

Aus dem Interfakultären Institut für Genetik und Funktionelle Genomforschung der
Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald, Abteilung für Humangenetik.

Institut der Humangenetik der Universitätsmedizin Greifswald

Direktorin: Univ.-Prof. Dr. med. Ute Felbor

Thema:

**Keine molekulargenetische Evidenz für eine Assoziation von
FAM222B mit zerebralen kavernösen Malformationen**

Inaugural - Dissertation

zur

Erlangung des akademischen Grades eines

Doktors der Medizin
(Dr. med.)

der

Universitätsmedizin

der

Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2016

vorgelegt von:
Christin Paperlein
geboren am 30.11.1990
in Schwedt/Oder

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Max P. Baur

1. Gutachter: Frau Prof. Dr. U. Felbor

2. Gutachter: Herr Prof. Dr. Ch. Hübner

Ort, Raum: Universitätsklinik Greifswald, F.023

Tag der Disputation: 03.04.2017

Widmung

Für meinen Papa

Inhaltsverzeichnis

Inhaltsverzeichnis	iv
Abbildungsverzeichnis	vi
Tabellenverzeichnis	vii
Abkürzungsverzeichnis	ix
1. Einleitung und Zielsetzung.....	1
1.1 Definition, Symptomatik und histologische Charakteristika von CCMs....	1
1.2 Formalgenetischer Hintergrund.....	1
1.3 Kandidatengensuche und Identifizierung von <i>CCM1</i>, <i>CCM2</i> und <i>CCM3</i>... 	3
1.4 Proteindomänen, Interaktionspartner und Funktion der CCM-Proteine....	5
1.5 Knudson'sche Zwei-Treffer-Hypothese.....	10
1.6 Diagnostik der CCMs	11
1.6.1 Magnetresonanztomographie.....	11
1.6.2 Molekulargenetische Stufendiagnostik.....	12
1.7 Klinische Manifestation ohne Mutation in <i>CCM1</i>, <i>2</i> oder <i>3</i>.....	12
1.8 Inhalt und Zielsetzung der Arbeit.....	12
2. Material und Methoden	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Geräte	15
2.1.2 Verbrauchsmaterialien	16
2.1.3 Chemikalien	16
2.1.4 Puffer.....	17
2.1.5 Oligonukleotide	18
2.1.6 DNA-Proben.....	22
2.2 Methoden	22
2.2.1 DNA-Präparation	22
2.2.2 Primerdesign	23
2.2.3 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion; polymerase chain reaction).....	23
2.2.4 Gelelektrophorese.....	25

2.2.5 SANGER-Sequenzierung.....	25
2.2.6 Real-time quantitative PCR	27
2.2.6.1 Etablierung der qPCR	31
2.2.7 Gendatenbanken und Auswerteprogramme.....	32
3. Ergebnisse	35
3.1 Validierung der familiären 2-Basenpaar-Deletion c.1651_1652delAG; p.R552Kfs*10 in <i>FAM222B</i>.....	35
3.2 Patientenkollektiv zur Verifizierung von <i>FAM222B</i>	36
3.3 SANGER-Sequenzierung und Beurteilung von drei Varianten im kodierenden Bereich und Intron 2 von <i>FAM222B</i>.....	37
3.4 SANGER-Sequenzierung der 3'-UTR von <i>FAM222B</i> und des downstream gelegenen Bereichs.....	45
3.5 Quantitative PCR zur Detektion größerer Deletionen innerhalb von <i>FAM222B</i>.....	48
3.6 Segregationsanalyse der homozygoten SNPs innerhalb der Familie von Indexpatient 21	51
4. Diskussion	53
Datenbankrecherchen und Auswerteprogramme.....	53
Möglicher Einfluss der genetischen Veränderungen auf die Proteinbildung ...	56
Diskussion der genetischen Konstellation der Indexfamilie des Patienten 21 ..	59
Weitere mögliche Ursachen für Mutationsnegativität in der Indexfamilie 21 ...	61
Weitere allgemeine mögliche Ursachen für Mutationsnegativität	63
<i>FAM222B</i> – ein fragliches Kandidatengen für zerebrale kavernöse Malformationen	67
5. Zusammenfassung.....	69
Literaturverzeichnis	70
Eidesstattliche Erklärung	79
Lebenslauf	80
Danksagung.....	81

Abbildungsverzeichnis

Abb. 1-1: Häufigkeiten von pathogenen Mutationen in <i>CCM1</i> , <i>CCM2</i> und <i>CCM3</i> gemäß Spiegler et al. 2014	2
Abb. 1-2: Proteindomänen der CCM-Proteine	6
Abb. 1-3: Rap1A als Interaktionspartner von <i>CCM1</i>	8
Abb. 1-4: Interaktionspartner ICAP1 α (a) und Bildung von Zell-Zell-Kontakten(b) .	9
Abb. 1-5: Inhibition von RhoA durch die CCM-Proteine	10
Abb. 1-6: Genomische Organisation von <i>FAM222B</i>	13
Abb. 2-1: FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)	27
Abb. 2-2: Darstellung der Funktionsweise der Hydrolyse-Sonden.....	28
Abb. 2-3: Ablauf der qPCR im LightCycler in drei Schritten.....	30
Abb. 3-1: Familienstammbaum und 2-Basenpaar-Deletion in <i>FAM222B</i>	36
Abb. 3-2: Lokalisation der drei gefundenen Veränderungen in <i>FAM222B</i> : c.82+62C>T, c.542C>T; p.P181L, c.1413T>C; p.L471L	38
Abb. 3-3: Chromatogramme des homozygoten SNPs c.82+62C>T	39
Abb. 3-4: Chromatogramme der heterozygoten Variante c.542C>T; p.P181L	40
Abb. 3-5: Chromatogramme des homozygoten SNPs c.1413T>C; p.L471L	42
Abb. 3-6: Sequenzierter Bereich (3'-UTR und downstream-Bereich) von <i>FAM222B</i>	46
Abb. 3-7: Chromatogramme der heterozygoten Variante c.*1700G>A.....	47
Abb. 3-8: Chromatogramme der heterozygoten Variante c.*64_*67delGTAA	47
Abb. 3-9: Chromatogramme des SNPs c.*2290+60_*2290+62dupACA	48
Abb. 3-10: Lage der Amplikons bei der quantitativen PCR für <i>FAM222B</i>	49
Abb. 3-11: Darstellung der Ergebnisse für den up (grün)- und downstream-Bereich (rot).....	50
Abb. 3-12: Darstellung der Ergebnisse für den upstream-Bereich.....	51
Abb. 3-13: Stammbaum der Familie des Indexpatienten 21 und Darstellung der Haplotypen	52
Abb. 4-1: Konservierung der cDNA von <i>FAM222B</i>	58

Tabellenverzeichnis

Tabelle 2-1: PCR-Primer zur Amplifikation von <i>FAM222B</i> mittels Standard-PCR.....	19
Tabelle 2-2: Primer zur SANGER-Sequenzierung von <i>FAM222B</i>	21
Tabelle 2-3: Verwendete Primer für die real-time-quantitative PCR von Exon 3 von <i>FAM222B</i>	21
Tabelle 2-4: Standardreaktionsansatz für die PCR.....	24
Tabelle 2-5: Ablauf der PCR.....	24
Tabelle 2-6: Standardansatz für die Aufreinigung des PCR-Produktes bei der Sequenzierung	25
Tabelle 2-7: Mastermixansatz für die Markierungsreaktion bei der SANGER-Sequenzierung	26
Tabelle 2-8: Ablauf der Markierungsreaktion bei der SANGER-Sequenzierung..	26
Tabelle 2-9: Beispiel einer Wellbesetzung zur Durchführung der qPCR	30
Tabelle 2-10: Standardreaktionsansatz für die qPCR.....	31
Tabelle 3-1: Übersicht über die 27 mutationsnegativen Indexpatienten	37
Tabelle 3-2: Genotyp (GT) und Minor Allele Frequency (MAF) von rs9900141 (c.82+62C>T)	40
Tabelle 3-3: Allelhäufigkeit von rs200961802 (c.542C>T; p.P181L) in der ExAC-Datenbank.....	41
Tabelle 3-4: Allelhäufigkeit und Genotypverteilung von c.1413T>C; p.L471L in der ExAC-Datenbank.....	43
Tabelle 3-5: Vergleich Genotypverteilung und MAF zwischen Datenbanken und Patienten	44
Tabelle 3-6: Detektierte Veränderungen in <i>FAM222B</i> nach SANGER-Sequenzierung	45
Tabelle 3-7: Detektierte Varianten in der 3'-UTR und im downstream-Bereich nach SANGER-Sequenzierung	46
Tabelle 3-8: Ergebnis der qPCR beim Indexpatienten 21 und Angehörigen	49
Tabelle 3-9: Ergebnis der qPCR bei homozygoten Indexpatienten	50
Tabelle 3-10: Ergebnis der Segregationsanalyse der SNPs.....	52

Tabelle 4-1: Vergleich der MAF zwischen Datenbanken und Indexpatienten..... **54**

Tabelle 4-2: Übersicht zur Prädiktion der verwendeten Auswerteprogramme..... **56**

Formel 2-1: Formel zur Berechnung der normalisierten Ratio..... **29**

Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
AF6/afadin	<u>A</u> ctin- <u>F</u> ilament Bindeprotein
AS	<u>A</u> minosäure
BAC	<u>b</u> acterial <u>a</u> rtificial <u>c</u> hromosomes
CCM	<u>C</u> erebrale <u>C</u> avernous <u>M</u> alformation
CDC42	<u>c</u> ell <u>d</u> ivision <u>c</u> ontrol protein <u>42</u> homolog
CNV	<u>c</u> opy <u>n</u> umber <u>v</u> ariation
<i>C17Orf63</i>	<u>C</u> hromosome <u>17</u> <u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame <u>63</u>
DMSO	<u>D</u> imethylsulfoxid
DNA	<u>D</u> esoxyribon <u>k</u> leinsäure/ <u>D</u> eoxyribon <u>u</u> cleic <u>a</u> cid
dNTP	<u>D</u> esoxyn <u>k</u> leotid <u>t</u> riphosphat
EDTA	<u>E</u> thylendiamin <u>t</u> etra <u>a</u> acetat
ESP	<u>E</u> xome <u>S</u> equencing <u>P</u> roject
EST	<u>e</u> xpressed <u>s</u> equencing <u>t</u> ag
ExAC	<u>E</u> xome <u>A</u> ggregation <u>C</u> onsortium
FA	<u>F</u> amilien <u>a</u> mnese
<i>FAM222B</i>	<u>F</u> amily With Sequence Similarity <u>222</u> , Member <u>B</u>
FAT	<u>f</u> ocal <u>a</u> dhesion <u>t</u> argeting
FERM	<u>f</u> our-point-one, <u>E</u> zrin, <u>R</u> adixin, <u>M</u> oesin
GCK3	<u>g</u> erminal <u>c</u> entre <u>k</u> inase <u>3</u>
GRCh37	<u>G</u> enome <u>R</u> eference <u>C</u> onsortium <u>h</u> uman genome <u>37</u>
GVM	<u>G</u> lom <u>u</u> venous <u>M</u> alformations
HEG1	<u>h</u> earth of <u>g</u> lass <u>1</u>
hg19	<u>h</u> uman reference <u>g</u> enome <u>19</u>
HR	<u>h</u> omologe <u>R</u> ekombination
HUVEC	<u>h</u> uman <u>u</u> mbilical <u>v</u> ein <u>e</u> ndothelial <u>c</u> ells

ICAP1 α	<u>i</u> ntegrin <u>c</u> ytoplasmatic <u>a</u> daptor <u>p</u> rotein
KM	Kontrastmittel
KRIT1	<u>K</u> REV- <u>I</u> nteraction- <u>T</u> rapped-1
LOH	<u>L</u> oss- <u>o</u> f- <u>H</u> eterozygosity
MAF	<u>m</u> inor <u>a</u> llele <u>f</u> requency
MAPK	<u>m</u> itogen <u>a</u> ktivier <u>e</u> te <u>P</u> rotei <u>n</u> kinase
MRT	<u>M</u> agnetresonanz <u>t</u> omographie
MLPA	<u>m</u> ultiplex <u>l</u> igation-dependent <u>p</u> robe <u>a</u> mplification
NCBI	<u>N</u> ational <u>C</u> enter for <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation
NGS	<u>N</u> ext <u>G</u> eneration <u>S</u> equencing
NHEJ	<u>n</u> icht- <u>h</u> omologe <u>E</u> ndverknüpfung
NLS	<u>n</u> ukleäres <u>L</u> okalisati <u>o</u> nss <u>i</u> gnal
NMD	<u>n</u> onsense- <u>m</u> ediated mRNA <u>d</u> ecay
NpxY	Asparagin-Prolin-x-Tyrosin
PAC	<u>P</u> 1 derived <u>a</u> rtificial <u>c</u> hromosomes
PCR	<u>p</u> olymerase <u>c</u> hain <u>r</u> eaction
PDCD10	<u>P</u> rogrammed <u>C</u> ell <u>D</u> eath <u>P</u> rotein 10
PolyPhen-2	<u>P</u> olymorphism <u>P</u> henotyping-v <u>2</u>
PTB	<u>P</u> hosphotyrosin- <u>B</u> indedomäne
qPCR	real-time <u>q</u> uantitative <u>P</u> CR
Rac1	<u>R</u> as-related <u>C</u> 3 botulinum toxin substrate <u>1</u>
Rap1A	<u>R</u> as-related protein <u>1A</u>
SIFT	<u>s</u> orting <u>i</u> ntolerant <u>f</u> rom <u>t</u> olerant
Smurf1	<u>s</u> mad <u>u</u> biquitin <u>r</u> egulatory <u>f</u> actor <u>1</u>
SNP	<u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>p</u> olymorphism
SNV	<u>s</u> ingle <u>n</u> ucleotide <u>v</u> ariation
SSCP	<u>s</u> ingle <u>s</u> trand <u>c</u> onformation <u>p</u> olymorphism

STK	<u>S</u> erin/ <u>T</u> hreonin <u>K</u> inase
STR	<u>s</u> hort <u>t</u> andem <u>r</u> epeat
STRP	<u>s</u> hort <u>t</u> andem <u>r</u> epeat <u>p</u> olymorphism
TALE	<u>t</u> ranscription <u>a</u> ctivator- <u>l</u> ike <u>e</u> ffector
TBE	<u>T</u> rizbase, <u>B</u> orsäure, <u>E</u> DTA
TBP	<u>T</u> ATA- <u>B</u> indeprotein
TCF	<u>T</u> - <u>c</u> ell <u>f</u> actor
TGP	<u>t</u> iger <u>g</u> enome <u>p</u> roject
UCSC	<u>U</u> niversity of <u>C</u> alifornia <u>S</u> anta <u>C</u> ruz
UPD	<u>u</u> niparentale Isod <u>i</u> somie
UTR	<u>U</u> n <u>t</u> ranslatierte <u>R</u> egion
VEGF	<u>v</u> ascular <u>e</u> ndothelial <u>g</u> rowth <u>f</u> actor
WT	<u>W</u> ildtyp
YAC	<u>y</u> east <u>a</u> rtificial <u>c</u> hromosome

1. Einleitung und Zielsetzung

1.1 Definition, Symptomatik und histologische Charakteristika von CCMs

Im Jahr 2013 - zur Zeit der hier vorgelegten experimentellen Studien - waren drei Gene bekannt, *CCM1* (OMIM: 116860, Transkript: [ENST00000394507](#)), *CCM2* (OMIM: 603284, Transkript: [ENST00000258781](#)) und *CCM3* (OMIM: 603285, Transkript: [ENST00000392750](#)), in denen Mutationen zu zerebralen kavernösen Malformationen (CCMs, cerebral cavernous malformations) führen können. CCMs sind vaskuläre Fehlbildungen, die oft auch als kavernöse Angiome oder Kavernome bezeichnet werden. Sie können zu hämorrhagischen Infarkten, epileptischen Anfällen, neurologischen Defiziten und chronisch rezidivierenden Kopfschmerzen führen (Revenu und Vikkula 2006; Felbor 2007; Labauge et al. 2007; Fischer et al. 2013).

CCMs haben eine Größe von wenigen Millimetern bis zu einigen Zentimetern (Bertalanffy et al. 2002) und zeichnen sich durch dilatierte, dünnwandige, meist venöse Gefäße im Gehirn aus, die aufgrund ihrer Instabilität leicht zu rupturieren drohen (Fischer et al. 2013). Der Gefäßwandaufbau unterscheidet sich von normalen, regelgerechten zerebralen Gefäßen durch eine schwächere Ausprägung der Lamina media und das Fehlen von Myozyten. Die Intima weist mangelnde Zell-Zell-Kontakte (Zonulae occludentes, Zonulae adherentes) zwischen den Endothelzellen auf (Zhang et al. 2001). Auch die Zell-Matrix-Kontakte sind funktionell beeinträchtigt. Zwischen den Gefäßräumen fehlt das Hirnparenchym (Clatterbuck et al. 2001) und der Mangel an Perizyten führt zu einem verringerten subendothelialen Halt (Wong et al. 2000). Die erweiterten venösen Gefäße bedingen eine veränderte Hämodynamik mit verlangsamtem Blutfluss und häufig die Entstehung von Thromben. Auch das Vorkommen von Kalk und Hämosiderin ist aufgrund der Blutungen nicht selten (Fischer et al. 2013). Neben dem Auftreten im Gehirn finden sich CCMs auch im Rückenmark, auf der Retina und der Haut (Kufs 1928; Fischer et al. 2013).

1.2 Formalgenetischer Hintergrund

Die zerebralen kavernösen Malformationen können isoliert oder hereditär vorkommen und treten mit einer Prävalenz von 0,5% in der Bevölkerung auf (Rigamonti et al. 1988). Bergametti und Kollegen berichteten, dass 10-20% der Kavernome erblich bedingt sind (Bergametti et al. 2005). Bei der familiären

Kavernomatose wird ein autosomal-dominantes Vererbungsmuster mit unvollständiger Penetranz und variabler Expressivität beobachtet. Von den Mutationsträgern erkranken rund 60%. Betroffene weisen häufig multiple Läsionen in jüngerem Lebensalter auf (Revenu und Vikkula 2006). Das Hauptmanifestationsalter liegt zwischen der 2. und 4. Lebensdekade (Felbor und Sure 2006). Etwa 20% erkranken jedoch bereits vor Erreichen des 10. Lebensjahres und 33% vor dem 18. Lebensjahr (Spiegler et al. 2014).

Bei den isolierten Fällen mit multiplen Kavernomen stellte sich heraus, dass etwa 60% eine Keimbahnmutation aufweisen (Stahl et al. 2008). Dies ist durch den Erbgang mit unvollständiger Penetranz und variabler Expressivität zu erklären. Die Eltern der scheinbar isoliert Betroffenen können ebenfalls kavernöse Malformationen aufweisen, die jedoch asymptomatisch bleiben (Labauge et al. 1998). Labauge und Kollegen fanden in MRT (Magnetresonanztomographie)-Untersuchungen ebenfalls heraus, dass 16 von 22 isoliert betroffenen Indexpatienten Verwandte mit bis dato nicht diagnostizierten Kavernomen hatten. In dieser Studie waren insgesamt 75% der scheinbar isolierten Fälle letztlich doch familiär betroffen. Des Weiteren können die isoliert betroffenen Patienten Träger einer Neumutation sein, die in der elterlichen Keimbahn stattgefunden hat und nun erstmalig bei dem betroffenen Familienmitglied auftritt. Bei den Anlageträgern mit hereditären CCMs fand man bei 87% eine pathogene heterozygote Keimbahnmutation in den Genen *CCM1*, *CCM2* oder *CCM3*. Dabei wird eine Verteilung der Mutationen auf die verschiedenen Gene ersichtlich: 60% in *CCM1*, 18% in *CCM2* und 22% in *CCM3* (Spiegler et al. 2014).

