAGCA  
AGACTCTGTCTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAGTCTAACGTGAACCTAATGCATC | [base 34829:A/-](#)  
AGCAGACTATATCTATCGCTTTTAACTGGCAGCAGAGACTCAGTTCCTTTTACTCTTGGAG | [base 34879:C/T](#)  
GGGCATTTTCACTCACTACTATCAGTTGGCCTCCCTGAGTAGTTCCTAATTTCTCATATTA | [base 34947:T/G](#)  
ACAGCAAAAATACTTTTACATCCAATGCTCTTTGATGTTGTAGGCAGAATCTATAAATC  
TGTGTTATTTTTAAAAATACAACTTAGTAGAATTACTATATTTTTTAGGATACACTAAAAT  
GTGCCTTAATTTGAATTGACAGTGGTAATCATTGAATTGTGAATCTGAAAAAAGGAT | [base 35132:G/T](#)  
TTTTTTTTCTAAAAAAAAGATACTTTTTCAGGAAAAAATGTTTTATTTTCTTATTTCTAAT  
TCTTTGACATAGTTTGAACCTACTGACAAATACCTTACCAATAGATGCCCTTTTATCTTT  
GTATTTTGGAAAATAGAACTACTCATTTTCAATTTACCAATTAATGTGTTGCAACAAAA  
GGATGACGTTAAAAACTTTAAAAATAACAAATTTGCTTACTTTCATTTAAGCTTTCCCAT  
GACACCTATTTTGTACTGGTAAATATCTTTTTTAAAGATATGCAAATTTTCATATTATTAG