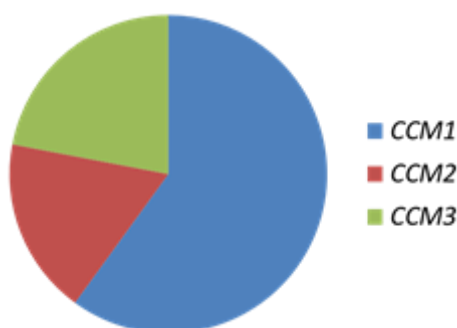


Abb. 1-1: Häufigkeiten von pathogenen Mutationen in *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* gemäß Spiegler et al. 2014

1.3 Kandidatengensuche und Identifizierung von *CCM1*, *CCM2* und *CCM3*

Die molekulargenetische Aufklärung der *CCM*-Gene begann bereits im Jahre 1995 durch die Arbeiten von Dubovsky, Günel, Marchuk und deren Kollegen. Bekannt war bis dato eine grobe Lokalisation ursächlicher Gene auf dem kurzen und langen Arm von Chromosom 7 und auf dem langen Arm von Chromosom 3. In mehreren Arbeiten erfolgte mittels Genkopplungsanalysen die Eingrenzung eines Genorts, in dem Mutationen für die Entwicklung zerebraler kavernöser Malformationen verantwortlich sein soll, auf den langen Arm von Chromosom 7 (7q) (Dubovsky et al. 1995; Günel et al. 1995; Marchuk et al. 1995).

Dubovsky und Kollegen nutzten STRPs (short tandem repet polymorphisms) als Sequenzmarker für Kopplungsanalysen in spanischen Familien und konnten so das erste *CCM*-Gen einem 33cM großen Bereich auf dem langen Arm von Chromosom 7 zuordnen (7q11-q22). Auf dieser Grundlage gelang es mittels weiterführender Kopplungsanalysen den *CCM1*-Genbereich auf ein 4cM großes Segment zwischen den Markern D7S2410 und D7S689 einzugrenzen (Johnson et al. 1995). Parallel zu den Kopplungsanalysen kartierten Serebriiskii und Kollegen 1997 ein Gen namens *KRIT1* in den Bereich 7q21-22. In einer Yeast two-hybrid Studie identifizierten sie erstmals, dass das Genprodukt Interaktionspartner des kleinen G-Proteins Krev-1/Rap1A (Ras-related protein 1A) ist und etablierten damit den Namen des Proteins: KRIT1 (KREV-Interaction-Trapped-1) (Serebriiskii et al. 1997).

Die Forschungsgruppe um Tournier-Lasserre publizierte 1999, dass Mutationen im *CCM1*-Gen (*KRIT1*) mit den erblich bedingten Kavernomen in Verbindung gebracht wurden. Im 4cM großen DNA-Abschnitt wurden polymorphe Marker verwendet, um über weitere Kopplungsanalysen eine genauere Eingrenzung des DNA-Bereiches vornehmen zu können. Darin lagen sechs Gene, unter anderem auch *CCM1*. Die Exons und die intronischen Spleißstellen im *CCM1*-Gen wurden amplifiziert und anschließend durch SSCP (single strand conformation polymorphism) und DNA-Sequenzierung analysiert. Es konnten Punktmutationen und Deletionen nachgewiesen werden, die eine Leserasterverschiebung und einen vorzeitigen Syntheseabbruch bewirken (Laberge-le Couteulx et al. 1999). Für die identifizierten Mutationen wurde in den Familien die Co-Segregation nachgewiesen und somit als krankheitsverursachend

eingestuft (Laberge-le Couteux et al. 1999). Als Ergebnis wurde der entsprechende chromosomale Bereich als *CCM1*-Gen identifiziert. Es kodiert für das Protein CCM1/KRIT1, welches aus 736 AS (Aminosäuren) besteht und ein Molekulargewicht von 84kDa aufweist (Serebriiskii et al. 1997). Es wurden mehrere Spleiß- und Transkriptvarianten des Gens gefunden (Laberge-le Couteux et al. 1999; Sahoo et al. 1999), wobei das längste Transkript eine Größe von 4762bp aufweist und aus 20 Exons besteht, wovon 16 kodierend sind (Eerola et al. 2001).

Die Arbeiten zur Identifizierung von *CCM2* auf Chromosom 7p13 (Denier et al. 2004a) und *CCM3* auf Chromosom 3q26 (Bergametti et al. 2005) liefen in analoger Weise ab. Im Jahr 2003 konnten zeitgleich Denier und Kollegen und Liquori und Kollegen das *CCM2*-Gen (synonym *MGC4607/Malcavernin, cavernous malformation*) identifizieren. Es wurde mittels Mikrosatellitenanalyse in zwei unabhängigen Familien gefunden, bei denen Nullallele das Resultat zweier überlappender Deletionen im Exon 1 waren. Das bekannte Gen *CCM2* mit unbekannter Funktion wurde auf Transkriptebene analysiert, wobei Stop- und Frameshift-Mutationen gefunden wurden, die in 192 Kontrollen nicht nachweisbar waren. *CCM2* besteht aus zehn Exons und kodiert für ein 51 kDa großes Protein (444 AS) (Denier et al. 2004a; Liquori et al. 2003).

Bereits 1998 gelang eine grobe Kartierung des bis dato unbekanntes Gens *CCM3* (synonym *PDCD10*-Gen) auf Chromosom 3q (Craig et al. 1998). Erst 2005 wurde der genaue Genlokus durch Loss-of-heterozygosity-Mapping auf 3q26.1 ermittelt (Bergametti et al. 2005). Im identifizierten Bereich des kurzen Arms von Chromosom 3 lag unter anderem das *PDCD10*-Gen (*Programmed Cell Death Protein 10*), welches aufgrund seiner Beteiligung an der Apoptose der Zellen als Kandidatengen angesehen wurde. Dieses Gen war seinerzeit bei 10% der hereditär betroffenen Patienten mutiert. Man fand zum Beispiel Nonsense- und Frameshift-Mutationen, sowie aberrantes Spleißen. *CCM3* umfasst zehn Exons, wovon sieben für ein 212 AS langes Protein mit einem Molekulargewicht von 25 kDa kodieren (Bergametti et al. 2005).

Bisher sind über 150 Keimbahnmutationen bekannt, die zu fehlerhaften CCM-Proteinen führen. Solche Veränderungen sind beispielsweise Deletionen oder Insertionen, die mit einer Leserasterverschiebung einhergehen und zum

verfrühten Einbau eines Stopcodons (Nonsense-Mutation) führen (Stahl et al. 2008). Mutationen an Spleißstellen können durch eine Veränderung der Exon-Intron-Übergänge dazu führen, dass Introns nicht entfernt werden oder ganze Exons übersprungen werden (=exon skipping). Auch eine Aktivierung kryptischer Spleißstellen ist möglich. Infolge solcher Mutationen kommt es häufig zur Bildung eines funktionslosen Proteins. Missense-Mutationen hingegen wurden bisher kaum und nur in funktionell wichtigen Domänen identifiziert (Kehrer-Sawatzki et al. 2002).

1.4 Proteindomänen, Interaktionspartner und Funktion der CCM-Proteine

Das Protein CCM1 besitzt N-terminal drei NPxY/F-Motive, die an der Dimerisierung und intramolekularen Faltung beteiligt sind und eine wichtige Rolle bei der Aktivierung von Signalkaskaden spielen (Abb. 1-2). Das erste NPxY/F-Motiv interagiert mit dem β 1-Integrin Regulator ICAP1 α (integrin cytoplasmic adaptor protein) (Haasdijk et al. 2012; Trommsdorff et al. 1998). Beide Proteine sind in der Lage, in den Zellkern zu translozieren und dort die Genexpression zu beeinflussen. Die NPxY-Motive steuern den Transfer zwischen dem Zytoplasma und dem Zellkern (Faurobert und Albiges-Rizo 2010). Auch das N-terminal lokalisierte Kernlokalisierungssignal (NLS) und das C-terminale Kernexportsignal (NES) spielen eine Rolle beim Transfer von CCM1 zwischen Zytoplasma und Nukleus. Dies konnten Zhang und Kollegen mit Studien an HeLa Zellen zeigen: die Konzentration von CCM1 im Zellkern sank, wenn Mutationen in der NLS nachweisbar waren (Zhang et al. 2007). Ebenfalls N-terminal liegen drei Ankyrin-Motive, welche von vielen Proteinen exprimiert werden und Protein-Protein-Bindungen bewirken, wobei bisher kein Interaktionspartner für die CCM1-Ankyrin-Motive identifiziert werden konnte (Sedgwick und Smerdon 1999). C-terminal liegt die FERM-Domäne (Zhang et al. 2007), welche aus drei kleeblattförmig angeordneten Untereinheiten besteht (F1-F3) (Haasdijk et al. 2012), wobei die F3 Untereinheit über eine PTB-ähnliche Domäne verfügt, die NPxY/F Motive cytoplasmatischer Teile von Transmembranrezeptoren erkennt. Die Bindung zu Rap1A erfolgt über die FERM-Domäne. Hierbei wird eine Gerüstfunktion von CCM1 für Transmembranrezeptoren und Rap1A angenommen (Haasdijk et al. 2012).

CCM2 besitzt neben einer uncharakterisierten Harmonin-Homologie-Domäne (HHD) eine PTB-Domäne wie auch ICAP1 α und kann damit die NPxY-Domäne von CCM1 binden (Zawistowski et al. 2005; Zhang et al. 2007). Dabei wird die Kerntranslokation des CCM1-ICAP1 α -Komplex gehemmt (Liquori et al. 2003; Faurobert und Albiges-Rizo 2010), was zu einer verringerten Zellproliferation führt (Liquori et al. 2003).

CCM3 weist N-terminal eine Dimerisierungsdomäne auf (Li et al. 2010), sowie eine Serin/Threonin Bindungs- und Phosphorylierungsdomäne, die Proteine der GCK3 (germinal centre kinase 3)-Familie, wie zum Beispiel STK24 und STK25 (Serin/Threonin Kinase) bindet (Voss et al. 2007). C-terminal liegt eine FAT-homology Domäne, die wichtig für die Stabilisierung des gebildeten Proteins und für die Bindung mit der PTB von CCM2 sowie Paxillin-LD Motiven ist (Li et al. 2010; Haasdijk et al. 2012).

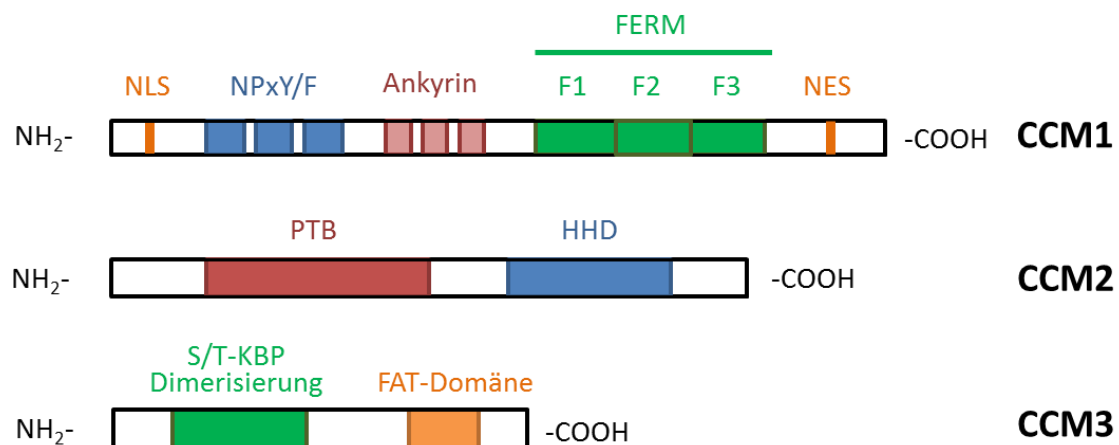


Abb. 1-2: Proteindomänen der CCM-Proteine

NLS (nukleäres Lokalisationssignal); NPxY/F (Asparagin-Prolin-x-Tyrosin); FERM (four-point-one, Ezrin, Radixin, Moesin)-Domäne; NES (nukleäres Exportsignal); PTB (Phosphotyrosin-Bindungsdomäne); HHD (harmonin-homology Domäne); S/T-KBP (Serine/Threonin Kinase Bindungs- und Phosphorylierungsdomäne); FAT (focal adhesion targeting). Adaptiert nach Haasdijk et al. 2012.

In vitro wurde eine Komplexbildung zwischen CCM1, CCM2 und CCM3 gezeigt. Schon 2003 spekulierten Liquori und Kollegen über eine mögliche Bindung zwischen CCM1 und CCM2, was durch Koimmunopräzipitationsversuche mit Antikörpern gegen CCM1 und CCM2 bestätigt werden konnte (Zawistowski et al. 2005). Die Komplexbildung kann jedoch durch Mutationen und dadurch bedingten Konformationsänderungen der Proteine verhindert werden. Stahl und

Kollegen analysierten die funktionellen Konsequenzen des Verlustes von Exon 2 im *CCM2*-Gen. Das mutierte *CCM2*-Genprodukt wurde in Koimmunopräzipitationsanalysen getestet. Dabei konnte gezeigt werden, dass eine Bindung zwischen dem veränderten *CCM2*-Produkt und dem *CCM3*-Protein erfolgte, jedoch nicht mit *CCM1* (Stahl et al. 2008). Den gleichen Effekt erhielt man bei *CCM2*-Genprodukten, die eine Punktmutation in der PTB-Domäne aufwiesen. Weiterhin zeigten Glutathion-S-Transferase Pull-down Experimente, dass die Bildung des ternären Komplexes aus *CCM1*, *CCM2* und *CCM3* von intaktem *CCM2* abhängt (Stahl et al. 2008). Begründet ist dies durch DNA-Bereiche von Exon 2 in *CCM2*, die für Teile der PTB-Domäne kodieren. Die PTB-Domäne wird durch die Aminosäuren 66-227 gebildet. Der Verlust von Exon 2 bedingt das Fehlen der Aminosäuren 11-68. Da die Bindung zu *CCM1* über das NPxY/F-Motiv erfolgt (Trommsdorff et al. 1998), ist die PTB-Region essentiell für die *CCM1*-*CCM2*-Interaktion (Stahl et al. 2008).

Zur Funktion der *CCM*-Proteine in Endothelzellen zählen unter anderem der Umbau des Zytoskeletts, die Etablierung der Zellpolarität, die Bildung der Zell-Zell- und Zell-Matrix Kontakte und die Kontrolle der Angiogenese (Fischer et al. 2013). Die Interaktionen der *CCM*-Proteine sind in den Abbildungen 1-3 bis 1-5 gezeigt (adaptiert nach Haasdijk et al. 2012). Der *CCM1*-Interaktionspartner Rap1A rekrutiert das *CCM1*-Protein zur Zellmembran, wo es an den HEG1-Rezeptor (heart of glass type 1) bindet, einem in Endothel und Endokard spezifisch exprimierten Transmembranprotein. Infolgedessen entsteht ein ternärer Komplex aus *CCM1*/*CCM2*/HEG1, welcher die Bildung von Adhärenzkontakten stimuliert (Kleaveland et al. 2009; Faurobert und Albiges-Rizo 2010; Whitehead et al. 2004). *CCM1* hält als Gerüstprotein für den membrangebundenen Komplex aus VE-Cadherin und β -Catenin die Zell-Zell-Kontakte (Zonulae adherentes) aufrecht (Beraud-Dufour et al. 2007; Gore et al. 2008; Glading et al. 2007; Glading und Ginsberg 2010). Folglich bedingt ein Mangel an *CCM1* abgeschwächte Zellkontakte und eine erhöhte Zellpermeabilität (Fischer et al. 2013). VE-Cadherin wirkt als Hauptbestandteil der Adhärenzkontakte, jedoch auch als Stimulant der Angiogenese. Bei einem *CCM1*-Mangel kommt es zur Akkumulation von β -Catenin, wodurch der Wnt Signalweg aktiviert wird. Dies soll den Wiedereintritt in den Zellzyklus fördern und die Angiogenese stimulieren (Glading et al. 2007; Glading und Ginsberg 2010). Dabei verlagert sich der Repressor Groucho und der

T-Zell Faktor (TCF) kann die Expression des Wnt Zielgens aktivieren (Abb. 1-3) (Clevers 2006). Als Folge zeigen Kavernome ein stärkeres Größenwachstum (Fischer et al. 2013).

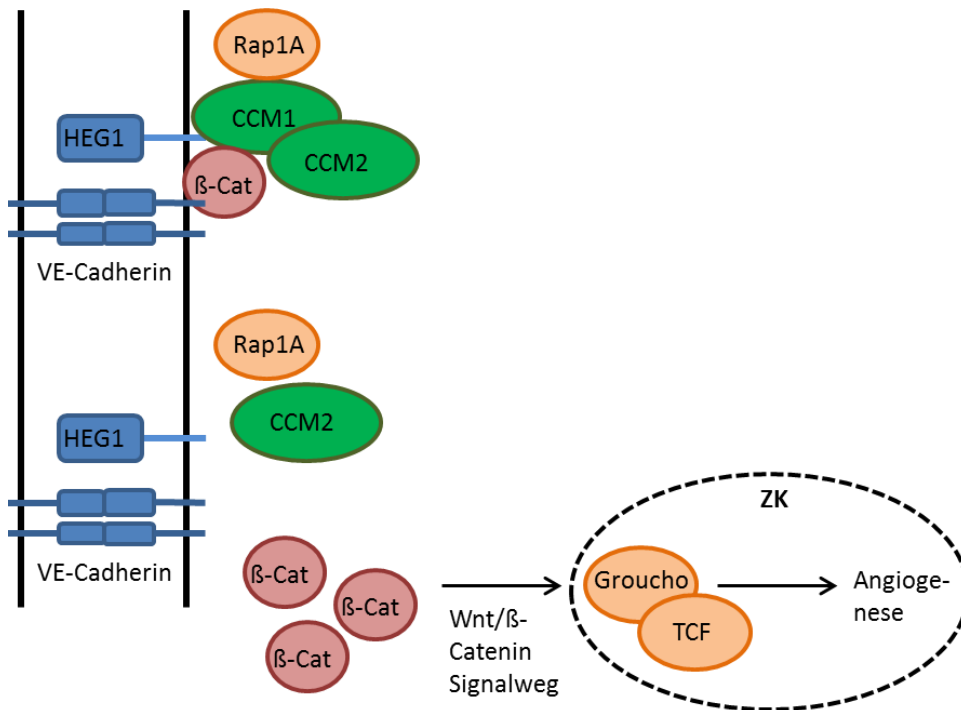


Abb. 1-3: Rap1A als Interaktionspartner von CCM1

Rap1A (Ras-related protein 1A); HEG1 (heart of glass 1)-Rezeptor; β-Cat (β-Catenin); ZK (Zellkern); TCF (T-Zell Faktor); Wnt (Wingless, Int-Gen). Adaptiert nach Haasdijk et al. 2012.

Für die Ausbildung von Zell-Matrix-Kontakten, sowie für die Zellproliferation und -migration der Endothelzellen während der Angiogenese ist der heterodimere Transmembranrezeptor β1-Integrin entscheidend (Chang et al. 2002). Er fördert die Gefäßreifung durch die Stimulation der Verbindung zwischen der Basalmembran und den Endothelzellen (Faurobert und Albiges-Rizo 2010). Eine weitere wichtige Funktion ist die Lumenbildung im Endothel (Whitehead et al. 2009; Liu et al. 2011). Dies wird gewährleistet durch die Interaktion mit CDC42 und Rac1 (Faurobert und Albiges-Rizo 2010). Gehemmt wird β1-Integrin durch den CCM1-Interaktionspartner ICAP1α. Die Bindung erfolgt dabei zwischen dem NPxY-Motiv des β1-Integrin und der PTB von ICAP1α (Chang et al. 2002). Da CCM1 ebenfalls ein NPxY/F-Motiv enthält, erfolgt ein molekularer Wettbewerb mit β1-Integrin um die ICAP1α Bindung (Abb. 1-4a) (Faurobert und Albiges-Rizo 2010; Gault et al. 2004; Zhang et al. 2001). β1-Integrin-abhängig transloziert ICAP1α mit Hilfe eines NLS zum Nukleus und kann hier die Zellproliferation und

Genexpression beeinflussen (Fournier et al. 2005). Damit bedingt ein Verlust von CCM1 einerseits einen gestörten Zell-Matrix-Verbund und zum anderen ein verändertes Zellwachstum (Marchuk et al. 2003).