GGAAAGAGCCCTGTGTGATCTATAAGGAGACTTTGGTGTACAGATTGCTGCATATCACT  
ATTTCTCCAATTGGACTAATGGGCAAATTAACCTTCTCTGGGTCTCTTAAGAAATGGCTGT | [base\\_35573:A/C](#)  
TTCATCTAGCAATTTCTAAGGTTCCTTTGATTACAGTAAGTGAATGAATTAATTATTAAGT  
TTAATTAAGTTTTCGCAATAACAGAACCTTAAATTTGATACCACAACTTTCTTAAGTTGTCA  
TTTTTAATTTCTATCATTTAAAAATGTGCCACGTTTTTTGGTATGTGTTTTCCATATACCA  
AGCAAGATCATTTTAAACAAGCCAAAGGTTTAGCTGGTCTGCTGCCACCATGGTGCCTGAA | [base\\_35778:A/G](#)  
GACTGGGTGACCAGTCCCTGGAGAAAATGTGCCCTCATCAGGCAAAGGAAAGCTGATCTT  
AATTTTTTTTTTCTTTTCCCTGAGACGGAGTCTTGCTCTGTACCTAGGCTGGAGTACA  
ATGGCCCAATCTCAGCTCACTGCAACCTCTGCCCTTCTGGGTTCAAACGATTTCTCCGCT  
CAGCTCCCAGTAGTGGGATTACAGGTGTCCACCACCATGGCCAGCTAATTTTTTGTAT  
TTTTAGTAGAGATGGGGTTTTACCATGTTGGCCAGGCTGGTCTTGAACCTCTGACCTCAA  
GTGATCTGCCACCTTGACCTCCCAAAGTGTGATATTACAAGCATGAGCCACCACACCC  
AGCCTTGATCTAAAATTTTTAAGACACTATTTTTAATGTAATATTTAATAAATCAGCACAT  
ATGTGTTGACCACACAGTATATAGAAGAAAGCATAAGAAGAAAGCATAAGACCCAACCCC  
TGTCCTGGGGAGACAAGATGCATGAAAAAATGATCAAATATTTCCAAACAGTGCATGAA  
CCCTGTGGCGTGATGTGCATTACAGGCCAATGAAGGAGGTTAGCTGGGCTTGACAGCCG  
AAAGTGCTGTATAGAAAATGCTGAAGTAGGCTGAATCTGGAAGGATGGGAAGACTTCTG  
ATGGAAGGAGTTACAGGAAAGCCAAATGCAGCAGATGAGAGTAACTTTTTGTTTTTTGT  
TTGTTTTGAGACAGTCTCGCTCTGTCGCCCAGGCTGGAGTAGAGTGGCACGACCTTGGCT | [base\\_36584:G/A](#)  
CACTGCAACCTCCACCTCCTGGGTTCAAGCGATTCTCCTGCCCTCAGCCTCCTGAGTAGCT  
GGGACTACAGGCACGCCACCATGCCCAGCTAATTTTTGTATTTTTAATAGGGACAGGGTC | [base\\_36684:C/T](#)  
TCACCATGTTGGCCAAGATGGTCTCGATCTCATGAACTTGTGATCCGCCTGCCCTGGCCT | [base\\_36752:A/G](#)  
CCCAAAGTGCTGGGATTACAGGTGTGAGCCACCGTGCCCGGCCGAGAGTAACCTTTATGA  
GGAAACAGTCTACATGACTGTGACATCAGAAAAGTCACCTCAGTGGGACAGTGAAGAGATA  
CCCTGGTTAGCAGGTATAGGTGGACTACAGTGGGAAATAGCTTTGAGTAGGCTATGTAGT  
GCCAGATTTGAAAGCCTCACAGAGTCTGACCAGAACAACTTAATTTCCATTACAAGATT  
TGCTAATTTAATGGGACATGCTTTCTGTGCCAGTCAAACTTTTCCAACTTACGAAAACA  
CTGAATAAAAATCATCTGAGATAAGTGAAGATATGTCTTTTCCCTATGTAGCTTAAGCTGTG | [base\\_37119:-/](#)  
CAGTCCAAATGTGAGGAAGGGGTGAGCCTGACCAGTGGATGAATGTGCGGTCTCTAACAT  
TTGCTCTTTAACATACTTTAGTTCCCTCAATAAATCTGTGTCTTAATGACAACATGTAA  
GACAACCAGAGGAGAAAACAGCCTATTGGATGACAGGCTTAAGTGAATCTTGCTTTATGCC | [base\\_37312:G/C](#)  
CTAATAGTCAACATATGGGCCTCTGTCTATCCTAGAGTGGCAGGAATTTCCAGACACAGGT  
CTATCCAGAGAGAGGGGATGGGGGGAGAAGGAGGTGAGGAGGAGAGGGAGAGATAGAGAC  
AGAGAGAGAATAGGGAGAGAAGGGCGGGGAGAGAGAGAGAAAAGAGAGATTGAGAGAGGAG  
GGACCCCTTCTCCGGGTCCAGAGGTATGGGTCTGGAACTATTAGCAAAAACCCCTCT  
GTTCCCTCCTCTGCTGTGACAGATGCATGTTAGTGGAGACAGAAATGTTTTTACTGAGG  
GAACCCCTGACTCCATTATTAATTTTTATAGCTCTAGAAAATGGGATGCTCAATTTCCATCAAG  
TTCCCTCGGCATTGCTCCACCAAAAGTGTACATGGTCCCAAACCTTATGTGATTTAGAAA  
CTCCAATTTCTTTGTCCTTTTTTTTTAATCTTATGCATTTGTGAGCTCTTGTGCGAGTCAGG  
ATGACAACACATATGGGCAAGCAAAAAGTCCATCTGGCTGGAAGCAGCTCCTTCCCACAG  
CACAGACATTTGCCAAAACCTTAACGACTTTGCCCTGGATCTTATAGACACTGGGTTTAGGAC  
GATGATCTACAATTTGTTGGTATAAAGATGACAAGAAGTTTCGAGTCTGCAACCTTCTG  
TGCTGGGAGTTGGGCTCTGGACTCAGGCAGGCCACACATCCTGGGAATACTTCACAAAT  
ATAAAGCAAAAAGGAAGTCAGGGAAAAATGAATTTCCAACCTTGTCACTTTCTCTTAGTGA  
ACTATGTAATCAAACTGCAATAAGAAAATAACATATAAACCACATGAATGATTTTGTGA  
GAACAAAACATGTTAAATGTGAAGCATCCAAATATATGTTTATCCTTTTTAAAGTATCAATT  
TGGGAGACTCTAATGATAGGACCGGTAATTGAAACTATTTTTTAAAATGTCTCTTCTGGAG | [base\\_38246:T/C](#)  
TATTTTTTAAAGAGCCAGCTACACTTGTTTTGTAGATACAGTGTAGTACAAATATTTGTCCCT  
ATTTAAAGATCAAGATGGCTGTGGAAAATGGCTCAGAGAATCTTCAAATGAAGTATGAAGAG | [base\\_38342:T/A](#)  
TTAGGTAGATGATCAGACTGAGTAATTTATTTCTTGTGATGAGATACAAATGATGCTATTG  
GCTTCTCTGAACCAGAAAGTCTGCTAGAGAGGGCTCAATGTCTCAGCATTTGGCCACA | [base\\_38478:G/A](#)  
TCAGTGACATATTTAAAACACCTTGAGGGCACACATAATTTGGAGACATGCATCCTGGCA  
TTACAAAACAAATTTATCTCATTTCTCTTAAAGGTTACAGGCATCCAGTAGGAATATCAGT  
ATAGGAAAAATGCAGCATGAGCAACTGACACCATGTTAACCCAGTCTTTTTTTTTCAGTTTC  
TTACATAACTTTATGTGTTGTAATTTGTCTACAGCATATCATGAGCTGAAGAAAAGGCC  
TCTCCCCAAAAGTTACATGTGAGGATCTTTGCACGTTACTCATTGATAAAAAGAATTAG  
AAGAGAGTACGGGAAAAGACGCTGCTGCACTGGTACATAATGTTATAAAGCAGGCTGCTT  
TCTGGTGCCTGGCCGGGCACAGGACTGGGCACTCGGCAAAGGGTCAGAATGTACGACT  
GTCAAGAGCTTGAGCTCTACAGTCAGGCAAGCCTGCTTGCAAATCTTGTCTTGGCCACA  
GCTGCCTGTGTGATCTTTGGCAAGTTACTTAATCTTCCCTGAATCTCCATTTCTCATTT  
CAAAATGGTGATAATAATAGTACCTTCCCTTATAAGCTTATGAGAATTAATTTAGACAATG