Weiterhin stimuliert CCM1 die Bildung der Tight junctions (Zonulae occludentes), indem es einen ternären Komplex mit AF6/afadin und Claudin-5 bildet (Abb. 1-4b) (Dejana et al. 2009). Durch die Tight junctions wird die Zellpolarität bestimmt, was wiederum die Lumenbildung im Endothel bedingt (Faurobert und Albiges-Rizo 2010).

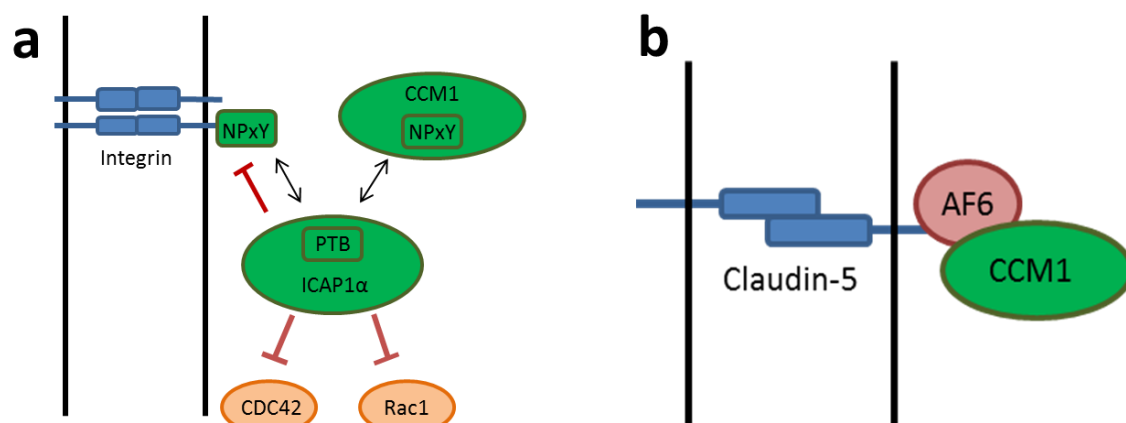


Abb. 1-4: Interaktionspartner ICAP1 α (a) und Bildung von Zell-Zell-Kontakten (b)

CDC42 (Cell division control protein 42 homolog); Rac1 (Ras-related C3 botulinum toxin substrate 1). Adaptiert nach Hasdijk et al. 2012.

Ternärer Komplex mit Claudin-5 als Transmembranprotein der Tight junctions. Adaptiert nach Hasdijk et al. 2012.

Ein gesteigerter Umbau des intrazellulären Zytoskeletts ist ebenfalls entscheidend für die Zellpolarität und wird von der Rho Kinase ROCK reguliert (Haasdijk et al. 2012). Die Aktivierung der Rho Kinase erfolgt über RhoA, ein kleines G-Protein, welches vermutlich durch alle drei derzeit bekannten CCM-Proteine inhibiert wird. CCM2 führt über die Bindung an Smurf1 zum Abbau von RhoA (Croese et al. 2009). CCM3 verhindert eine RhoA Aktivierung, indem es die Proteine der GCK3-Familie (STK25, STK24, MST4) stabilisiert und dadurch Moesin, einen RhoA Inhibitor, aktiviert (Abb. 1-5) (Zheng et al. 2010). Durch CCM-Mutationen kann es zur Enthemmung der Rho Kinasen kommen und somit zur Hyperaktivität der Zellen mit gesteigertem Zytoskelettumbau und zu verstärkter Zellpermeabilität. Es lässt sich zusammenfassen, dass ein Verlust der Funktion von CCM1, 2 oder 3 dazu führt, dass eine Endothelzelle in ein aktives Stadium

übergeht, was zu erhöhtem Zellumbau und gestörter Barrierefunktion mit resultierenden Blutungen führt (Fischer et al. 2013).

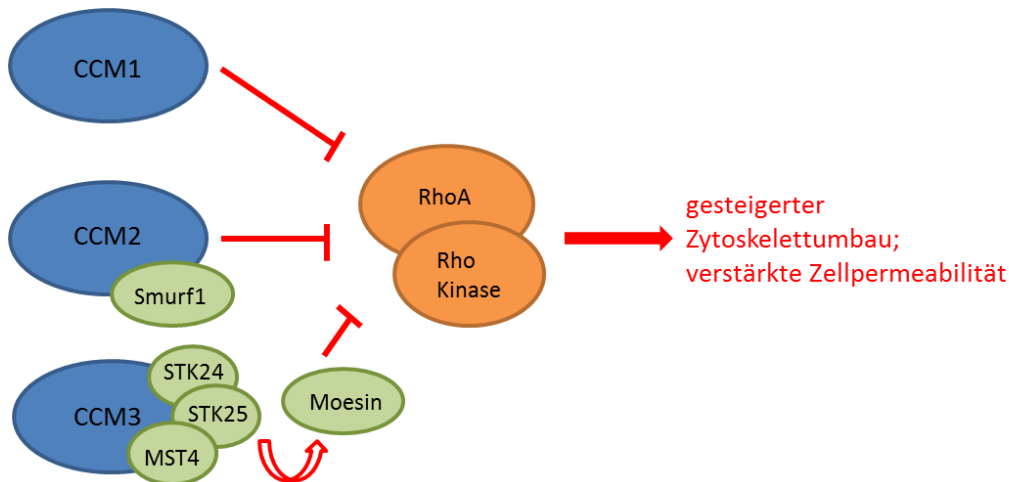


Abb. 1-5: Inhibition von RhoA durch die CCM-Proteine

Smurf1 (smad ubiquitin regulatory factor 1); STK24/25 (Serin/Threonin-Kinase24/25); MST4 (mammalian STE20-like protein kinase 4). Adaptiert nach Haasdijk et al. 2012.

1.5 Knudson'sche Zwei-Treffer-Hypothese

CCM1 wird in den Gefäßen von Gehirn, Herz, Leber, Niere und in Endothelzellen während der Angiogenese exprimiert, wie In-situ-Hybridisierungen an Mausgeweben zeigen konnten (Denier et al. 2002). Mäuse mit homozygot deletiertem *Ccm1*, *2* oder *3*-Gen sterben bereits in der Embryonalentwicklung aufgrund kardiovaskulärer Defekte (Whitehead et al. 2004; Boulday et al. 2009; Kleaveland et al. 2009; He et al. 2010; Chan et al. 2011).

Als eine mögliche Ursache für das Auftreten von CCMs wird die Knudson'sche Zwei-Treffer-Hypothese (Knudson 1971) angenommen, da ein multiples Vorkommen von Kavernomen bei hereditären Fällen und ein singuläres Auftreten bei isolierten Fällen beobachtet werden. Die Theorie besagt, dass bei Vorliegen einer Keimbahnmutation auf einem *CCM*-Allel eine zweite somatische Mutation auf dem zweiten Allel zur kompletten Inaktivierung von *CCM1*, *CCM2* oder *CCM3* in den betroffenen Endothelzellen und damit zur Manifestation der Erkrankung führt. Die Zwei-Treffer-Hypothese wäre auch eine Erklärung für das Auftreten einiger asymptomatischer Mutationsträger und die unvollständige Penetranz bei variabler Expressivität. Auch das Auftreten von CCMs als Spätfolge

bei Bestrahlungspatienten ließe sich mit zwei somatischen Mutationen erklären (Pagenstecher et al. 2009; Akers et al. 2009).

Die Inaktivierung beider Allele eines *CCM*-Gens ist schwer nachzuweisen. Zur Detektion somatischer Mutationen in Endothelzellen muss eine Gewebeprobe aus dem Kavernom vorliegen, die jedoch schwer zu gewinnen ist. Eine weitere Komplikation ist das Vorliegen von somatischen Mosaiken. Die gesuchten Mutationen liegen nur in Subpopulationen vor, da das Kavernomgewebe sowohl aus mutierten Endothelzellen als auch aus Wildtyp-Zellen besteht (Pagenstecher et al. 2009; Akers et al. 2009). Dementsprechend gibt es nur wenige weitere experimentelle Belege für die Zwei-Treffer-Hypothese der Kavernomentstehung.

Die Gruppen um Gault und Kehrer-Sawatzki berichteten jeweils von einem Patienten mit bekannter Keimbahnmutation in *CCM1* und zusätzlicher Deletion im Kavernomgewebe, die zu einer Leserasterverschiebung führte (Gault et al. 2005; Kehrer-Sawatzki et al. 2002). Studien an Mäusen scheinen ebenfalls für die Knudson'sche Zwei-Treffer-Hypothese für die CCMs zu sprechen (Amyere et al. 2013).

1.6 Diagnostik der CCMs

1.6.1 Magnetresonanztomographie

Die Magnetresonanztomographie (MRT) ist Goldstandard zur Detektion sowohl multipler als auch einzelner Läsionen. Für eine gute diagnostische Aussagekraft sind Aufnahmen mit einem 3-Tesla-Gerät und hochauflösende Gradientenecho- und suszeptibilitätsgewichtete Sequenzen (GRE/T2* und SWI) wichtig (Frischer et al. 2012). Bei der neuroradiologischen Diagnostik fand man bei gesicherten *CCM1*-Mutationsträgern im T2-gewichteten MRT durchschnittlich fünf Kavernome, mit hochauflösenden Gradientenecho-Sequenzen sogar durchschnittlich 20 Kavernome. Bei fünf von 202 *CCM1*-Mutationsträgern konnte kein Kavernom nachgewiesen werden (Denier et al. 2004b). Daraus folgt, dass ein unauffälliger MRT-Befund eine in der Familie bekannte *CCM*-Mutation nicht ausschließt. Nur durch eine molekulargenetische Untersuchung kann eine familienspezifische Mutation nachgewiesen oder ausgeschlossen werden. Oftmals fallen bis dato asymptotische multiple Kavernome jedoch als Zufallsbefund auf.

1.6.2 Molekulargenetische Stufendiagnostik

Zum Nachweis von pathogenen Mutationen in den *CCM*-Genen wird derzeit noch eine Stufendiagnostik in sechs Schritten durchgeführt. Im ersten Schritt erfolgt die Sequenzierung der kodierenden Exons 9 bis 18 des *CCM1*-Gens ([ENST00000394507](#)), gefolgt von der Sequenzierung der kodierenden Exons 5 bis 8, 19 und 20. Danach werden in *CCM2* ([ENST00000258781](#)) die Exons 1 bis 10 und in *CCM3* ([ENST00000392750](#)) die Exons 4 bis 10 sequenziert. Die 5. Stufe umfasst eine MLPA-Analyse zur Detektion größerer Deletionen und Duplikationen in allen drei Genen und als letzte Stufe folgt eine Transkriptanalyse. Dabei wird jede Stufe nur dann durchgeführt, wenn bei der vorherigen keine eindeutig kausale Mutation nachgewiesen wurde.

1.7 Klinische Manifestation ohne Mutation in *CCM1*, *2* oder *3*

Bei familiär Betroffenen liegt die Mutationsdetektionsrate nach Sequenzierung und zusätzlicher MLPA-Genosiseanalyse bei 87% (Spiegler et al. 2014; Gaetzner et al. 2007). Bei isoliert betroffenen Patienten wird eine Detektionsrate von circa 60% erreicht. Eine Erklärung für die deutlich niedrigere Rate bei Patienten mit negativer Familienanamnese könnten somatische Neumutationen sein, die sich in einer Zellteilung nach der Befruchtung ereignen, und somit in der Leukozyten-DNA nicht nachzuweisen sind. Bei 13% der klinisch auffälligen Patienten mit positiver Familienanamnese kann keine Mutation in den bekannten *CCM*-Genen gefunden werden. Neben einigen hypothetischen Erklärungsansätzen für die erfolglose Mutationsanalyse wird angenommen, dass es noch andere Gene gibt, in denen Mutationen zu Kavernomen führen können. Liquori und Kollegen spekulierten bereits 2006 auf ein zusätzliches *CCM*-Gen in der Nähe von *CCM3* (Liquori et al. 2006).

1.8 Inhalt und Zielsetzung der Arbeit

Für die Kandidatensuche nach einem weiteren *CCM*-Gen im Rahmen der Promotion von Stefanie Spiegler wurden die Exome von sechs Kavernompatienten, bei denen keine pathogene Mutation in den bekannten drei *CCM*-Genen nachgewiesen werden konnte, auf einer SOLiD™ 5500XL Sequenzierplattform analysiert. Die Exom-Sequenzierung identifizierte insgesamt circa 210 000 Varianten. Mit Hilfe eines Filteralgorithmus von Christian Gilissen (Radboud Universität Nijmegen) wurden diese Varianten untereinander verglichen.

Priorisiert wurden dabei Veränderungen in Exons und kanonischen Spleißstellen sowie solche, die in gleichen Genen bei den unterschiedlichen Patienten zu finden waren (sogenannte Overlap-Strategie nach Gilissen et al. 2012). Varianten in Introns und Genen, die auf dem X- und Y-Chromosom lagen, wurden herausgefiltert. Dies erlaubte eine Eingrenzung auf 337 Varianten. Weitere manuelle Evaluierungen reduzierten die Zahl der Varianten auf acht. Diese Evaluierung beinhaltete eine Abklärung der Allelfrequenzen mittels dbSNP und ESP6500 und der Protein-Protein-Interaktionen durch STRING (Search Tool for the Retrieval of Interacting Genes/Proteins). Die Überprüfung der Sequenzabdeckung erfolgte mit Hilfe des IGV (Integrative Genomics Viewer). Eine Evaluation der Missense-Varianten wurde durch PhyloP vorgenommen. Letztlich verblieb nur eine 2-Basenpaar-Deletion in *FAM222B* (Family With Sequence Similarity 222, Member B), Synonym *C17Orf63* (Chromosome 17 open reading frame 63) (Transkript: ENST00000581407). Dieses Gen wurde als möglicherweise krankheitsverursachendes Kandidatengen betrachtet, unter anderem, weil 2013 in *FAM222B* keine Loss-of-Function Mutationen beschrieben waren. Das Gen liegt auf dem langen Arm von Chromosom 17 (17q11.2) und besteht aus drei Exons, von denen das zweite und dritte kodierend sind (Abb. 1-6). Das kodierte Protein besteht aus 562 Aminosäuren (1689bp).

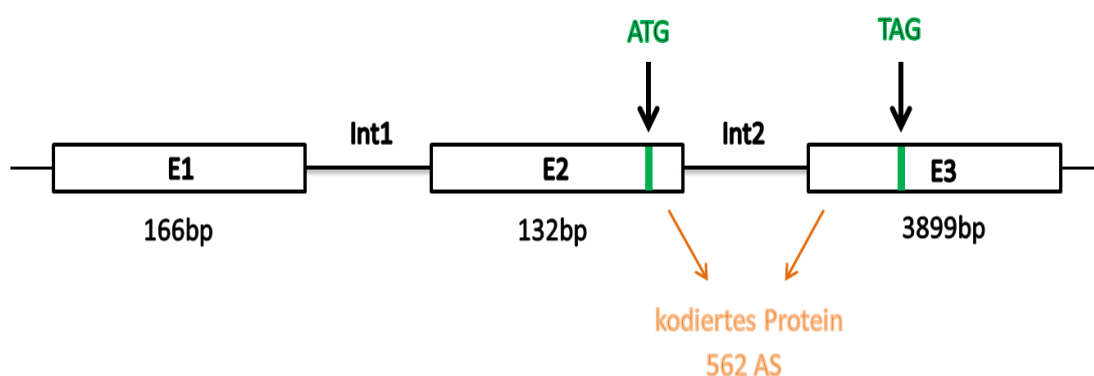


Abb. 1-6: Genomische Organisation von *FAM222B*

Der kodierende Bereich wird durch das Start- (ATG) und Stopcodon (TAG) begrenzt. Angegeben sind außerdem die Exongrößen in Basenpaaren (bp).

Ziel dieser Arbeit war die molekulargenetische Verifizierung des neuen Kandidatengens *FAM222B* durch eine Mutations- und Polymorphismenanalyse. Die Kausalität zwischen der mittels Exomanalyse identifizierten 2-Basenpaar-Deletion c.1651_1652delAG; p.R552Kfs*10 in *FAM222B* und den CCMs bei einer

sechsjährigen Patientin und ihrem Vater sollte durch weitere Mutationen bei Patienten mit CCM bestätigt werden. Dazu wurden 27 klinisch symptomatische Indexpatienten aus der Routinediagnostik ohne Priorisierung nach Manifestationsalter und Schweregrad der Erkrankung untersucht, bei denen nach der Stufendiagnostik ebenfalls keine Mutation in den Genen *CCM1*, *CCM2* oder *CCM3* nachgewiesen werden konnte. Bei der SANGER-Sequenzierung von *FAM222B* wurde nach Deletionen, Insertionen oder Substitutionen gesucht. Besonders beachtet wurden auch homozygote SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms), da sie einen Hinweis auf einen Verlust der Heterozygotie („loss of heterozygosity“, kurz LOH) und damit größere Exon-übergreifende Deletionen in *FAM222B* sein könnten. Im Anschluss erfolgte für derartig auffällige Bereiche des Gens die Etablierung einer qPCR (real-time quantitative PCR). Die quantitative Diagnostik wurde bei den Indexpatienten vorgenommen, die Homozygotie aufwiesen, um etwaige größere Deletionen nachzuweisen und damit Hinweise auf die pathogenetische Bedeutung von *FAM222B* bei der Entstehung zerebraler kavernöser Gefäßfehlbildungen zu erlangen.

2. Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Geräte

<u>Geräte</u>	<u>Hersteller, Firmensitz</u>
Apparatur für die horizontale Gelelektrophorese (Horizon® 11.14)	Whatman/Biometra, Göttingen
Concentrator 5301	Eppendorf, Hamburg
Feinwaage	Sartorius, Göttingen
Geldokumentationsgerät (BioDoc Analyze)	Biometra, Göttingen
Heizplatte	Desaga, Heidelberg
LightCycler® 480 II	Roche, Mannheim
NanoPhotometer	Implen, München
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Multipette plus	Eppendorf, Hamburg
Transferpette® S-8	Brand, Wertheim
PCR Thermocycler T3000	Biometra, Göttingen
Sequenzierer (GeneticAnalyzer 3130x)	Applied Biosystems, Darmstadt
Vortexer (Vortex-Genie 2)	Scientific Industries/Roth, Karlsruhe
Zentrifugen	
Tischzentrifuge (Galaxy Mini)	VWR, Darmstadt
Zentrifuge (Centrifuge 5417C)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge (Centrifuge 5804R)	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge Universal 30RF	Hettich, Tuttlingen

2.1.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien

Hersteller, Firmensitz

Einmalpipettenspitzen (SafeSeal-Tips® professional)	Biozym, Hessisch Oldendorf
Elutionsröhrchen (14ml)	Sarstedt, Nümbrecht
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg
Falcons (BD Falcon 50ml)	BD Biosciences, Heidelberg
Parafilm	Pechiney, Northbrook, Illinois, USA
PCR-Gefäße mit Deckel (Standard 96 Well PCR-Platte)	Peqlab Biotechnologie, Erlangen

2.1.3 Chemikalien

Chemikalie

Hersteller, Firmensitz

Agarose	Bio&Sell, Feucht bei Nürnberg
Aqua bidest (für PCR)	Sigma, München
Aqua bidest (für Sequenzierung)	J.T. Baker, Griesheim
DMSO	Roth, Karlsruhe
dNTPs (dATP, dGTP, dCTP, dTTP)	Invitrogen, Karlsruhe
Ethanol	Th. Geyer, Renningen
Ethidiumbromidlösung	Roth, Karlsruhe
ExoSAP-IT	Affymetrix, Freiburg
HiDi-Formodid	Applied Biosystems, Darmstadt
Kit NucleoSpin® Blood L	Macherey-Nagel, Düren
LightCycler® 480 Probes Master	Roche, Mannheim

Natrium-Acetat	Roth, Karlsruhe
Marker	
50bp DNA Ladder	Invitrogen, Karlsruhe
100bp DNA Ladder	Roth, Karlsruhe
Polymerase, OneTaq	von Biolabs, New England, USA
Proteinase K	Macherey-Nagel, Düren
Sequenzmix "BigDye" (BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit)	Applied Biosystems, Darmstadt
Sonde (UPL, Universal ProbeLibrary)	Roche, Mannheim

2.1.4 Puffer

Puffer

Hersteller, Firmensitz

Ladepuffer für die Gelelektrophorese

Puffer für die DNA-Präparation

Kit NucleoSpin® Blood L	Macherey-Nagel, Düren
-------------------------	-----------------------

Elutionspuffer BE

Puffer BQ1

Puffer BQ2

1x PBS-Puffer (Dulbecco's PBS)	PAA, Cölbe
--------------------------------	------------

Puffer für die PCR

5x Standard Reaction Buffer, OneTaq	von Biolabs, New England, USA
-------------------------------------	-------------------------------

Puffer für die SANGER-Sequenzierung

5x Puffer für die Markierungsreaktion	Applied Biosystems, Darmstadt
---------------------------------------	-------------------------------

TBE (10x bzw. 1x)

Borsäure	Roth, Karlsruhe
EDTA	Merck, Darmstadt
Trizbase	Hartenstein, Würzburg

2.1.5 Oligonukleotide

Die Primersynthese erfolgte bei der Firma Eurofins MWG Operon (Ebersberg). Zur Vereinheitlichung unserer Verfahren wurden für die SANGER-Sequenzierung Primer verwendet, die an ein M13 Tag binden. Demzufolge dienten bei der Sequenzierung M13-V (Vorwärts) und M13-R (Rückwärts) Primer als Sequenzier-Primer, anstatt der Verwendung einer großen Anzahl unterschiedlicher Oligonukleotide, was die Arbeitseffizienz und Übersicht deutlich erhöht. Neben dem kodierenden Abschnitt des zweiten und dritten Exons von *FAM222B* wurde die gesamte 3'-UTR untersucht. Zusätzlich wurden kleinere Bereiche der 5'-UTR (untranslatierte Region), von Intron 2 und ein kurzer Abschnitt stromabwärts der 3'-UTR sequenziert, um auch in benachbarten Bereichen Veränderungen zu detektieren.