CAGGCAAAATGCTTAGCATGGGGCCTAGCTCACATAAGTGTCCATAAAATATTGGCTCCA  
GTTGTGAACAGAAAAGAAAAGAGAGTAAAAGAAGATAGAGGGAAAGGAAGAAAGAA  
GAAGAAGGAATGGGAAAAAAGTGAAGAAAGGATGAATGAAC'TTTCAC'TCCATTAGCTT  
GGAAAAATGTGAAAACTCACCC'TTATGGGATTAAGGCTGATAGATGTAGCTGGG'TTGTCT  
CCCCAGTGGT'TCCTGTTGTGGCCCAAGCAAGGGTGAAGTACTCAGTTAACAAGTTTGTAT  
ATTATTTGAGAAAAACATCTAAAAGTATGTGTCCCAAAGATTTAGAACTAAACAAATAG  
GCAGTTGGTAAAAGTCAAGTGGCTCCTTTTTCATTTAAAACACACACACATACACACATACTC  
TTGGTCTTATATTTTATTGGAAACATAATGGTGATGCTTTTCTGTTTTGGAAAGACCAAT  
GGAACAGTATGGCCCTACTGCTATTGATAATAATGAGTCTTTATTGTAATTCATTAAGGG  
GAAAGTAATGCCAGCGATTTTGTATAGATTCTGCAC'TCTGGAAATGTTCTTTTTCAGGGTT  
TCTATGAAATGGCTGTATGTCTGCTAAAATGACAGCAAGTGTCAAAC'TGCCCTTCTGC  
CCTACAGCCTGTCAATTAGATCTAATTAGATCCAAACCCCAAACAGGGCCAATTTGTCA  
CCATCACTAGGCAGCCTCATCCTCCCTTCCAGCTGCAGGGACTGCCCTTTCCCGCCAGT  
TGGCCCATTCCTTGGTGGCCCGATGCCCTCATGGGGGCCCCTCACAGCTCCAGGCTGCGAC  
CTCACTGCTGTTCTCTCATCAGTGGCTCTCAATCCTCAAAAACCCCTCTCTCATTTTCCAT  
CTTCTGGGCCCTCATTATGCCGTTTGGGCAGCCGGTGGAGAGTGGCATGTTTCAGATTGTG  
TTTTCCAGCATT'TATAACTGAACATTGAAC'TACTGAGACATATTGCCAGAGGCTTTGTT  
CCCTTACTGAAACCACTTCTGAGTTAAGCTTTTGTCAATGGTCATAGCTTTGTCTGCTC  
CTCTCTCTGAGTTCTGATGGTGTGAGGTCACTACACTGAGCAATCCTTCTGTTTCAGACA  
GTCTGGTTCAGTTTCTGCACTCGGGGGACAAAAGACACCATGACCATTACAGAAGGCTG  
AGTCAGACCACAAGCTCAAACCTTCTTAGGCTGGAAGCCACTCAGGAAAGAAAGACTACC  
AAGTTAGATTTCAAGTGAAGGCCAACAGTCTGAGTCAGGAACGAGACACTTCACCTCCTT  
ATCCTGGCCCCCTTAAGCCCAAAGCCCTACGGCAGATAAAGAATTCATATGCATGGTACG  
GTATTTCCATTTTGTATAAATACAGATCAGTAGAAGGGAAGAATGTTTACTGCTGCTCAGC  
GCATGTGAACAATAACAAAAAGTAAAAATTAAGAGTCACTTCTGGGATACCAAGTGAGA  
GCAC'TTTCACACCCACTGGGGGTCTCATTCACACCCGTGGCTTTCAGTTACCACCACATG  
ACAAAAGATTTCTAAACCTGAGTCTTATGCCACCTCTCTCCTGAGTCCAGAGAGTAT  
TTTCAGCAAACATTTCTACCTGAATGCCCCACAGTACAGCAAAC'TCAACCTGTTGAAAA  
CTGAATTCATTATCTTTTCTTAAGCTGACCCCTAACCAAGTGTCCCCCATGTCCAGGGAA  
TTAACAGCACCAACAGTCACTCAGGCCAGAACCTGAGAAACCTTGACTTTTTCTCATCCTC  
CCCCAGTCTCCACTCAGTCAACATGTCCCACAGGTCTTGCCTCCTCACCTTCTCTTGA  
CTAGTAACCGCTCCAGTTCACACTACCCTGTCTTAATCCAGGCCACTCATGTCTGCCC  
AGAGTCTGTATTGGTCTCTAACTTGTCTTCTTGTCCCTCACTCCAGCCCCCTCCACTTCAT  
TCCAGCCCCACACCCCTGGAGATCCTTCTGAAACACAAATGAGAACATGTTGCCCTTTTG  
TGTGAAGGCCCTTAATAGCATCTGTTGCCCTCAAGGTCAAGTTGAAACCCCTTGACCAT  
TCCCAGTGCAGCTTCCCTCACCCTCCAGCCTCATCTCCTGACACTCTCCCTTTGAGT  
ACTGTATAACCAGCCACAGGGAACACTTTCCTGCTCCTCACACGTTGCAGAGCTTTGCTCA  
TTTTCTGGCCTTGGCAGATGCCACCAATGCTTTTCTCCTTCTCTTCCCTCCTCCTTCT  
TTTTCTTTCTCTCCTCCTCCCCCTCCTCCTTCTCCTCCTCCTCTTTCTCCTCCTTCT  
CTCTTCTCCTCCTCCTTCTGCTTCTCCTCCTCCTTCTCCTTCTTCCCTTCTCCTCCTCCTCCT  
TTTTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT  
AATGCAGAAGAGTGCCACATTCATGTGTACAGCACAAATGAATTTTTCACAAATGGACAC  
ACCCACATGACCTGTGCCAGATAAAAAACCTGAAGGGGCCAGTATTCAGAGGCATGT  
CTCATGCTCTTTTCTCTATTTCCCAAGGAAAATCACCTCCTTTTAAATAGCAATGACTAG  
TTTTTCCCATT'TTGTACTTTAGGTACATGAAAACCTAATCTGAAATGAAAACCTTGTGC  
AGATATCTACTGTGCAAAAACATACCCTGGAAAATGTAATGGCCTAAAATAACTTTAAA  
GTCCCACCCTTGCTTTTATCACCCTCTTGGCCCTACTCTCTTTTCATCCTCTTCATCACC  
AAGCCTCTTGAAAACTTTACCTACACTCACTGTCCCCATGTCTCCTCCTCCTCCTCCTCCT  
ATCTATGTCACTCACTGAAACTGCTCTCATCGAGGGCGCCAGTTACCTCCTTGGTGTGCA  
GCCAAATTAACCTTTTTTTTAGTCTTTTCTTACTTGACACTCCCTCTACTCCTTAATTCAA  
TGAGTCATCAAGTCTAGTGGTTCACCCCTTTCAGCCAATCATGTATTTGTTCTGCTTGT  
TTCTTACGCAATATCTCTTGTCTGAAGTATTCACAGCCCTCCTCCTGCCCCTAAGCT  
GCTCTTCCAGACTTACCTTCGCGACCTAGTTTTTCAGAATTAAGGTCTAGACAGGTCCAC  
CACCCACCTTGTAAATAAAAAATAAATGTGGCATGGCATAAAGACCC'TTAGGCCAGGCG  
TGTGAGTCACGCCTGTAATCCAGCAC'TTGGTGGGGGTCAAAGCAGGAGGATCGCTTGA  
GCCCAGGAGTTTGTAGACCAGCCTGGGCAACATGGCAAGACCC'TGTCTCCACAGAAGATAC  
AAAAATTAGCTGGATGGGGTGGTGTGTGCCCTGTAGTCCCAGCCACTTGAGAGGCTGAGAT  
GGGAGAATTCCTTGTAGCCAGGAGGTCGAGGCTCTAGTGAGCCATGTTTCGTGCCACTGCC  
CTCAAGCCTGGGTGACAGAGTGAGACCCGTCTCAAACAACAATAACAACAACAACA  
GACCCTTAACCTGTTGCTCCAGCCTCCCTTTCTATGCTCATTGTCCCTAATAAGCCTCCC  
TGAATCAGCAGTCTGTTGTGAAC'TTGCCCTCAGAATTTCTGCCAGAAGGTTCTATCTTGC

| base 41474:CT

| base 41627:T/A

| base 41925:C/G

| base 42714:G/C

CCAGGTTGCTGTTTACCCCATTTCTTTACCTGCAAATCTTCTAGTCATCCCTTTACACCTAT  
CTCTAATGCTACCTCCTCTGTAAAACGTGTCAGTTGATGGATCTATTTGCTACTATTAAT  
ACCAAGAAATATCACTATTATAATATGCTTGGCTCATGCCCTTAGAACATAAGCTCCTGA  
GGGCAGGATCTTCATTTTTTTCTCTGATATATCCCATGTTCCAGAAGCTGTGCCTAGCA | base 42974:A/G  
CATAGTAGTCACTCAATAAACACTTGCTAGATGAAGATATGGATAGTTAACATTTATTTGA | base 42980:T/G  
GCACTTATTTTATGCCAGGCACTTTCATGCACATATCTCATTATGTTCTCACCAAAGCTC  
TATGATGAAAGAAGCTATTTTTATTCCAGTTTTGCACAGGAGGAAACTGAAGCTTAACAAG  
TTAAGTAACTTGCCCAAGGCCACACAGTTGATACATGGCAAATCTGGGATTTGAACGCT | base 43227:A/G  
GATTGTCCAAGCTCTAAATAACCTCATTTGACTGTCTTTGAGCTCTGTTTGTGGTGC  
TTTTGCACATGACTGTACTGTGGTTACAGTAGGTCCTTAGCAAATCAAACAACCCAAAGT | base 43336:A/G  
AGTGGAAAGTATCTCTTTACATATTTAACTCTGCGCCATATAGAGGGTTCACTGAGAATAG  
GAACTTGGTCCATTTTATTTTATTTCTCCCTTGTGCCCAAGCCCAAGCAGCTGGCACAG  
TGCTTTACATATGTTTATGTTCACTAAAATGTTTACTGAATGAAATAATGGGTGTGCTGTG  
AAGAGGCAGCATTTGGCAGTGAGTCCCTTCTGCATAATCAGTAAATTTTGAGGACTGTCC  
TGATGGCTGCCTGGAATCCAAGCTGAGCTGCTGCCCTTCTAACCCCATGCTTCTTCAGC  
ACGATGCAGGCTCGGAGCCATCCCTGGCTGACCCACCCCTCACCCCTGACCCCGGCCTTTT  
GCCATCCTTCTGTCTCATGAAGTTCCCGGCCAGTCTTCTGCTCTCCGCCGCCAATC  
ATTCTGACCAAACGCTGCCCAACCTCTCCTCTTCTTGACCCCGTGCCTGCTTGAACCT  
TGCTGCTTCCCTGGTCACTCCCGAACAGGCAGGGCAACATGACATTTCTGTAGATAATTCC  
AACACAGAGCGGACTGTGATAAACAGAGACAGTCCAGGGCATCGTCCAGAGATATCAA | base 43966:C/T  
AAGGAAGACATTCCTAGTTAAATGATGGAGAAACTGAAAATGAATTAAGTCACTGTCTTT  
TTCATCCTGATATAAGTCGTTTTGTTTTGTTTTTAAATAAGAGTTTAGCTTCTCTAGGT  
TTATCAATTAGGTGGGATGTTGATAGCAAGCAATAGAAACTGGGACAGTTTAAGCCACA  
AGGGGAAGCTTCTTATAAGGATACAGAGTCTCTAGGAACTCAAACGTTTCAATGCAGTCA  
GGCCTCAGGGAGAAATGGAAGCAGAACCCAGAAAATAGTCCAGGATCTGGGCAGCATTTCT  
TCCATGCTTGTCTTCACTGTCACTGTATATTTGCTTCAATTTCTGTTTTTCTGTGGACC  
TCCTCGAGTCCACAGACTCACCAATCAACAGAGAATTTACCTGATTGGCCAGCACAA | base 44386:A/C  
GTGATCATCTGTGTCAAAAATCAAAAATCAACAGAGAATTTACCTGATTGGCCAGCACAA | base 44388:C/A  
GTCAGTTGATTGCCCTGGTCCAATCATTTGTTTACCAGTGAGCAGGGTGATGTTATACAA  
CATGGCTGCCAGGTGCCCATCTCTGTGGGGGAGGAAGTAGAAAGGATCATGGTAAGCCCA  