Tabelle 2-1: PCR-Primer zur Amplifikation von *FAM222B* mittels Standard-PCR

V- Vorwärts; R- Rückwärts; in grün gezeigt die Vorwärtssequenz des M13-Anhangs; in orange gezeigt die Rückwärtssequenz des M13-Anhangs

T_A- Annealing-Temperatur

Amplikonlänge inklusive des M13-Anhangs

Name/ Bezeichnung	Sequenz	T _A in °C	Amplikon in bp
FAM222B_Int1-V FAM222B_Int2-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTGTTCCTTGTGTTTCATGACC-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACCCAGATGTGCTTCAAGGA-3'	58	278
FAM222B_Int2-V FAM222B_E3.1-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTCTGTTTGCCTTGGCACTGAT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACGTGGGCTAAAGTGCTGGGT-3'	58	456
FAM222B_E3.2-V FAM222B_E3.2-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTTTGCCATTGTCAAAGTGCCA-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACTGGCCGCCATTGAAAGGG-3'	58	496
FAM222B_E3.3-V FAM222B_E3.3-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTCGGAAGATGCCAGACTCAGA-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACCCACAAAGCCAGGCCCTG-3'	62	557
FAM222B_E3.4-V FAM222B_E3.4-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTACCTCAAGCCAGTCACCT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACCACAGTCGAGGGGTGCAC-3'	58	421
FAM222B_E3.5-V FAM222B_E3.5-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTACATTCTGCCCACTCCCAAT-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACGTCCCCACTTAGATCCCACC-3'	58	509
FAM222B_E3(4)-V FAM222B_E3(4)-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTCGATCCCACAGAGAGTCG-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACCAAAGCCTTGAGGAATGG-3'	58	638

FAM222B_E3(5)-V FAM222B_E3(5)-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTGCAAGATTTCCCAGGTGC-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACGAGGGGCTGCACTAGAGG-3'	58	636
FAM222B_E3(5)-V2 FAM222B_E3(5)-R2	5'-GTAAAACGACGGCCAGTGGACGACTGAGGTGTGGG-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACGAGGGTGAATGTACCTGTGG-3'	56	705
FAM222B_E3(6)-V FAM222B_E3(6)-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTGCATTGTGTGTGAGTGGC-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACGGCAGGAAAACAATTGGG-3'	58	659
FAM222B_E3(6)-V2 FAM222B_E3(6)-R2	5'-GTAAAACGACGGCCAGTCCACAGCCACTGCACTTG-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACGAGACGTGCTGAGCATGG-3'	56	644
FAM222B_E3(7)-V FAM222B_E3(7)-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTGCCTGATTGTGTTATGCC-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACGGATGGAGACAGGGAGTG-3'	58	634
FAM222B_E3(8)-V FAM222B_E3(8)-R	5'-GTAAAACGACGGCCAGTGCAATAAGGGTCCAAGCC-3' 5'-CAGGAAACAGCTATGACGGATTTGGAGACGGCTTC-3'	58	389

Tabelle 2-2: Primer zur SANGER-Sequenzierung von *FAM222B*

Name/ Bezeichnung	Sequenz
M13-V	5'-GTAAAACGACGGCCAGT-3'
M13-R	5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3'

Tabelle 2-3: Verwendete Primer für die real-time-quantitative PCR von Exon 3 von *FAM222B*

Name/ Bezeichnung	Sequenz	T _A in °C	Amplikon in bp
LC_FAM222Bex3up-V	5'-TGCCTTCATGTGTGGTCAAT-3'	58	86
LC_FAM222Bex3up-R	5'-GTGGGCAGGTTGACAGGA-3'		
LC_FAM222Bex3down-V	5'-CCAGAACAGCTTGATGCAAA-3'	58	82
LC_FAM222Bex3down-R	5'-CATGGCCAGGCTCTGTTC-3'		
LC_GAPDHex9-V	5'-CAGCAAGAGCACAAGAGGAA-3'	60	72
LC_GAPDHex9-R	5'-GTGGTGGGGGACTGAGTGT-3'		
LC_TBPeX3-V	5'-CAGCCGTTTCAGCAGTCAAC-3'	60	76
LC_TBPeX3-R	5'-TGTGAGTGGAAAGAGCTGTGG-3'		

2.1.6 DNA-Proben

Als Untersuchungsmaterial zur Validierung des *FAM222B*-Gens als mögliches neues *CCM*-Gen dienten DNA-Proben von 27 Patienten, die sich in der Standard-Stufendiagnostik als mutationsnegativ für die bekannten Gene *CCM1-3* erwiesen. Alle Probanden haben entsprechend der Vorgaben des Gendiagnostikgesetzes und in Übereinstimmung mit dem positiven Votum der Ethikkommission der Universitätsmedizin Greifswald ihr Einverständnis zur wissenschaftlichen Nutzung erteilt.

2.2 Methoden

2.2.1 DNA-Präparation

Zur **DNA-Präparation** aus peripherem venösen EDTA-Blut wurde das Kit NucleoSpin[®] Blood L von Macherey-Nagel verwendet. Diese Methode der DNA-Präparation beruht auf der Bindung der Nukleinsäure an eine spezielle Siliziummembran. Die Nukleinsäuren werden gewaschen und nachfolgend wieder vom Trägermaterial gelöst.

Zur Konstanthaltung der Präparationsbedingungen wurden jeweils 1ml EDTA-Blut und 1ml 1x PBS (phosphate buffered saline)-Puffer (Dulbecco's PBS) gemischt. Die **Lyse** der Leukozyten erfolgte unter Zugabe von 150µl Proteinase K, welche durch den Abbau von Peptidbindungen einen Proteinabbau und die Freisetzung der DNA aus den Leukozyten bedingt. Des Weiteren wurden 2ml vom Lysispuffer BQ1 hinzugegeben. Nach dem Mischen der Reagenzien wurden diese für 15min bei 56°C im Wasserbad inkubiert. Um optimale Bedingungen für die **Bindung** der DNA an die Trägersäule zu schaffen, wurden 2ml 100% Ethanol dazugegeben. Ethanol dient der Konzentrierung der Nukleinsäure und ihrer Reinigung von Salzen. 3ml des Gemisches wurden nach zehnmalem Invertieren auf die Säule gegeben und 4min bei 3622 g zentrifugiert. Das übrig gebliebene Gemisch wurde auf die Säule gegeben und gleichermaßen zentrifugiert, der Durchfluss verworfen. Anschließend erfolgte ein zweimaliges **Waschen** unter Verwendung von 2ml des BQ2 Puffers. Nachfolgend wurde jeweils für 4min bei 3622 g zentrifugiert. Die Isolation der Nukleinsäuren erfordert das **Lösen** von der Trägersäule. Dazu wurde die Säule in ein Elutionsröhrchen überführt und 100µl Elutionspuffer BE mittig auf die Säule gegeben. Anschließend wurde 2 Minuten bei

Raumtemperatur inkubiert und wie zuvor zentrifugiert. Die Konzentrationsmessung der DNA erfolgte mit dem NanoPhotometer und bestimmte die weiteren Schritte: Bei einer Konzentration von mehr als 120µg/ml (ng/µl) wurde erneut mit 100µl Elutionspuffer gelöst und zentrifugiert. Bei einer geringeren Konzentration wurde das Eluat nochmals auf die Trägersäule gegeben und zentrifugiert. Anschließend wurde die DNA-Konzentration mit einer zweiten Messung bestätigt.

2.2.2 Primerdesign

Die für die Amplifikation der gewünschten Genabschnitte von *FAM222B* benötigten Oligonukleotide wurden anhand verschiedener Kriterien entworfen und von der Firma Eurofins MWG Operon synthetisiert. Sie sollten in einer Größe von 18-22 bp vorliegen und einen GC-Gehalt von 40-60% aufweisen. Die vorliegenden Basen am 5'- und 3' Ende sollten nach Möglichkeit Cytosine oder Guanine sein, die aufgrund ihrer drei Wasserstoffbrückenbindungen chemisch stabiler sind und die Hybridisierung erleichtern. Es muss darauf geachtet werden, dass zwischen den Primerpaaren keine komplementären Basenabschnitte existieren, da diese eine Schleifenbildung oder Dimerisierung mit sich bringen können. Die Oligonukleotide wurden so gewählt, dass der Unterschied in der Schmelztemperatur (T_M) maximal 2°C betrug. Diese lässt sich durch die Wallace-Regel errechnen: $T_M = 4x (G+C) + 2x (A+T)$. Die optimale Primer-Annealingtemperatur liegt circa 4-5°C unter der Schmelztemperatur. Es wurden Primer in einer Konzentration von 10pmol/µl für die Standard-PCR und die Sequenzierung verwendet.

2.2.3 PCR (Polymerase-Ketten-Reaktion; polymerase chain reaction)

Die **Polymerasekettenreaktion (PCR)** wurde standardgemäß im Thermocycler (T3000 von Biometra) durchgeführt und diente der enzymatischen Amplifizierung von DNA-Fragmenten *in vitro*. Dabei erfolgte zuerst die Denaturierung, das heißt das Aufspalten der Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den Basen, wobei sich die beiden Stränge der template DNA trennen. Der zweite Schritt entsprach dem Primer-Annealing, welches von den T_M (melting temperature)-Werten der Primer abhängig ist. Die Oligonukleotidprimer hybridisieren an ihre komplementäre DNA-Sequenz am 3' Ende der zu

amplifizierenden Matrizen-Sequenz. Ausgehend von den Primern als Startpunkten synthetisiert die thermostabile DNA-Polymerase durch den Einbau von Nukleotiden in 5' → 3' Richtung den Tochterstrang. Als Cofaktor im katalytischen Zentrum der DNA-Polymerase sind Magnesiumionen an der Bildung der Diesterbindung beteiligt. Durch eine repetitive Abfolge der genannten Schritte erlangt man eine exponentielle Vermehrung der Templates. Das Korrekturlesen der synthetisierten Nukleinsäuren wird durch die 3' → 5' Exonukleaseaktivität der DNA-Polymerase gewährleistet.

Es wurden OneTaq-Polymerasen zur Amplifikation der Gensequenz eingesetzt. Vom angefertigten Mastermix wurden jeweils 23,5µl in jedes Well pipettiert und die entsprechenden Vorwärts- und Rückwärtsprimer ebenso wie die Patienten- bzw. Referenz-DNA nachgelegt.

Tabelle 2-4: Standardreaktionsansatz für die PCR

Reagenz	Volumen in µl
Aqua bidest	17,875
5x Standard Reaction Buffer mit 1,8mM MgCl ₂	5
10mM dNTPs	0,5
OneTaq-Polymerase (5 U/µl)	0,125
	23,5
10pmol/µl Primer (Vorwärts&Rückwärts)	0,5
25ng/µl genomische DNA	1
gesamt	<u>25</u>

Die Amplifikation der Genabschnitte von *FAM222B* erfolgte mit den PCR-Programmen OneTaq **56**, **58** oder **62**:

Tabelle 2-5: Ablauf der PCR

Schritt	Temperatur in °C	Dauer
Initiale Denaturierung	94	4min
Denaturierung	94	20s
Primer-Annealing	56/58/62	45s
Elongation	68	1min
Finale Elongation	68	5min
Pause	15	Pause

} 34x

2.2.4 Gelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Produkte wurde eine **Gelelektrophorese** durchgeführt. Dabei wird die amplifizierte DNA auf ein Agarosegel aufgetragen, welches als Trägermatrix dient. Unter Erzeugung eines elektrischen Feldes wandert die Nukleinsäure aufgrund ihrer negativen Nettoladung zur positiv geladenen Anode. Kürzere DNA-Fragmente wandern schneller als längere, womit eine Auftrennung proportional zur Größe erfolgt. Zur Größendetektion wird ein entsprechender Marker mitgeführt. Zur Herstellung eines 1,5%igen Agarosegels wurden 1,5g Agarose und 100ml 1xTBE in der Mikrowelle erhitzt, bis die Lösung homogen erschien. Zur späteren Detektion der DNA-Banden wurden pro 100ml 10µl Ethidiumbromidlösung hinzugegeben. Durch Mischen von 5µl des PCR-Produktes mit 1µl Ladepuffer wurden die Proben beschwert und anschließend aufgetragen. In der mit 1x TBE befüllten Gelkammer erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proben bei 130V für circa 25 Minuten. Als Marker für die Gelelektrophorese wurde je nach Amplikongröße ein 50bp DNA Ladder von Invitrogen oder ein 100bp DNA Ladder von Roth verwendet. Durch das interkalierte Ethidiumbromid konnte die DNA unter UV-Licht bei einer Wellenlänge von 365nm sichtbar gemacht werden.

2.2.5 SANGER-Sequenzierung

Die **Sequenzierung** der amplifizierten PCR-Produkte wurde mittels der Didesoxymethode (Kettenabbruchmethode) nach SANGER (1977) durchgeführt. Zur Entfernung übrig gebliebener Primer und Desoxynukleosidtriphosphaten (dNTPs) erfolgte die **Aufreinigung** des PCR-Produktes mit ExoSAP-IT im Thermocycler. Die Zeit der Inkubation betrug 20min bei 37°C und 15min bei 80°C. Ein Mastermix aus ExoSAP-IT und Aqua bidest wurde vorgelegt und je nach Bandenstärke bei der Gelelektrophorese 1-2µl PCR-Produkt eingesetzt.

Tabelle 2-6: Standardansatz für die Aufreinigung des PCR-Produktes bei der Sequenzierung

Reagenz	Volumen in µl
Aqua bidest	2,25-3,25
ExoSAP-IT	0,75
PCR-Produkt	1-2

Als **Markierungsreaktion** wurde der Sequenzmix „BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit“ von ABI genutzt, der unter anderem dNTPs, eine Polymerase zur Elongation und fluoreszenzmarkierte ddNTPs zur Termination enthält. Als Primer wurden M13-V (Vorwärts) und M13-R (Rückwärts) verwendet.

Tabelle 2-7: Mastermixansatz für die Markierungsreaktion bei der SANGER-Sequenzierung

Reagenz	Volumen in μl
5x Puffer	1,5
Aqua bidest	1
Sequenzmix "BigDye"	1
Primer (Vorwärts&Rückwärts) (5 pmol)	1
DMSO (Dimethylsulfoxid)	0,5
	<u>5</u>

Die **Markierungsreaktion** wurde in folgenden Schritten durchgeführt:

Tabelle 2-8: Ablauf der Markierungsreaktion bei der SANGER-Sequenzierung

Schritt	Temperatur in $^{\circ}\text{C}$	Dauer
Initiale Denaturierung	96	1min
Denaturierung	96	10s
Primer-Annealing	50	5s
Elongation	60	4min
Pause	4	Pause

} 30x

Die **Fällung** der Proben erfolgte standardgemäß mit 1 μl Natrium-Acetat und 25 μl 100%igem Ethanol. Nach dem Mischen und Zentrifugieren (2250 g, 4 $^{\circ}\text{C}$, 20min) wurde der Überstand entfernt und die Proben mit 100 μl 70%igem Ethanol **gewaschen**. Dieser Schritt wurde zweimal durchgeführt. Die Zentrifugation erfolgte auch hier jeweils bei 2250 g, 4 $^{\circ}\text{C}$ für 20 Minuten. Nach der Trocknung des Pellets auf einer Heizplatte (20 Minuten, 39 $^{\circ}\text{C}$), wurden die Proben mit HiDi-Formodid (Applied Biosystems) **gelöst**. Nach dem Hinzugeben von 20 μl HiDi je Sample wurde kurz gemischt und anzentrifugiert und anschließend für circa 20-30 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Die Analyse der DNA-Sequenzierungsprodukte wurde mit dem Genetic Analyzer 3130xI von ABI vorgenommen. Ausgewertet wurde mit dem Programm SequencePilot (JSI, Medical Systems) und dem Programm Chromas Lite von Technelysium.

2.2.6 Real-time quantitative PCR

Mittels der **real-time quantitativen PCR** (RTQ-PCR, qPCR, quantitative Echtzeit-PCR) kann eine Quantifizierung von Nukleinsäuren erfolgen. Dies geschieht mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen, die während des PCR-Zyklus erfasst werden. Die Lichtstärke nimmt dabei proportional zur Menge der amplifizierten DNA zu. Die Messungen beruhen auf dem FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer). Auf den Sonden (probes) befinden sich zwei Fluorochrome (F1, F2, Fluoreszenzfarbstoff), die sich durch Licht einer bestimmten Wellenlänge anregen lassen (A1, A2) und die aufgenommene Energie anschließend in Form von Licht einer anderen Wellenlänge wieder abgeben (E1, E2) (Abb. 2-1a und b). Liegen beide Fluorochrome benachbart, kann das emittierte Licht des ersten Fluorochroms das zweite anregen (E1=A2), womit nur noch das emittierte Licht des zweiten Fluorochroms (E2) detektiert werden kann, beziehungsweise wird gar keine Fluoreszenz detektiert, wenn das zweite Fluorochrom durch einen Quencher (Auslöschen) - Farbstoff markiert ist. Die beiden Fluorochrome werden als Donor (F1) und Akzeptor (F2) bezeichnet.

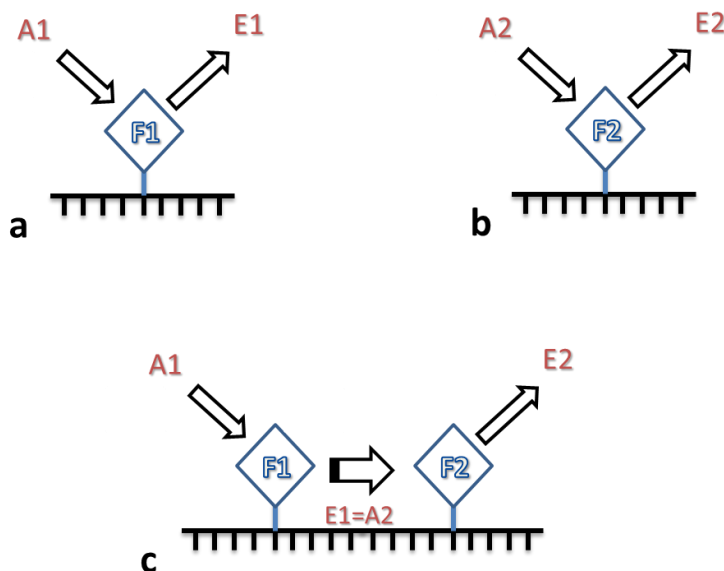


Abb. 2-1: FRET (Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer)

Zwei auf Sonden befindliche, nicht benachbarte Fluorochrome (F1, F2) (a, b). Überlappen sich E1 und A2 jedoch, kann das emittierte Licht von F1 das F2 anregen, was voraussetzt, dass die beiden Fluorochrome nah beieinander liegen (c).