GCATACTCTCCCAAAAATGTCTACAATGCTTTGTTCTGTTGTCTGATAATGTGCTTATAAA  
AGAATTTCTGAGTGCGTCCCAAGAATAGAGTAAATGAATAAAAAGGCTTTCTAGCTTTAAA  
ATTATTTTTTCAGAAACAAATACTTAAATATGGATTGCCATTTAGCAAACATCACCCCTGAT  
TAACTAAGACAATATTCATTTGGTAATTCCTGGCAGATTTTCTATGCCAATTTTGTTTAT  
TGAAGGCCCTTGAATCCTGGCTTCGCCCTGGGACCTCACACACATCTATATGCTCTGCTAGA  
CTGCAGCAGGAGAGACAGTTAATATGATAAACCTGGTGGGGCCTTTCTCCTTCCCTCAGGG  
TCTCACACAAATGATGCCATGTCTCCTTCCAGAACCAGAGTTCTATTCCTTTCTCAT  
AAGCCAGTGTAATCAGGTCTATGGAGATAAAAATTCCTCCTTTGAGGGCTCCATGCCCT | base 45033:T/C  
GACAAAATTTGAAGAGAGCTAACCTTGGTCACTGCTTCCCTTAATGTGGTTTTGAGGTAGGGA | base 45113:G/-  
GAAGGAGCCAGGATGGATCCTTCTTTTATTCCTGATCTGGCTCTGCTCGATCAAGGATCCT | base 45152:T/G  
TAAATTCAGGCTGGGTAAGGATAATCTGAAAAGTCGATCCAACCTCAGAAGTGGGAGAGC  
TGGATTCAAGGTGTCCAAGGAAATCCAAAGTTTCATGTTACCTTTTTGGGACTCGGCC  
TCTCAGCACCCTGCACTCTCTGCAGCTGGCATAATGGGATTTGCACACATGGCATGGGC  
CCACAGAACGAGTATAACAGCCCCAGGCTGTAGGAAGAGAGGGTCAGGGCTCTGTCTGG  
AGGATGGACTCGTGACTCCTCCTCTGGAGGCATATTTGGATTCCACCCAGACCTTTTCAG  
TAAACTCCCTGGCTTGTCTTCCAGGCTCCCTGGGTACAGCAGGCCGTGTGTCAACCTG | base 45533:G/T  
ACTTCCCAGGGCATGGACAGCTGTGAAGTCAATGTGCTGTGGGAGAGGCACGACACCTCC  
CATGTACCCCGGATGACCAAGTGTGGGTGTAAGTTCCACTGGTGTGCGCCGTGCGCTGT  
CAGGACTGCCTGGAAGCTCTGGATGTGCACACATGCAAGGCCCCCAAGAACGCTGACTGG  
ACAACCCTACATGACCCAGCAGGCGTCACCATCCACCTTCCCTTCTACAAGGACTCCA  
TTGGATCTGCAAGAACACTGGACCTTTGGGTTCTTTCTGGGGGGATATTTCCCTAAGGCAT | base 45859:G/A  
GTGGCCTTTATCTCAACGCAAGCCCCCTCTTCTCCTTGGGGGCCCCAGGATGGGGGGGC | base 45884:C/T  
CACACGCTGCACCTAAAGCTTACCCTATTTCTATCCATCTCCTGGTGTCTGCAGTCATCT | base 45905:C/T  
CCCCCTCTGGCGAGTTCTCTTTGGAAATAGCATGACAGGCTGTTTCCAGCCGGGAGGGTGGT  
GGGCCAGACCCTGTCTCCACCCACCTTGACGTTTTCTTTCTTTCTAGAGCAGTTGGCCAA  
GCAGAAAAAAGTGTCTCAAAGGAGCTTTCTCAATGTCTTCCACAAAATGGTCCCAATT  
AAGAAAATTCATACTTCTCTCAGATGGGAACAGTAAAGAAAGCAGAATCAACTGCCCTG  
ACTTAACTTTAACTTTTGAAGAACCAAGACTTTTGTCTGATCAAGTGGTTTTTACAGCTA  
CCACCCCTAGGGGTAATTTGGTAATTACCTGGAGAAGAATGGCTTTCAATACCCTTTTAA  
TTTTAAAATGTGTATTTTTCAAGGCATTTATTTGCCATATTTAAAATCTGATGTAACAAGGTG  
GGGACGTGTGCTCTTGGTACTATGGTGTGTTGTATCTTTGTAAGAGCAAAGCCTCAGA