Es wurde mit Hydrolyse-Sonden gearbeitet, wobei sich die Fluorochrome hier als Reporter und Quencher benachbart am 5' und 3' Ende eines Oligonukleotids befinden und der Quencher-Farbstoff (dark quencher dye) am 3'

Ende somit das Lichtsignal des ersten Fluorochroms (F1) unterbindet, solange die Sonde an die DNA gebunden ist. Wird der Reporter jedoch durch die 5'-3' Exonucleaseaktivität der DNA-Polymerase freigesetzt, fluoresziert das Fluorochrom (F1) und die steigende Signalstärke kann detektiert werden (Abb. 2-2).

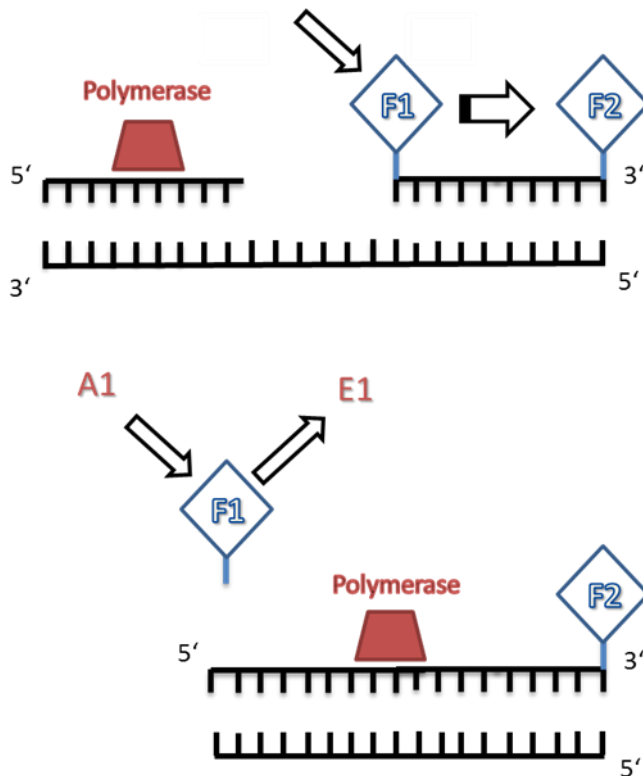


Abb. 2-2: Darstellung der Funktionsweise der Hydrolyse-Sonden

Hybridisierte Sonde, bei der das Lichtsignal durch einen Quencher-Farbstoff unterdrückt wird (oben). Separation des F1 von F2 und damit ermöglichte Fluoreszenzmessung (unten).

Am 5' Ende enthält die Sonde (UPL, Universal ProbeLibrary) als Fluoreszenzmarkierung Fluorescein (FAM), welches sein Absorptionsmaximum bei 485 nm hat. Die Messung findet jeweils am Ende der Elongation nach jedem Zyklus statt. Zur optimalen Quantifizierung erfolgt die Messung in der exponentiellen Phase der Polymerase - Ketten - Reaktion. Akkumuliert das PCR-Produkt, verringern störende Einflüsse die Qualität der Messung, da das gebildete Pyrophosphat inhibierend wirkt und die Konzentration der benötigten Primer und Nukleotide sinkt, kommt es zum Stillstand der Amplifikation. Die Vermehrung ist ab dem Zyklus exponentiell, wenn sich das Fluoreszenzsignal deutlich von der Hintergrund-Fluoreszenz abhebt. Charakterisiert ist dies durch den C_T -Wert (Cycle

threshold= Schwellenwert-Zyklus) beziehungsweise C_p -Wert (Crossing Point). Zur Auswertung wird anhand der C_t - oder C_p -Werte eine Standardkurve mit linearer, umgekehrter Proportionalität erstellt, die dann das Ablesen der DNA-Konzentration ermöglicht. Dazu muss parallel zur Ziel-DNA als Standard DNA bekannter Templatmenge mitgeführt werden. Als Referenzgene können zum Beispiel GAPDH (Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase), Actin, Tubulin oder TBP (TATA-box-Bindeprotein) verwendet werden. Die Software des LightCycler® 480 II von Roche erlaubt eine relative Quantifizierung der DNA-Proben durch den Vergleich zweier verschiedener Sequenzen – der Ziel-DNA und der Referenz-DNA. Die Standard-Kurven werden vom Computerprogramm aus den C_p -Werten von Target und Referenz berechnet. Das Ergebnis wird als Ratio dieser beiden Proben angegeben. Die Ratio der ersten Standard-Proben wird gleich 1 gesetzt und dient dem Vergleich aller anderen errechneten Ratios. Manuell lässt sich die normalisierte Ratio anhand folgender Formel errechnen:

$$\text{normalisierte Ratio} = \left(\frac{\text{Konz. Ziel - DNA}}{\text{Konz. Referenz - DNA}} \right)_{\text{Pat}} \div \left(\frac{\text{Konz. Ziel - DNA}}{\text{Konz. Referenz - DNA}} \right)_{\text{NP}}$$

Formel 2-1: Formel zur Berechnung der normalisierten Ratio

Konz. Ziel-DNA – entspricht der Konzentration der Ziel-DNA am Crossing Point, Konz. Referenz-DNA – entspricht der Konzentration der Referenz-DNA am Crossing Point, Pat – Patient, NP – Normalperson.

Der Bereich der exponentiellen Vermehrung ist abhängig von der Anzahl der Templates. Je mehr DNA vorliegt, desto weniger Zyklen sind im exponentiellen Bereich möglich. Dementsprechend sind bei geringeren DNA-Konzentrationen mehr Zyklen bis zum Erreichen des C_p -wertes nötig, was am zeitlich verzögerten Anstieg der Fluoreszenzkurve sichtbar wird. Die Berechnung der Standardabweichung wurde durch die Analyse jeweils dreier Replikate pro DNA-Probe ermöglicht. Die teils geringe Spezifität der qPCR kann durch eine Schmelzkurvenanalyse kompensiert werden, die darauf beruht, dass doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als die unspezifischen Primer (Mülhardt 2000; LightCycler® Instrument Operator's Manual Software Version 1.5 von Roche). Die Standardabweichung σ ist bezogen auf die qPCR ein Maß für die Streuung der C_p -Werte um den Erwartungswert, der sich aus den Ergebnissen der drei

Replikate berechnen ließ. Ebenfalls erfolgte die Angabe der Standardabweichung für die Ratio.

Tabelle 2-9: Beispiel einer Wellbesetzung zur Durchführung der qPCR

NP1-3 (Normalperson1-3)- Standard-DNA, Patient- Patienten-DNA, negK- negative Kontrolle (Leerwert), Target- analysierte Ziel-Sequenz, UPL (Universal Probelibrary)- Sonde, 3 beziehungsweise 40- Nummer der Sonde, *CCMx-up*- upstream Bereich einer Variante im *CCMx*- Gen, *TBP_E3* (Exon 3) als Referenzgen. Analyse jeweils dreier Replikate (A-C beziehungsweise D-F) zur Berechnung der Standardabweichung.

	1	2	3	4	5
A	NP1	NP2	Patient	NP3	negK
B	NP1	NP2	Patient	NP3	negK
C	NP1	NP2	Patient	NP3	negK
D	NP1	NP2	Patient	NP3	negK
E	NP1	NP2	Patient	NP3	negK
F	NP1	NP2	Patient	NP3	negK

Mix1: Target
FAM222B-up UPL40

Mix2: Referenz
TBP_E3 UPL3

Für die qPCR wurde der LightCycler® 480 II von Roche, dazugehörige 96er Multiwellplatten und der LightCycler® 480 Probes Master von Roche als Kit verwendet. Die qPCR im LightCycler läuft in drei Schritten ab. Zuerst erfolgt eine Prä-Inkubation für 10 Minuten bei 95°C, bei der die Faststart TaqDNA Polymerase aktiviert wird und die DNA denaturiert. Es folgt die Amplifikation der Ziel-DNA mittels einer variablen Anzahl von Zyklen, wobei jeder einzelne aus einer Denaturierung (10s, 95°C), der Hybridisierung (30s, 60°C) und der Elongation der DNA (1s, 72°C) besteht. Der letzte Schritt stellt eine Kühlung der DNA für 30s bei 40°C dar (aus: LightCycler® Probes Master von Roche, Version 9.0).

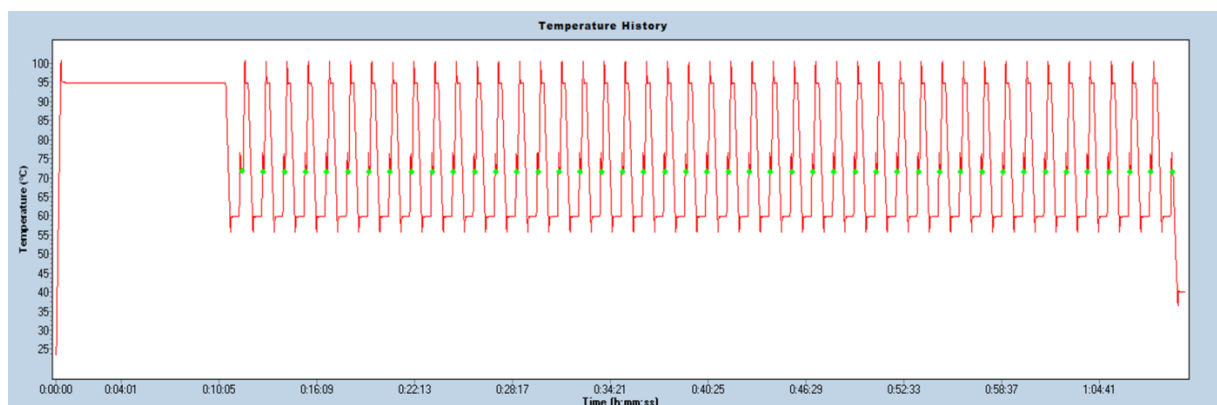


Abb. 2-3: Ablauf der qPCR im LightCycler in drei Schritten

Auf der Abszisse ist die Zeit, auf der Ordinate die Temperatur in °C aufgetragen. In grün gekennzeichnet sind die Messzeitpunkte am Ende einer jeden Elongationsphase zur Ermittlung des steigenden Fluoreszenzsignals.

Tabelle 2-10: Standardreaktionsansatz für die qPCR

Reagenz	Volumen in μl
3 μM LC_CCMxex2/3_F	2,6
3 μM LC_CCMxex2/3_R	2,6
2,5 μM UPLx (Sonde)	1,8
2x LightCycler® 480 Probes Master	10
Master Mix	17
25ng/ μl DNA	3
	<u>20</u>

Bei der qPCR wurde zum Mastermix von 17 μl die entsprechende Patienten- oder Referenz-DNA eines Blutspenders mit einem Volumen von 3 μl hinzu gegeben, sodass sich in jedem Well 20 μl Reaktionsansatz befanden. Die Lieferung der Sonden erfolgte in Tubes mit einem Volumen von 125 μl und einer Konzentration von 10 μM . Es musste eine 1:4 Verdünnung auf 2,5 μM angesetzt werden. Des Weiteren wurden die Sonden aliquotiert, da diese sehr lichtempfindlich sind und ein mehrfaches Auftauen vermieden werden sollte. Das „x“ der Sonde steht für die entsprechende Nummer, da je nach Amplikon verschiedene Sonden eingesetzt werden mussten. Der LightCycler® 480 Probes Master enthält Puffer (reaction buffer), dNTPs, Polymerase (Faststart TaqDNA Polymerase) und 6,4 mM MgCl₂.

2.2.6.1 Etablierung der qPCR

Diese erfolgte zuerst anhand von Probanden-DNA mit einer bekannten Deletion im Gen für die Gerinnungsfaktor X (*F10*-Gen Exon 2). Es waren mehrere Durchläufe nötig, um die optimale Annealing-Temperatur und DNA-Konzentration zu ermitteln und ein für diese Arbeit passendes Referenzgen zu finden. TBP erwies sich bei der Etablierung als optimales Referenzgen. Die DNA wurde jeweils in einer Konzentration von 25ng/ μl eingesetzt und die Annealing-Temperatur lag bei 60°C. Erst danach erfolgte die Durchführung der qPCR anhand der DNA der Indexpatienten.

2.2.7 Gendatenbanken und Auswerteprogramme

Zur Beurteilung der Pathogenität der gefundenen Veränderungen in *FAM222B* erfolgte eine genauere Charakterisierung anhand von Daten aus den Gendatenbanken ESP (Exome Sequencing Project, <http://evs.gs.washington.edu/EVS/>, 07.03.2015), 1000 Genomes (Phase 3, <http://browser.1000genomes.org/index.html>, 07.03.2015), Ensembl (<http://www.ensembl.org/index.html>, 07.03.2015), GeneCards® (<http://www.genecards.org/>, 07.03.2015), dbSNP (Release 138, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/SNP/>, 07.03.2015), Alfred (The ALlele FREquency Database, <http://alfred.med.yale.edu/>, 07.03.2015), NCBI (National Center for Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, 07.03.2015) und ExAC (Exome Aggregation Consortium, <http://exac.broadinstitute.org/>, 07.03.2015).

Anhand von computergestützten Auswerteprogrammen wie PolyPhen-2 (Polymorphism Phenotyping v2, Adzhubey 2011, <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, 16.04.2015), Mutation Taster (Schwarz et al. 2010; Schwarz et al. 2014, <http://www.mutationtaster.org/>, 16.04.2015) und SIFT (Ng und Henikoff 2001; sorting intolerant from tolerant, http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html, 16.04.2015) wurde die mögliche Konsequenz der Varianten auf das entstehende Protein überprüft.

Mutation Taster klassifiziert anhand drei verschiedener Modelle eine Veränderung in einem Gen entweder als „Polymorphismus“ oder als „krankheitsverursachende Mutation“, dabei wird die Wahrscheinlichkeit in Prozent für die jeweilige Variante angegeben. Ein Wert von „1“ bedeutet, dass mit großer Sicherheit die richtige Prognose vorhergesagt wurde. Dazu werden die Informationen verschiedener Quellen kombiniert und mit einem Bayes-Klassifikator das krankheitsverursachende Potential einer Veränderung vorhergesagt. Analysiert werden dabei die Konservierung des Proteins, Spleißstellen (NNsplice), Veränderungen von Polyadenylierungssignalen (Polyadq) und Veränderungen in Kozak-Konsensus-Sequenzen. Für die Entscheidung über die Pathogenität einer DNA-Veränderung werden der AS-Austausch und der Einfluss auf die Proteinlänge und -funktion vorhergesagt,

wobei Informationen von SwissProt/UniProt, Hapmap, dbSNP und Ensembl integriert werden (Schwarz et al. 2010; Schwarz et al. 2014).

Der SIFT-Algorithmus unterscheidet intolerante von toleranten AS-Substitutionen und bewertet, ob diese Auswirkungen auf die Proteinfunktion haben könnten. Dabei wird der Grad der Konservierung von Aminosäureresten in Sequenzabgleichen ermittelt, unter der Prämisse, dass wichtige Proteinstrukturen evolutionär erhalten bleiben. In alignierten, homologen Sequenzen werden die Wahrscheinlichkeiten aller möglichen AS-Substitutionen kalkuliert, mit der häufigsten Aminosäure normalisiert und in einer skalierten Wahrscheinlichkeit (SIFT Score) wiedergegeben. Der SIFT-Score reicht von 0-1 und bewertet einen Aminosäureaustausch als schädigend, wenn ein Ergebnis von unter 0,05 vorliegt (Ng und Henikoff 2001).

Mit Hilfe von physikalischen und evolutiven Betrachtungen prognostiziert PolyPhen-2, ob ein Aminosäureaustausch einen Einfluss auf die Tertiärstruktur und damit auch auf die Funktion eines Proteins ausübt. Die Skala umfasst den Zahlenbereich von 0 bis 1, wobei die Wahrscheinlichkeit für einen schädigenden Einfluss zwischen 0 und 1 zunimmt. Das Ergebnis „0“ entspricht einer benignen Veränderung und „1“ einer Veränderung, die sehr wahrscheinlich schädigend ist. PolyPhen-2 prognostiziert die mögliche Auswirkung eines AS-Austausches auf die Struktur und Funktion eines Proteins mittels strukturellen evolutiven Betrachtungen. Dazu werden acht sequenzbasierte und drei strukturbasierte Merkmale des Wildtyp-Allels und dem mutierten Allel verglichen (Adzhubei et al. 2010). Wie auch Mutation Taster und SIFT, arbeitet PolyPhen-2 mit dem Alignment homologer Sequenzen (Adzhubei et al. 2013). Die funktionelle Bedeutung eines AS-Austausches wird anhand individueller Merkmale ebenfalls mit einem Bayes-Klassifikator vorgenommen (Adzhubei et al. 2010).

Zur Berechnung der Spleißstellen wurden drei verschiedene Programme verwendet. NetGene2 (Hebsgaard et al. 1996, Brunak et al. 1991, <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetGene2/>) nutzt artifizielle neurale Netzwerke zur Vorhersage der Lokalisation von Spleißstellen in humaner pre-mRNA. Dabei werden durch ein gemeinsames Vorhersageschema die Exon-Intron Übergänge prognostiziert und die Spleißstellenlokalisierung bestimmt, was zu weniger falsch positiven führt als bis dato. Die Bewertung der möglichen Spleißstellen erfolgt hier

über einen Wert, der zwischen 0 und 1 liegt, wobei 1 die höchste und 0 die geringste Wahrscheinlichkeit einer Nutzung als Spleißstelle entspricht.

Das Berkeley Drosophila Genome Project (BDGP, Reese et al. 1997, http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html) nutzt die NNSPLICE 0,9 Version für die Spleißstellen-Vorhersage und nutzt ebenfalls eine neurale Netzwerkerkennung für jede Spleißstelle mit dem Unterschied, dass ausschließlich Gene berücksichtigt werden, die eindeutige Consensus-Spleißstellen haben, also für die Donor-Stellen die Basen GT und für die Akzeptorstellen AG aufweisen. Als Ergebnis wird auch hier ein Score für eine potentielle Spleißstelle vergeben, der zwischen 0 und 1 liegt, wobei ein höherer Wert einer größeren Wahrscheinlichkeit der Nutzung einer Stelle entspricht.

Der Human Splicing Finder (HSF, Desmet et al. 2009, <http://www.umd.be/HSF3/index.html>) nutzt alle verfügbaren Matrices, sowie neue für Bindungsstellen von 9G8, Tra2-beta Serine-Arginine Proteinen und des hnRNP A1 Ribonucleoproteins für die Vorhersage. Damit ist auch eine Beurteilung über die Veränderungen von exonischen und intronischen Spleiß-Enhancer- und Silencer Motiven möglich. Das Programm gibt einen Consensus-Wert zwischen 0 und 100 für alle möglichen Spleißstellen an und interpretiert die möglichen Konsequenzen zusammenfassend in Textform.

3. Ergebnisse

3.1 Validierung der familiären 2-Basenpaar-Deletion c.1651_1652delAG; p.R552Kfs*10 in *FAM222B*

Rund 13% der familiär betroffenen Kavernomträger zeigen nach standardisierter Stufendiagnostik keine eindeutig pathogene Mutation in den Genen *CCM1*, *CCM2* oder *CCM3*. Bei sporadisch Betroffenen liegt dieser Anteil bei circa 40% (Spiegler et al. 2014). Dies legt den Verdacht auf andere, bisher unbekannte *CCM*-Gene nahe. Unter Anwendung des NGS (Next Generation Sequencing) wurde eine 2-Basenpaar-Deletion in der DNA von zwei von sechs untersuchten Patienten in *FAM222B* identifiziert. Diese 2-Basenpaar-Deletion ist in Exon 3 lokalisiert und führt zu einer Leserasterverschiebung mit Einbau eines Stopcodons: c.1651_1652delAG; p.R552Kfs*10. Die Veränderung, welche mittels klassischer Sequenzierung nach SANGER validiert wurde (Abb. 3-1), trägt die Identifikationsnummer rs748255395 und ist an der genomischen Position 27085325-27085326 (hg19) auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert. Mutation Taster klassifiziert diese Veränderung als krankheitsverursachend.

Bei den beiden betroffenen Patienten handelt es sich um Vater und Tochter, die beide bereits in einem jungen Alter an Kavernomen erkrankten. Beim Vater erfolgte mit 17 Jahren aufgrund einer intrazerebralen Blutung eine operative Exstirpation der Kavernome. Histologisch wurden intrazerebral pathologisch veränderte Gefäßkonvolute mit endothelialer Proliferation und intraluminal gelegenen Thromben beschrieben. Mit 23 Jahren erlitt er eine erneute Hirnblutung, die zu einer rechtsseitigen Hemiparese und einer fokalen Epilepsie führte. Seine Tochter erkrankte im fünften Lebensjahr an einer pharmakoresistenten komplex-fokalen Epilepsie. Auch bei ihr erfolgte eine Exstirpation des Kavernoms, durch welche damals (2003) Anfallsfreiheit erlangt werden konnte. Beide Patienten gehören zu den 13%, die an CCMs leiden, jedoch in der Routinediagnostik keine Mutation in *CCM1-3* aufwiesen. Anhand dieser Familie wird beispielhaft deutlich, dass es andere Ursachen für das Auftreten zerebraler Kavernome geben muss. In Betracht kommen weitere Gene, in denen Mutationen eine Dysfunktion in zerebralen Gefäßen bedingen. Eines dieser Gene könnte das beschriebene Kandidatengen *FAM222B* sein, welches im Rahmen dieser Studie sequenziert und quantitativ analysiert wurde.

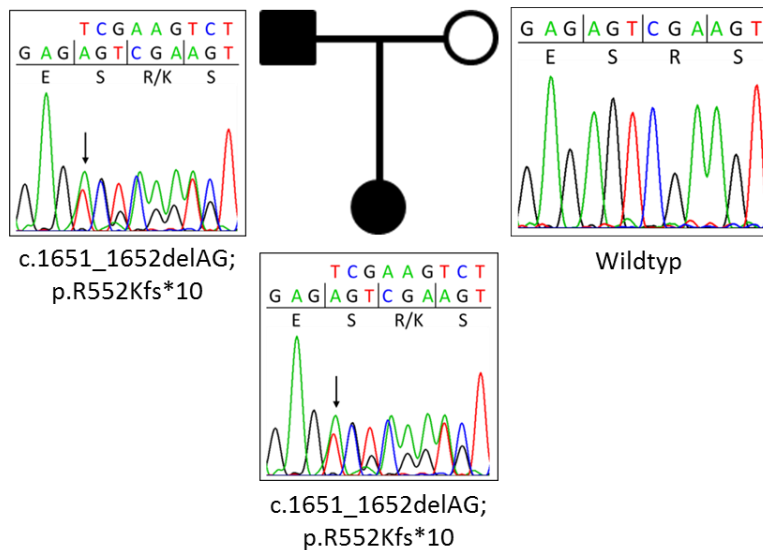


Abb. 3-1: Familienstammbaum und 2-Basenpaar-Deletion in *FAM222B*

Auszug aus dem Stammbaum der Familie. Chromatogramme der beiden betroffenen Familienmitglieder (Vater und Tochter, schwarz gekennzeichnet). Der Pfeil kennzeichnet den Beginn der Leserasterverschiebung durch die Deletion der Basen Adenin und Guanin. Die Mutter ist Trägerin des Wildtypallels und nicht erkrankt.

3.2 Patientenkollektiv zur Verifizierung von *FAM222B*

Um Aufschluss über eine mögliche Beteiligung dieses Kandidatengens an der zerebralen Kavernomatose zu erlangen und die Vermutung einer Kausalität zu erhärten, wären weitere Mutationsnachweise in diesem Gen bei anderen CCM-Patienten wichtig. Aus diesem Grund wurde eine Sequenzierung nach SANGER bei 27 unselektierten Indexpatienten durchgeführt. Die Gemeinsamkeit aller lag in der Mutationsnegativität für die Gene *CCM1*, *CCM2* und *CCM3*. Unter den Indexpatienten befanden sich sowohl Kavernomträger mit negativer, aber zum Teil auch mit positiver Familienanamnese hinsichtlich weiterer Kavernome (Tabelle 3-1).

Tabelle 3-1: Übersicht über die 27 mutationsnegativen Indexpatienten

Eine positive Familienanamnese (FA) wird angenommen, wenn mindestens ein Verwandter 1.-3. Grades Kavernome aufweist, an rezidivierenden Kopfschmerzen oder Krampfanfällen leidet oder bereits einen hämorrhagischen Schlaganfall erlebt hat.

Patient	Geburtsjahr	FA	Symptomatik
1	1979	fraglich	unklar
2	1958	negativ	Sehstörungen links, Kopfschmerz rechts
3	1941	fraglich	unklar
4	1957	negativ	unklar
5	2005	fraglich	unklar
6	1971	fraglich	Sehstörungen, Hemiparese links
7	1949	fraglich	unklar
8	1978	unbekannt	Epilepsie, Parästhesie links, Parese rechte Hand
9	1972	unbekannt	Bewusstseinsstrübung, Sehstörungen, Hypästhesien
10	1975	unbekannt	symptomatische Epilepsie
11	1958	positiv	unklar
12	1958	negativ	Epilepsie
13	1987	positiv	Kopfschmerzen, Epilepsie, Fazialisparese
14	1972	fraglich	Hemianopsie, Hemiparese rechts, Kopfschmerzen
15	1969	fraglich	rezidivierende Kopfschmerzen
16	1981	fraglich	Kopfschmerzen, Parästhesie Hand/Gesicht links
17	1958	unbekannt	Fazialisparese
18	1965	unbekannt	symptomatische Epilepsie
19	1971	negativ	rezidivierende Kopfschmerzen
20	1959	unbekannt	unklar
21	2000	positiv	symptomatische Epilepsie, Parästhesie rechter Arm
22	1978	fraglich	Parästhesie Arm/Gesicht links, Kopfschmerzen
23	1967	unbekannt	unklar
24	1978	unbekannt	unklar
25	1971	negativ	unklar
26	1974	unbekannt	unklar
27	2011	positiv	unklar

3.3 SANGER-Sequenzierung und Beurteilung von drei Varianten im kodierenden Bereich und Intron 2 von *FAM222B*

Das Gen *FAM222B* besteht aus drei exonischen Sequenzbereichen, wovon jedoch nur Exon 2 und 3 kodierende Abschnitte für das aus 562 AS bestehende Protein enthalten. Dieser 1689bp große Bereich wurde in der vorliegenden Arbeit in 13 Amplikons unterteilt und analysiert. Das Startcodon ist am Ende des zweiten Exons lokalisiert; das Stopcodon befindet sich im dritten Exon (Abb. 3-2). Zusätzlich wurde die gesamte 3'-UTR sowie ausgewählte Bereiche der 5'-UTR, des

angrenzenden Introns 2 und des stromabwärts gelegenen Bereiches sequenziert, um auch in benachbarten Bereichen Mutationen zu detektieren.

Um beurteilen zu können, ob *FAM222B* bei Patienten mit zerebralen kavernösen Malformationen verändert ist, sollten Deletionen, Insertionen oder Substitutionen in homo- oder heterozygoter Form nachgewiesen werden. Die Sequenzierung wurde mit dem Programm SeqPilot ausgewertet. Es konnten drei Abweichungen von der Referenzsequenz detektiert werden (Abb. 3-2).

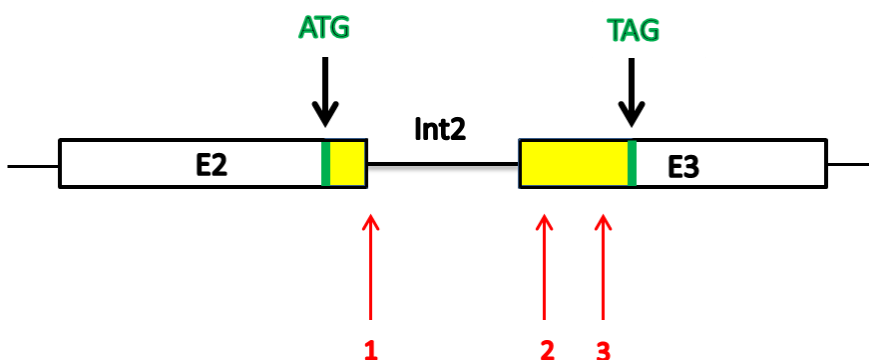


Abb. 3-2: Lokalisation der drei gefundenen Veränderungen in *FAM222B*: c.82+62C>T, c.542C>T; p.P181L und c.1413T>C; p.L471L

Eine genauere Charakterisierung dieser Veränderung erfolgte im Jahr 2013 anhand validierter Daten aus den Datenbanken ESP, 1000 Genomes, Ensembl, GeneCards[®], dbSNP, Alfred und NCBI. Ende 2014 erfolgte erstmals zusätzlich eine Beurteilung mit Hilfe der ExAC-Datenbank, die seit Oktober 2014 existiert und die Sequenzdaten von 60706 Exomen umfasst. Eine abschließende Kontrolle der ermittelten Daten wurde im März 2015 vorgenommen. Anhand von computergestützten Auswerteprogrammen wie PolyPhen-2, Mutation Taster und SIFT wurde die mögliche Konsequenz der SNPs auf das entstehende Protein überprüft. Die drei im Kandidatengen gefundenen Veränderungen waren bereits eingetragene Varianten mit dazugehörigen Identifikationsnummern (rs-Nummern).

Bei 26 der 27 Patienten wurde ein SNP detektiert, der durch die Identifikationsnummer rs9900141 beschrieben ist und an der Position 27093542 lokalisiert ist. Diese Veränderung entspricht einer Basensubstitution der Pyrimidinbase Cytosin durch Thymin in Intron 2: **c.82+62C>T**.

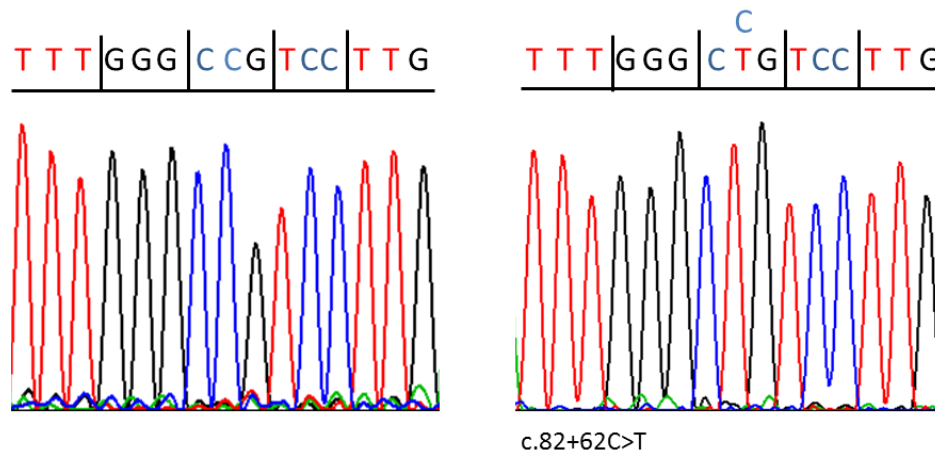


Abb. 3-3: Chromatogramme des homozygoten SNPs c.82+62C>T

Der Referenzsequenz (hg19) entsprechende Variante (CC-Allel) (links) und die homozygote Variante (TT-Allel) (rechts). Laut dbSNP entspricht jedoch das T-Allel dem Wildtyp, da es mit 71,2% wesentlich häufiger vorkommt. Somit entspricht die rechte Abbildung dem eigentlichen Wildtyp.

Die MAF (Minor Allele Frequency) gibt an, wie häufig das seltenere Allel in der gegebenen Population vorkommt und beträgt je nach Datenbank für das C-Allel: 21,98% (dbSNP, Quelle 1000Genomes), 21,38% (arithmetisches Mittel bei Europäern, Alfred) oder 24% (GeneCards®). Eine Recherche in dbSNP zeigt, dass Thymin als Wildtyp angesehen wird und zu 71,2% in der europäischen Bevölkerung auftritt. Die Genotypverteilung und die MAF bei den Indexpatienten und in den Gendatenbanken dbSNP, Alfred und GeneCards® zeigt die Tabelle 3-2. Die Werte wurden gemittelt, da für unterschiedliche europäische Kohorten verschiedene Allelfrequenzen und Genotyphäufigkeiten angegeben werden. Dementsprechend lässt sich auch die hohe Detektionsrate von 96,3% dieser Veränderung in der untersuchten Indexkohorte erklären. Bei den 27 Indexpatienten ergibt sich eine MAF von 33,3% für das C-Allel. Die Allelfrequenz des T-Allels ist dementsprechend 66,7%. Aufgrund des häufigeren Vorkommens des T-Allels in der europäischen Bevölkerung wird die Veränderung **c.82+62C>T** ab hier in dieser Arbeit als Wildtyp betrachtet. Eine Analyse zur möglichen Auswirkung dieser Variante auf die Proteinfunktion wurde mit dem Programm Mutation Taster durchgeführt. Erwartungsgemäß wurde dieser Basenaustausch als Polymorphismus und somit als nicht pathogen klassifiziert. Eine Veränderung in einer anliegenden Spleißregion konnte unter Verwendung der verschiedenen Vorhersageprogramme nicht bestätigt werden.

Tabelle 3-2: Genotyp (GT) und Minor Allele Frequency (MAF) von rs9900141 (c.82+62C>T)

	Indexpatienten	dbSNP	Alfred	GeneCards®
GT	TT=37% (10 Patienten)	TT=50,5%		
	TC=59,3% (16 Patienten)	TC=41,3%		
	CC=3,7% (1 Patient)	CC=8,2%		
MAF%	33,3 (C-Allel)	21,98	21,38	24

Von den 27 mutationsnegativen Indexpatienten der Studie wies einer die Variante **c.542C>T; p.P181L** in heterozygoter Form auf (Abb. 3-4). Diese ist an Position 27086435 (hg19) auf dem langen Arm von Chromosom 17 lokalisiert. Die Substitution von Cytosin zu Thymin befindet sich im kodierenden Genabschnitt und führt zu einem Aminosäureaustausch von Prolin zu Leucin an Position 181 und stellt somit eine Missense-Variante dar. In den Datenbanken ist diese Variante unter der Identifikationsnummer rs200961802 zu finden.

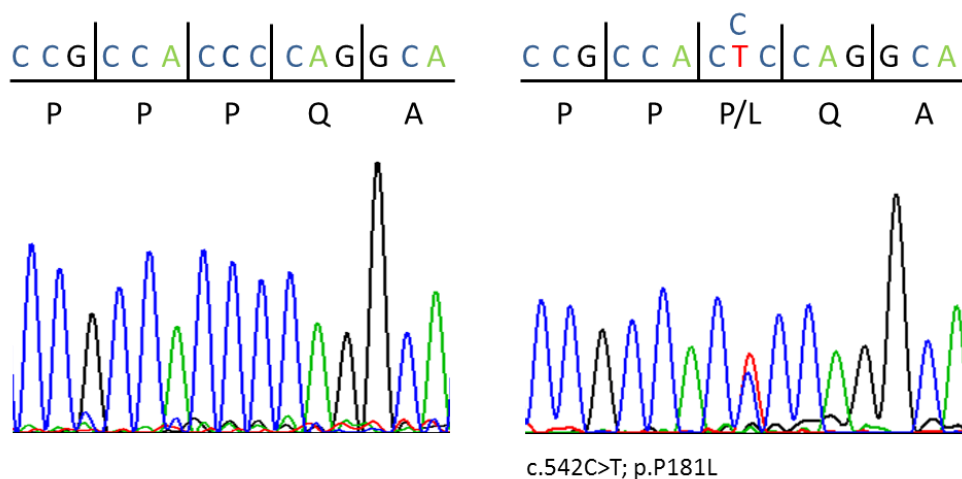


Abb. 3-4: Chromatogramme der heterozygoten Variante c.542C>T; p.P181L

Wildtypvariante (links) und heterozygote Variante (rechts) dargestellt.

Laut ESP tragen in einer untersuchten Kohorte von 12350 Probanden zehn das seltener vorkommende Allel Thymin heterozygot und 12340 die Base Cytosin homozygot an Position 542. Diese Verteilung unterscheidet sich hinsichtlich der Populationen zwischen Amerikanern mit afrikanisch ethnischen Hintergrund (AA, African American) und europäischen Amerikanern (EA, European American), bei denen das seltenere Allel deutlich häufiger vorkommt (9/8304). Dies entspricht einer MAF von 0,1084%. Bei der afrikanisch-amerikanischen Population ist es nur ein Fall unter 4046 analysierten Allelen und somit ergibt sich eine MAF von 0,0247%.

In der ExAC-Datenbank ist diese Missense-Variante mit einer durchschnittlichen MAF von 0,0928% angegeben. Von insgesamt 40945 Referenzprobanden unterschiedlicher ethnischer Herkunft waren 76 heterozygot für die Variante c.542C>T und 40869 homozygot für den Genotyp TT (Tabelle 3-3). ExAC gibt die Daten für Europäer, Afrikaner, Ost- und Südasiaten, Lateinamerikaner und andere, nicht weiter klassifizierte Kohorten an. Am häufigsten konnte das T-Allel bei nicht-finnischen Europäern (MAF 0,1032%) und bei Südasiaten (MAF 0,2448%) identifiziert werden. Die MAF der Afrikaner beträgt 0,03375% (Tabelle 3-3) und entspricht damit ungefähr den Angaben in ESP. Hinsichtlich des Genotyps ist kein homozygoter Träger des selteneren Allels bekannt.

Tabelle 3-3: Allelhäufigkeit von rs200961802 (c.542C>T; p.P181L) in der ExAC-Datenbank

Σ: Summe aller untersuchten Probanden, Allele: Allelverteilung der angegebenen Kohorte, GT: Genotyp

	Europäer (nicht-finnisch)	Afrikaner	Σ
Allele	T=50/C=48420	T=2/C=5924	T=76/C=81814
GT	TT=0	TT=0	TT=0
	TC=50 (0,21%)	TC=2 (0,07%)	TC=76 (0,19%)
	CC=24185 (99,79%)	CC=2961 (99,93%)	CC=40869 (99,81%)
MAF%	0,1032	0,03375	0,0928

Bekannt ist, dass eine Konservierung des Proteins im Bereich der Variante c.542C>T; p.P181L von 3,73 nach dem GERP-Score (Genomic Evolutionary Rate Profiling) (aus ESP) vorliegt. Dieser beginnt bei -12,3 und reicht bis zu einem Wert von 6,17 bei maximaler Konservierung, was somit eine relativ hohe Konservierung für das durch *FAM222B* kodierte Protein bedeutet. PolyPhen-2 stuft die AS-Substitution mit einem Score von 0,047 als benigne ein. Auch der SIFT-Score von 0,18 bewertet die Veränderung als nicht schädigend. Im Gegensatz dazu ergab die Beurteilung durch Mutation Taster, dass diese Variante mit 99-prozentiger Wahrscheinlichkeit krankheitsverursachend sein könnte. Alle drei Spleißstellenprädiktionsprogramme stufen eine Veränderung oder Entstehung einer Spleißstelle als unwahrscheinlich ein.

Sieben Indexpatienten (25,9%) sind heterozygote Merkmalsträger der Variante **c.1413T>C**; **p.L471L** und ein Proband (3,7%) trägt die Veränderung homozygot (Abb. 3-5). Hinsichtlich der Referenzsequenz hg19 in Sequence Pilot ist die Wildtyp-Variante das Allel mit der Base Thymin und wird durch ein Cytosin an der kodierenden Position 1413 ersetzt. Diese synonyme Variante führt nicht zu einem Austausch der Aminosäuren, da durch den degenerierten genetischen Code Leucin sowohl durch das Basentriplett CUU als auch durch CUC kodiert wird. In den Datenbanken ist die Variante unter rs2043031 zu finden.