AAGGGATTGCTTTGCATTACTGTCCCTTGATATAAAAAATCTTTAGGGAATGAGAGTTC  
CTTCTCACTTAGAATC**C**GAAGGGAATTA AAAAGAAGATGAATGGTCTGGCAATATTCGT | *base 46517:C/T*  
AACTATTGGGTGAATATGGTGGAAAATAATTTAGTGGATGGAATATCAGAAGTATATCTG  
TACAGATCAAGAAAAAAGGGAGAAATAAAATTCCTATCTCATATTATGCATGTGACCCAT  
GGAATCTCATAACTGAAAGACTTGAAGGATGAAAATTTTGGGGATACAAGATTGGTGAAC  
TAAAATGCTGACAGAGAGGTTTCCAGAGCTAACTCGTGCCCTGGGGCGGCCTTACAATAAG  
CAGATGCCTGAAAGAAGTCGGCCAC**G**TCCGCCGTCTGCTAATGCCCATCACCCCTCAAGC | *base 46826:G/A*  
CCAGTTTAAAGACCTGTCATATTTAATTGTATTTATTTGATGCTTACAAGATGATGTGAT  
ACTGTAGCCTAAAGCAAATGACACATAGCATTGCTTATAAAGTTGGTAACCCTGCTATAT  
TATATTGCAACAAAATCGTAACTTGGAGACTATGTTTAAGGGACTCAACTGTAATTATGG  
GAGCATCAGTATGCAAAATAGTGGTTGGCTTCTGCCATCAGCCAAAAGATGACATTCAGGG  
AAAAATGGAGAGGCTGCCTGCACCGTTTTTTTTATGTTAAATGAAAGAAAGGTGAAATAGCT  
ACTTCTCGTCTTCTTGAAAAATTTGGTTCTTATTCTGTATATGACTTCCTTACAGTGCTA  
CATTAACAGGATATTTCAATTACATGCATCTGGTATCAAATTA

Sequenz aus: [www.ensembl.org](http://www.ensembl.org)

## **DANKSAGUNG**

Insbesondere möchte ich meinem Doktorvater und Betreuer Herrn Prof. Dr. med. Paul-Martin Holterhus für die Überlassung des Themas dieser Arbeit, die Unterstützung und die intensive Betreuung ganz herzlich danken. Mir wurde mit seiner Hilfe ein interessanter und weitgreifender Einblick in die wissenschaftliche Arbeit ermöglicht.