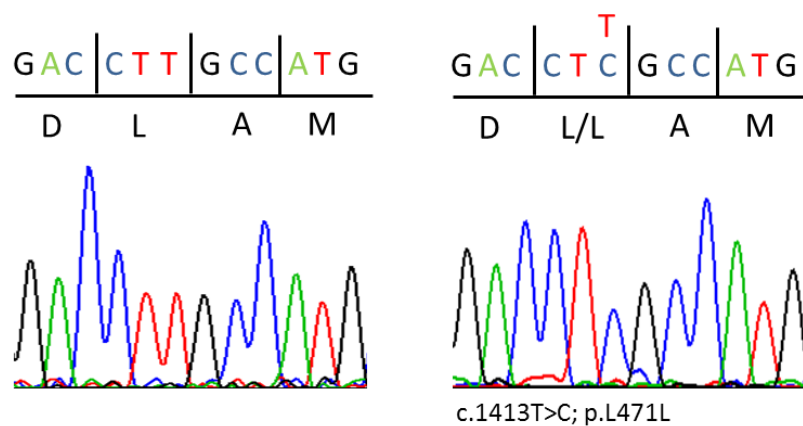


Abb. 3-5: Chromatogramme des homozygoten SNPs c.1413T>C; p.L471L
Wildtypvariante (links) und homozygote Variante (rechts) dargestellt.

Die Verteilung der Allele kann den Datenbanken entnommen werden. Laut ESP wurde bei einer Kohorte von 6133 Probanden in 2160 Fällen das seltenere Allel mit der Nukleotidbase C gefunden, was einer MAF von 17,61% entspricht. Es lässt sich ein gehäuftes Auftreten bei europäisch-amerikanischen Probanden im Gegensatz zu den Amerikanern afrikanischen Ursprungs erkennen. Die europäische Bevölkerung weist eine MAF von 19,31% auf. Bei den Afrikanischen Amerikanern (AA) lag die MAF bei 14,05%. Bei einer Kohorte mit gemischtem ethnischen Hintergrund nahm die MAF einen Wert von 18,4% (Ensembl) beziehungsweise 19% (GeneCards[®]) an. Betrachtet wurden bei GeneCards[®] die DNA von Europäern, Westafrikanern, Nordamerikanern, Ostasiaten und Probanden mit multi-nationalem Hintergrund. Eine Recherche bei dbSNP ergab eine MAF von 19,26% für Probanden mit europäischem Hintergrund. Die Genotypverteilung ist hier mit 3,1% für homozygote Träger des C-Allels angegeben, während heterozygote Genotypen in

32,3% der Fälle gefunden wurden. Die Werte sind durch die Mittelung aller angegebenen europäischen Kohorten entstanden.

In der Datenbank ExAC sind die Angaben den bereits oben genannten Populationen zugeordnet und die in Tabelle 3-4 angegebenen Werte für die Variante c.1413T>C; p.L471L aufgeführt. Von insgesamt 118440 untersuchten Allelen wurde 24910 Mal das C-Allel gefunden, was einer MAF von 21,03% entspricht. Die für Afrikaner angegebene MAF von 15,39% entspricht der MAF in ESP (14,0515%) und auch die Angaben für Europäer (18,39% beziehungsweise 19,49%) sind mit denen aus ESP und dbSNP vergleichbar. ExAC gibt die größte MAF für Südasiaten (31,91%) an. Die Angaben für Europäer in den Datenbanken sind vergleichbar mit denen in der Indexkohorte gefundenen Verteilungen.

Tabelle 3-4: Allelhäufigkeit und Genotypverteilung von c.1413T>C; p.L471L in der ExAC-Datenbank

Σ: Summe aller untersuchten Probanden, Allele: Allelverteilung der angegebenen Kohorte, GT: Genotyp

	Europäer (finnisch)	Europäer (nicht-finnisch)	Afrikaner	Σ
Allele	C=1213/T=5383	C=12716/T=52512	C=1433/T=7881	C=24910/T=93530
GT	CC=121 (3,67%)	CC=1214 (3,72%)	CC=107 (2,29%)	CC=2754 (4,65%)
	CT=971 (29,44%)	CT=10288 (31,55%)	CT=1219(26,18%)	CT=19402 (32,76%)
	TT=2206 (66,89%)	TT=21112 (64,73%)	TT=3331 (71,53%)	TT=37064 (62,59%)
MAF%	18,39	19,49	15,39	21,03

Dieser Nukleotidaustausch entspricht laut Mutation Taster mit einer Wahrscheinlichkeit von 99% einem Polymorphismus und hat somit mit einer großen Wahrscheinlichkeit keinen schädlichen Einfluss auf die Proteinfunktion. Die drei Spleißvorhersageprogramme finden keine signifikant veränderten Spleißmotive, weshalb die Veränderung wahrscheinlich keinen Einfluss auf das Spleißen hat.

Tabelle 3-5 zeigt den Vergleich der Genotypverteilung und MAF der europäischen Referenzkohorten mit denen der mutationsnegativen Indexpatienten. Dabei fällt auf, dass bezüglich der Veränderung c.82+62C>T die MAF der Indexpatienten mit denen der Datenbank dbSNP weitestgehend übereinstimmt. Für die Variante c.542C>T; p.P181L (b) sind sich die Angaben aus den Datenbanken und die der Indexpatienten sehr ähnlich. Beim SNP c.1413T>C; p.L471L (c) zeigt sich mit 3,7% eine identische Genotypverteilung für CC. Heterozygote Träger sind in

dieser Studie mit 22,2% seltener als in den europäischen Referenzpopulationen (Mittelwert aus dbSNP, ESP und ExAC: 31,68%) und auch die MAF ist mit 14,8% kleiner. Insgesamt sind die Genotypverteilung und MAF der 27 Indexpatienten jedoch mit denen der Datenbanken dbSNP, ESP und ExAC vergleichbar.

Tabelle 3-5: Vergleich Genotypverteilung und MAF zwischen Datenbanken und Patienten

TT/CT/TC/CC – Genotypverteilung in % für a) c.82+62C>T, b) c.542C>T; p.P181L, c) c.1413T>C; p.L471L; MAF – minor allele frequency

a)			b)		
	dbSNP	Indexpatienten	ESP	ExAC	Indexpatienten
TT	50,5	37	0	0	0
CT	41,5	59,3	0,2	0,21	3,7
CC	8	3,7	99,8	99,79	96,3
MAF%	28,8	33,3	0,1084	0,0928	1,85

c)				
	dbSNP	ESP	ExAC	Indexpatienten
CC	3,7	3,7	3,72	3,7
TC	32,2	31,3	31,55	22,2
TT	64,6	65	64,73	74,1
MAF%	19,26	19,3	21,03	14,8

In Tabelle 3-6 sind die bei den Indexpatienten gefundenen Veränderungen zusammengestellt. Es fällt auf, dass einige Indexpatienten (Nr. 1, 4, 7, 11, 12, 15, 17, 24 und 27) ausschließlich homozygote Veränderungen tragen beziehungsweise keine Abweichung von der Wildtyp-Sequenz zeigen (grau hinterlegt). Ein einziger Indexpatient (Nr. 21) zeigt zwei homozygote Veränderungen (fett markiert). Bezüglich der in Intron 2 gelegenen Veränderung c.82+62C>T (rs9900141) werden Patienten, die das T-Allel homozygot tragen, als Träger des Wildtypallels angesehen, da es wesentlich häufiger (71,2% laut dbSNP) in der europäischen Bevölkerung vorkommt.

Tabelle 3-6: Detektierte Veränderungen in *FAM222B* nach SANGER-Sequenzierung

Grau hinterlegt sind alle Probanden, die ausschließlich homozygote Veränderungen tragen. Dargestellt sind die jeweiligen Genotypen der Probanden an dieser Position.

Patient	Intron 2 c.82+62C>T rs9900141	Exon 3 c.542C>T; p.P181L rs200961802	Exon 3 c.1413T>C; p.L471L rs2043031
1	TT	CC	TT
2	TC	CC	TT
3	TT	CC	CT
4	CC	CC	TT
5	TC	CC	TT
6	TC	CC	CT
7	TT	CC	TT
8	TC	CC	TT
9	TC	CC	CT
10	TC	CC	TT
11	TT	CC	TT
12	TT	CC	TT
13	TC	CC	CT
14	TC	CC	TT
15	TT	CC	TT
16	TC	CC	TT
17	TT	CC	TT
18	TC	TC	TT
19	TC	CC	TT
20	TC	CC	CT
21	TT	CC	CC
22	TC	CC	CT
23	TC	CC	TT
24	TT	CC	TT
25	TC	CC	TT
26	TC	CC	CT
27	TT	CC	TT

3.4 SANGER-Sequenzierung der 3'-UTR von *FAM222B* und des downstream gelegenen Bereichs

Das ausschließliche Auftreten homozygoter Varianten in einem großen Genbereich kann ein Hinweis auf den heterozygoten Verlust von größeren Nukleinsäurebereichen sein. Um diese Hypothese bezogen auf die vorliegende Kohorte zu testen, wurden zunächst weitere SNPs in nicht-kodierenden Genabschnitten charakterisiert. Es erfolgte daher eine SANGER-Sequenzierung des

Bereiches stromabwärts von *FAM222B* (Abb. 3-6). Bei den Patienten, die außer der homozygoten Variante noch heterozygote Träger einer Veränderung waren, wurde die 3'-UTR nicht sequenziert, weil hier keine größeren Deletionen vermutet wurden. Dementsprechend wurden die Probanden 1, 4, 7, 11, 12, 15, 17, 21, 24 und 27 in die erweiterten Untersuchungen einbezogen. Die Auswahl entspricht den in Tabelle 3-6 grau hinterlegten Probanden.

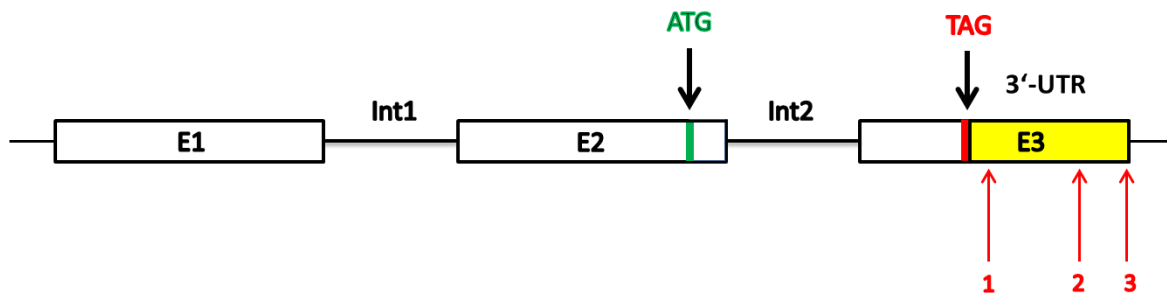


Abb. 3-6: Sequenzierter Bereich (3'-UTR und downstream-Bereich) von *FAM222B*

Lokalisationen des Startcodons (ATG, grün) und des Stopcodons (TAG, rot). Der sequenzierte Abschnitt in der 3'-UTR und im angrenzenden downstream-Bereich sind gelb markiert. 1-3: Lokalisation der detektierten Veränderungen.

Bei der Sequenzierung der 3'-UTR und des downstream-Bereichs von *FAM222B* wurden drei Varianten bei den Indexpatienten gefunden. Fett markiert ist ein weiterer nachgewiesener homozygoter SNP beim Patienten 21 (Tabelle 3-7).

Tabelle 3-7: Detektierte Varianten in der 3'-UTR und im downstream-Bereich nach SANGER-Sequenzierung

Patient	3'-UTR	3'-UTR	stromabwärts der 3'-UTR
	c.*1700G>A rs190603192	c.*64_*67delGTAA	c.*2290+60_*2290+62dupACA rs10666548
1	Wildtyp	heterozygot	Wildtyp
7	heterozygot	Wildtyp	Wildtyp
21	Wildtyp	Wildtyp	homozygot

Bei Indexpatient Nummer 7 wurde eine heterozygote Variante (rs190603192) gefunden, die einen Basenaustausch 1700 Nukleotide nach dem Stopcodon zur Folge hat, bei dem das Guanin durch Adenin ersetzt wird: **c.*1700G>A**. Dies ist laut Mutation Taster ein Polymorphismus ohne pathogenen Einfluss. Die MAF dieser Veränderung ist in den Gendatenbanken mit 0,05% (dbSNP) beziehungsweise 0,6% (1000 Genomes) angegeben. Bei diesem Patienten ist ein durch Verlust der

Heterozygotie gekennzeichnete Allelverlust des gesamten *FAM222B*-Gens somit unwahrscheinlich.

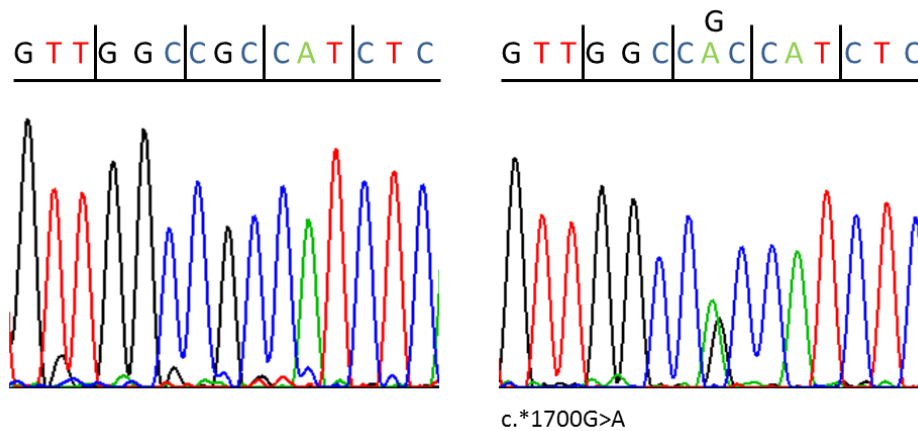


Abb. 3-7: Chromatogramme der heterozygoten Variante c.*1700G>A

Wildtypvariante (links) und heterozygote Variante (rechts) dargestellt.

Bei einem der mutationsnegativen, jedoch klinisch nicht gut charakterisierten Indexpatienten (Nr. 1, Tabelle 3-1) wurde eine Deletion detektiert, die bisher noch nicht in den Datenbanken zu finden ist: **c.*64_*67delGTAA**. Diese 4-Basenpaar-Deletion ist 64 Basen hinter dem Stopcodon in Exon 3 lokalisiert. Die Einstufung mittels Mutation Taster ergab, dass diese Deletion einen pathogenen Einfluss ausüben könnte. Laut der Vorhersage des HSF (Human Splicing Finder) ist eine Änderung des Spleißens nicht grundsätzlich auszuschließen, aber eher unwahrscheinlich.

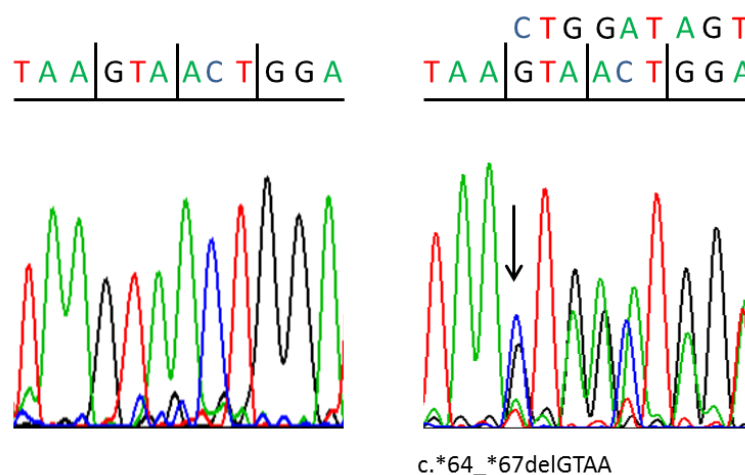


Abb. 3-8: Chromatogramme der heterozygoten Variante c.*64_*67delGTAA

Wildtypvariante (links) und heterozygote Variante (rechts) dargestellt.

Bei dem Patienten mit der Indexnummer 21 wurde eine weitere homozygote SNP detektiert: **c.*2290+60_*2290+62dupACA**. Dieser ist im Bereich stromabwärts der 3'-UTR lokalisiert und besteht aus einer Duplikation des Basentriplets ACA. In den Datenbanken ist diese Veränderung unter der ID rs10666548 registriert und mit einer MAF von 18,55% (dbSNP) oder 20,9% (1000 Genomes) angegeben.

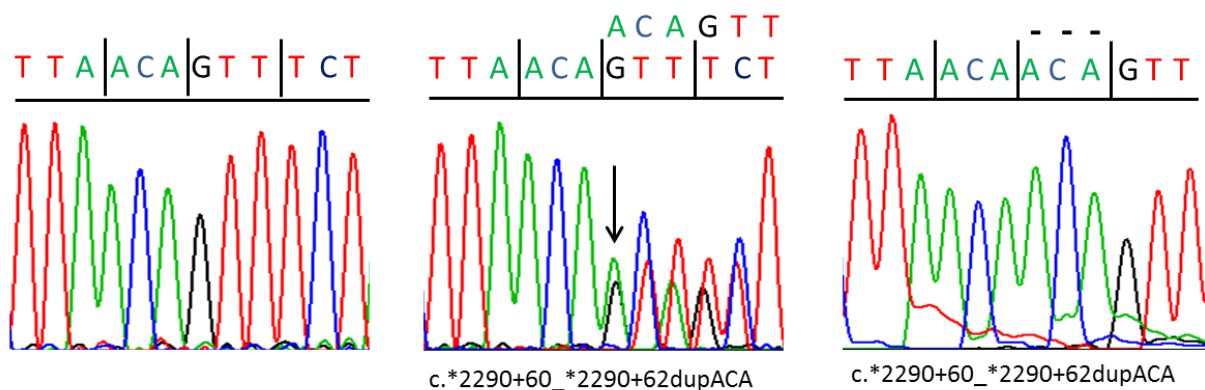


Abb. 3-9: Chromatogramme des SNPs c.*2290+60_*2290+62dupACA

Wildtypvariante (links), heterozygote Variante (Mitte) und homozygote Variante (rechts) dargestellt.

3.5 Quantitative PCR zur Detektion größerer Deletionen innerhalb von *FAM222B*

Da acht der 27 Patienten (Nr. 4, 11, 12, 15, 17, 21, 24 und 27) ausschließlich homozygote Veränderungen tragen, sollte anhand von genomischer Patienten-DNA untersucht werden, ob größere Deletionen in *FAM222B* bei den Patienten vorliegen. Solche deletierten Bereiche entgehen der SANGER-Sequenzierung, können jedoch mittels qPCR durch relative Quantifizierung ermittelt werden. Dies erfolgt durch den Vergleich der Ziel-DNA mit einer Referenz-DNA bei Einsatz gleicher Mengen.

Die qPCR erfolgte im Bereich stromauf- und stromabwärts der Variante c.1413T>C; p.L471L (Abb. 3-10). Die gewählten Primerpaare umfassen sehr kurze Sequenzabschnitte von 86 beziehungsweise 82 Basenpaaren. Dies ermöglichte eine PCR mit kurzen Elongationszeiten.

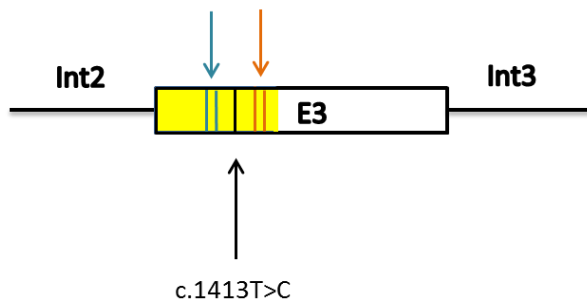


Abb. 3-10: Lage der Amplikons bei der quantitativen PCR für *FAM222B*

Amplikons upstream (blau) und downstream (orange) des SNP c.1413T>C; p.L471L (schwarzer Pfeil). Dieser wurde bei sieben der Indexpatienten in heterozygoter Form gefunden. Patient 21 trägt ihn homozygot.