Ich bedanke mich bei allen Mitarbeitern der molekularendokrinologischen Forschergruppe der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität Schleswig-Holstein, Campus Lübeck für die herzliche Aufnahme und die allzeit vorhandene Hilfsbereitschaft.

Ganz besonders gilt mein Dank Frau Claudia Havel, die mich mit viel Geduld und Hilfestellung in die zahlreichen Methoden der Molekulargenetik eingearbeitet hat und mir bei allen Fragen stets zur Verfügung stand.

Für die Hilfe bei der Auswertung und Veröffentlichung der gefundenen Polymorphismen und die Klärung verschiedenster Fragen danke ich Herrn Dr. Ralf Werner.

Dem Institut für Zellbiochemie und klinische Neurobiologie der Universitätsklinik Hamburg-Eppendorf danke ich für die Weiterverarbeitung der DNA-Proben für die Sequenzierung.

Mein besonderer Dank gilt meinen Eltern und Geschwistern, die mich immer in jeder Situation unterstützt haben, und Julius, der in den letzten Jahren stets an meiner Seite war.

## **LEBENS LAUF**

### **Persönliche Angaben**

---

Name: Leonie Kunow, geb. Franke  
Geburtstag: 03. Juli 1980  
Geburtsort: Hamburg  
Wohnort: Engelsgrube 53  
23552 Lübeck  
Tel: 0451-8131867  
E-Mail: leonie.franke@gmx.de

### **Schulbildung**

---

1986 –1990 Deutsche Schule London, Grundschule  
1990 –1994 Deutsche Schule Brüssel, Grundschule und Gymnasium  
1994 –1996 Deutsche Schule Lissabon, Gymnasium  
1996 –1999 Gymnasium Rissen / Hamburg  
1999 Abitur, Gymnasium Rissen / Hamburg

### **Studium**

---

Seit 1999 Medizinstudium an der Universität zu Lübeck  
2001 Physikum (ärztliche Vorprüfung)  
2002 1. Staatsexamen (erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung)  
2005 2. Staatsexamen (zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung)  
2006 3. Staatsexamen (dritter Abschnitt der ärztlichen Prüfung)  
2005-2006 Praktisches Jahr Klinikum Neustadt (Innere Medizin)  
Ninewells Hospital, Schottland (Innere Med.)  
Tygerberg Hospital, Südafrika (Chirurgie)  
Westküstenklinikum Heide (Pädiatrie)  
Medizinische Universität Lübeck (Pädiatrie)

### **Berufliche Tätigkeit**

---

Seit 11 / 2006 Tätigkeit als Assistenzärztin der Pädiatrie  
in der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin  
der Sana Klinik Eutin (Chefarzt Dr. med. Jochen Reese)

### **Promotion**

---

2003-2007 an der Klinik für Kinder- und Jugendmedizin der Universität zu Lübeck,  
klinische Forschergruppe Intersex unter der Projektleitung von Prof. Dr. med. Paul-  
Martin Holterhus (Sprecher: Prof. Dr. med. Olaf Hiort);

Promotionsthema: Molekulargenetische Untersuchungen zur Rolle des WNT2  
Gens bei der menschlichen Geschlechtsentwicklung

## **EIGENE VERÖFFENTLICHUNGEN**

- 2005 Eintrag der beiden identifizierten SNPs in die SNP-Datenbank (dbSNP, [www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP))
- 2007 Poster: Franke L, Werner R, Richter-Unruh A, Schwab KO, Hiort O und Holterhus PM. Potential roles of Wingless-type-MMTV integration site family, member 2 (WNT2) in human male external genital development. 51. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie, März 2007.