Die qPCR wurde zunächst anhand der DNA des Indexpatienten 21 und dessen Angehörigen durchgeführt und im Anschluss auch bei allen weiteren Indexpatienten, die ausschließlich homozygote Veränderungen trugen (4, 11, 12, 15, 17, 24 und 27). Als Referenz-Gen wurde TBP (TATA-Bindeprotein) verwendet. Als Referenz-DNA diente die eines *CCM1-3*-mutationsnegativen Probanden (=NP 1), der nicht ausschließlich homozygote Veränderungen in *FAM222B* trug und somit eine große Deletion von *FAM222B* ausgeschlossen wurde. Der Vergleich der Ratios der Patienten mit der standardisierten Ratio der Normalperson 1 (NP 1, heterozygot für alle Varianten) zeigte keine Deletion eines Allels, weder im up- noch im downstream-Bereich der homozygoten Veränderung. Keine der Ratios wich signifikant von 1 ab, was in den nachfolgenden Tabellen 3-8 und 3-9 und den Abbildungen 3-11 und 3-12 aufgezeigt ist. Bei quantitativ verminderter DNA-Menge wären im Vergleich zur Normalperson mehr Zyklen nötig, um den C_p -Wert zu erreichen. Alle C_p -Werte in Tabelle 3-8 werden nahezu zur selben Zeit erreicht, also ist ungefähr dieselbe Anzahl an Zyklen nötig, um zu einer exponentiellen Vermehrungsphase zu gelangen. Dies spricht dafür, dass die DNA-Mengen quantitativ kaum einen Unterschied aufweisen und somit keine größere Deletion vorlag.

Tabelle 3-8: Ergebnis der qPCR beim Indexpatienten 21 und Angehörigen

a) DNA-Probe	<i>FAM222B</i> -upstream		Referenz-DNA		Ratio	
	C_p -Wert	σ	C_p -Wert	σ	Ziel/Ref.	σ
NP 1	25,85	0,08	24	0,05	1	
Pat 21	25,19	0,06	23,49	0,15	1,115	0,1178
Großmutter	25,18	0,01	23,45	0,09	1,097	0,0833
Tante	25,14	0,03	23,49	0,17	1,158	0,1287
Mutter	25,05	0,03	23,54	0,08	1,265	0,0907

b) DNA-Probe	<i>FAM222B</i> -downstream		Referenz-DNA		Ratio	
	C _p -Wert	σ	C _p -Wert	σ	Ziel/Ref.	σ
NP1	25,16	0,02	24	0,05	1	
Pat 21	24,52	0,02	23,49	0,15	1,096	0,0969
Großmutter	24,7	0,29	23,45	0,09	0,9445	0,1589
Tante	24,52	0,02	23,49	0,17	1,097	0,1101
Mutter	24,54	0,03	23,54	0,08	1,12	0,00634

σ: Standardabweichung: Maß für die Streuung der C_p-Werte beziehungsweise der Ratio um den Erwartungswert. NP 1: Normalperson 1.

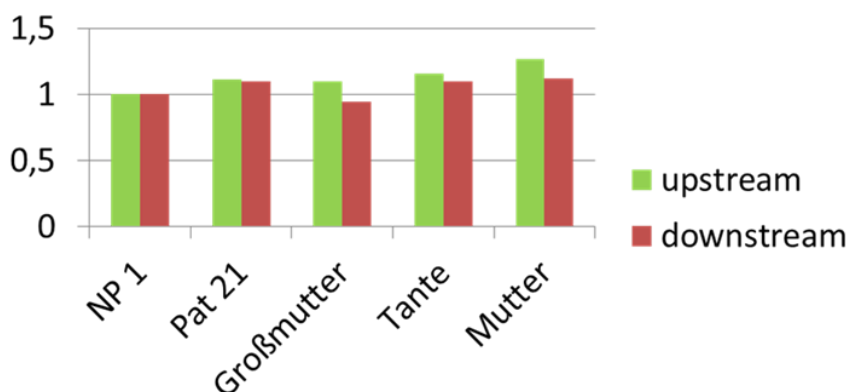


Abb. 3-11: Darstellung der Ergebnisse für den up (grün)- und downstream-Bereich (rot)

Auf der Ordinate in Abb. 3-11 und 3-12 ist jeweils die Ratio aufgetragen. Das Säulendiagramm (Abb. 3-11) zeigt das Ergebnis der qPCR anhand des Vergleichs der Ratios zwischen Normalperson und Indexpatient 21 und dessen Angehörigen. Es ist keine Reduktion der Ratio zu erkennen.

Tabelle 3-9 zeigt die Ergebnisse der qPCR der übrigen sieben Probanden. Auch hier sind sich die C_p-Werte ähnlich und keine Ratio weicht signifikant von 1 ab, was größere Deletionen in diesem Bereich ausschließt.

Tabelle 3-9: Ergebnis der qPCR bei homozygoten Indexpatienten

DNA-Probe	<i>FAM222B</i> -upstream		Referenz-DNA		Ratio	
	C _p -Wert	σ	C _p -Wert	σ	Ziel/Ref.	σ
NP1	25,61	0,05	24,25	0,08	1	
Pat 4	25,56	0,04	24,15	0,04	0,9595	0,0589
Pat 11	25,25	0,04	23,84	0,02	0,9568	0,054
Pat 12	25,07	0,07	23,72	0,09	0,9996	0,0843
Pat 15	25,33	0,14	23,99	0,06	1,007	0,1021
Pat 17	25,02	0,08	23,76	0,01	1,068	0,0719
Pat 24	25,4	0,08	24,78	0,06	1,026	0,0656
Pat 27	25,47	0,19	24,42	0,13	1,236	0,1767

Die Abbildung 3-12 zeigt das Säulendiagramm der Normalperson und der sieben Indexpatienten. Auch hier lässt sich keine verringerte Ratio erkennen. Da eine größere Deletion in *FAM222B* bei diesen Patienten somit unwahrscheinlich ist, wurde auf die Analyse des downstream-Bereichs verzichtet.

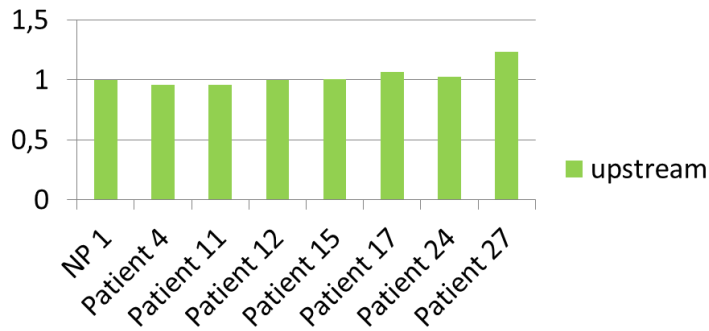


Abb. 3-12: Darstellung der Ergebnisse für den upstream-Bereich

3.6 Segregationsanalyse der homozygoten SNPs innerhalb der Familie von Indexpatient 21

Beim Screening konnten bei einem Indexpatienten (Nr. 21) zwei homozygote Varianten gefunden werden (Tabelle 3-6 und 3-7, fett markiert). Symptomatisch wurde dieser Patient bereits im Alter von elf Jahren mit einer einfach-fokalen Epilepsie, die durch zwei blutende Kavernome hervorgerufen wurde. Operativ entfernt wurde ein linksseitiges hoch parietal bis frontal gelegenes Kavernom mit einer Größe von 2cm im Durchmesser und eines von 0,5cm Durchmesser periinsulär temporal ebenfalls linkshemisphäriell lokalisiert. Die Großmutter und die Tante des Patienten sind ebenfalls MRT-gesicherte Träger von Kavernomen. Symptomatisch wurde die Tante des Indexpatienten durch eine Epilepsie, bei der Großmutter traten rezidivierende Kopfschmerzen und Parästhesien an Händen und Füßen auf. Die letzte Bildgebung erfolgte bei der Großmutter im Jahr 2008 im 7-Tesla-MRT in Essen. Diagnostiziert wurden drei große Kavernome im Hirnstamm, den Stammganglien, sowie 30 weitere kleine Kavernome. Aufgrund der ungeklärten genetischen Konstellation in dieser Familie sollte abschließend eine Segregationsanalyse erfolgen. Zur Verfügung standen drei weitere DNA-Proben aus dieser Familie (Abb. 3-13, orangene Pfeile). Die Mutter des Patienten könnte asymptotische Trägerin einer Mutation sein, da die Kavernomatose eine Penetranz von nur etwa 60% aufweist. Mittels Sequenzierung der entsprechenden Bereiche in der DNA der Angehörigen sollte überprüft werden, ob die Veränderungen (Tabelle 3-10) innerhalb der Familie segregieren.

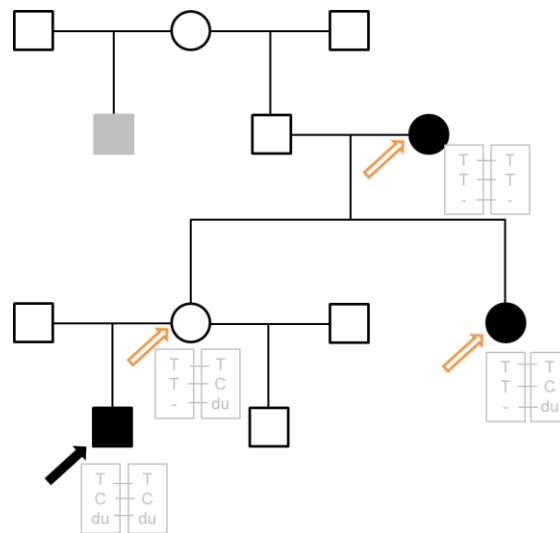


Abb. 3-13: Stammbaum der Familie des Indexpatienten 21 und Darstellung der Haplotypen

Gekennzeichnet sind der Indexpatient (schwarzer Pfeil) und die Angehörigen, die zur Segregationsanalyse herangezogen wurden (orangene Pfeile). Schwarz ausgefüllte Symbole kennzeichnen die von mindestens einer kavernen Läsion betroffenen Familienmitglieder. Grau gekennzeichnet ist die anamnestisch berichtete Epilepsie des Großonkels. Die Haplotypen der drei Varianten c.82+62C>T (TT entspricht dem Wildtyp), c.1413T>C; p.L471L und c.*2290+60_*2290+62dupACA sind jeweils grau dargestellt, du: Duplikation.

Tabelle 3-10: Ergebnis der Segregationsanalyse der SNPs

Proband	c.82+62C>T rs9900141	c.1413T>C rs2043031	c.*2290+60_*2290+62dupACA rs10666548
Patient 21	homozygot (WT)	homozygot	homozygot
Mutter	homozygot (WT)	heterozygot	heterozygot
Tante	homozygot (WT)	heterozygot	heterozygot
Großmutter	homozygot (WT)	Wildtyp	Wildtyp

Alle drei Angehörigen tragen bezüglich der Veränderung c.82+62C>T das T-Allel homozygot und werden somit als Träger des Wildtyp-Allels betrachtet. Die Veränderung c.1413T>C; p.L471L im Exon 3 ist ebenso wie die weiter stromabwärts gelegene 3-Basenpaar-Duplikation heterozygot in Mutter und Tante des Patienten zu finden. Die Großmutter ist Trägerin des Wildtyp-Allels. Am Haplotyp wird deutlich, dass der Indexpatient 21 nicht das großmütterliche Allel, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit von seiner Mutter das großväterliche *FAM222B*-Allel geerbt hat. Die Ergebnisse sind in Tabelle 3-10 zusammengestellt. Eine mögliche mit den CCMs in der Familie segregierende größere Deletion ist für den 3'-Bereich von *FAM222B* ausgeschlossen, da Heterozygotie vorliegt. Die gesamte genetische Konstellation in dieser Familie ist nicht eindeutig zu klären und bietet mehrere Interpretationsansätze, die in der Diskussion nochmals aufgegriffen werden.

4. Diskussion

Datenbankrecherchen und Auswerteprogramme

Das zur Zeit der Erarbeitung der vorgelegten Studie aktuelle Referenzgenom war das Human Reference Genome 19 (hg19) in UCSC (University of California Santa Cruz) beziehungsweise Genome Reference Consortium human genome 37 (GRCh37) in NCBI und den anderen Datenbanken. Die Assemblierung beider wurde von der DNA-Sequenzierung 13 anonymer Probanden aus Buffalo und New York abgeleitet. Dieses Referenzgenom dient in den Datenbanken zur Beschreibung von Mutationen und Polymorphismen. Die verwendeten Datenbanken beschreiben die DNA-Veränderungen jeweils in verschiedenen Referenzpopulationen, weshalb zur optimalen Validierung von *FAM222B* insgesamt acht verschiedene Datenbanken berücksichtigt wurden. Für die Beurteilung der Sequenzabweichungen muss die Unterscheidung der ethnischen Hintergründe der beschriebenen Populationen berücksichtigt werden. In dbSNP/NCBI, ESP, Alfred, GeneCards[®], 1000 Genomes, Ensembl und ExAC werden die Varianten für Probanden unterschiedlicher Abstammung unterschieden. In dbSNP beispielsweise liegen die Daten für zwei verschiedene Kohorten mit europäischem Hintergrund vor, ESP unterscheidet zwischen Amerikanern mit afrikanischem oder europäischem Hintergrund. Auch Alfred und GeneCards[®] nehmen eine Unterteilung in Kohorten unterschiedlicher Kontinente vor, hier findet man beispielsweise Daten für Afrikaner, Asiaten, Amerikaner und Europäer. ExAC gibt die Allel- und Genotypverteilung sowie die MAF für Europäer, Asiaten, Afrikaner und Lateinamerikaner an. Die in dieser Arbeit untersuchten Allelfrequenzen und Genotypen beziehen sich entsprechend der Indexpatienten auf Europäer. Den Vergleich der minoren Allelfrequenzen aus den acht verwendeten Datenbanken mit denen der mutationsnegativen Indexpatienten zeigt Tabelle 4-1. Es sind ausschließlich die MAF von europäischen Referenzkohorten angegeben. In den Spalten ohne eingetragene MAF liegen keine Daten für Europäer vor oder die Variante konnte nicht gefunden werden. Dabei fällt auf, dass bezüglich der Veränderung c.82+62C>T die MAF der Indexpatienten mit denen der Datenbanken dbSNP/NCBI/Alfred weitestgehend übereinstimmt. Bei der Variante c.542C>T; p.P181L ist die MAF der Indexkohorte mit 1,85% fast so gering wie in ESP und ExAC. Auch bei der Veränderung c.1413T>C; p.L471L sind die Ergebnisse vergleichbar. Die ExAC-Datenbank enthält Sequenzdaten von circa 60.000 Exomen und existiert seit Oktober 2014. Somit wurden diese Daten zu

Beginn dieser Studie (2013) noch nicht in die Validierung der gefundenen Varianten einbezogen. Hier erfolgte lediglich eine Bewertung durch die übrigen sieben Datenbanken (Tabelle 4-1). Mit der Einführung des ExAC relativiert sich die Bedeutung der validierten Mutation c.1651_1652delAG; p.R552Kfs*10, die ursprünglich bei Vater und Tochter mit bekannter CCM gefunden wurde und auf das *FAM222B*-Gen aufmerksam machte. Im Jahr 2013 war diese 2-Basenpaar-Deletion in keiner der sieben Datenbanken notiert und wurde somit als krankheitsursächlich für die Kavernome dieser beiden Indexpatienten in Erwägung gezogen. In der ExAC-Datenbank ist diese Veränderung mit der Identifikationsnummer rs748255395 drei Mal in 112612 Allelen gefunden worden, was einer MAF von 0,002664% entspricht.

Tabelle 4-1: Vergleich der MAF zwischen Datenbanken und Indexpatienten

MAF – minor allele frequency in % für c.1651_1652delAG, c.82+62C>T, c.1413T>C, c.542C>T

	MAF%			
	c.1651_1652delAG; p.R552Kfs*10	c.82+62C>T	c.542C>T; p.P181L	c.1413T>C; p.L471L
Indexpatienten	-	33,3	1,85	14,8
ESP	-	-	0,1084	19,3086
dbSNP	-	28,8	-	19,26
NCBI	-	28,8	-	19,26
Alfred	-	21,375	-	18,41
GeneCards®	-	-	-	23
Ensembl	-	-	-	-
1000 Genomes	-	-	-	-
ExAC (Okt. 2014)	0,002664	-	0,0928	21,03

Ursache für die leicht abweichenden Werte zwischen Referenzkohorten und Indexpatienten kann die geringe Größe unserer Kohorte sein. Die Vergleichbarkeit und Reliabilität der Daten wäre optimaler bei rein europäischen Referenzkohorten, wie es bei ExAC der Fall ist. Insgesamt können jedoch auch die Angaben der anderen Datenbanken mit eingeschränkter Aussagekraft betrachtet werden. Des Weiteren ist eine Abweichung von den Referenzkohorten möglich, da es sich bei den Probanden der vorliegenden Studie um Kavernompatienten handelt und nicht um gesunde Normalpersonen. Ein zusätzliches Problem besteht darin, dass die Referenzsequenzen nicht immer den tatsächlichen Wildtyp darstellen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Mehrheit gerade dieser untersuchten Referenzkohorte eine Variante aufweist, die real nicht dem Wildtyp entspricht, wie es bei der gefundenen

Veränderung c.82+62C>T der Fall war, die letztlich den Wildtyp darstellt und keine Veränderung ist.

Tendenziell lässt sich sagen, dass die Veränderungen - insbesondere c.82+62C>T und c.1413T>C; p.L471L - zu häufig in der Allgemeinbevölkerung vorkommen, als dass sie an der Entstehung der Kavernomatose beteiligt sein könnten. Insgesamt sind die Werte der Indexpatienten gut mit denen der europäischen Referenzkohorten vergleichbar. Diese Vergleichbarkeit mit den Daten von Normalpersonen ohne Kavernomatose spricht eher gegen die Kausalität dieser Varianten bezüglich der CCMs bei den mutationsnegativen Indexpatienten.

Die in dieser Arbeit verwendeten Auswerteprogramme Mutation Taster, SIFT und PolyPhen-2 sollten eine Prognose über die mögliche Konsequenz der Veränderungen in *FAM222B* auf das entstehende Protein liefern. Mutation Taster klassifiziert anhand drei verschiedener Modelle eine Veränderung in einem Gen entweder als „Polymorphismus“ oder als „krankheitsverursachende Mutation“. Wenn SNPs mit allen drei Genotypen in HapMap, oder mehr als viermal homozygot in TGP (1000 genome project) aufgelistet sind, werden sie automatisch als „Polymorphismus“ klassifiziert (Schwarz et al. 2010). Ebenso werden Veränderungen, die einen vorzeitigen Einbau eines Stopcodons bedingen und so zum NMD (nonsense-mediated mRNA decay) führen, fälschlicherweise generell als „krankheitsverursachend“ eingestuft (Schwarz et al. 2010). Wenn der Bayes-Klassifikator in diesen Fällen zu anderen Ergebnissen kommt, wird ein Wert von <0,5 in Mutation Taster angegeben (<http://www.mutationtaster.org/info/FAQs.html>, 25.04.2015). Ein Problem ist, dass homozygote Varianten als pathogen eingestuft werden, wenn sie noch nicht bei einem gesunden Probanden gefunden und in die Datenbanken eingetragen wurden. Des Weiteren induziert hier eine hohe angegebene Wahrscheinlichkeit nicht unbedingt eine hohe Wahrscheinlichkeit für die richtige Prognose. Die Klassifizierung hat damit ein erhöhtes Risiko falsch positive Vorhersagen zu treffen, als richtig positive zu übersehen, was dazu führt, dass SNPs häufiger als pathogen eingestuft werden (Schwarz et al. 2010).

Beim SIFT Algorithmus ist nachteilig, dass N- und C-terminale Bereiche durch das Alignment nicht optimal abgedeckt sind (Ng und Henikoff 2001) und auch hier die Rate der falsch positiven Ergebnisse relativ hoch ist (Ng und Henikoff 2002).

Bei PolyPhen-2 besteht wie bei den anderen Auswerteprogrammen das Risiko einer erhöhten falsch positiven Rate. Eine Studie von Adzhubei und Kollegen zeigte jedoch, dass PolyPhen-2 im Vergleich mit anderen Auswerteprogrammen (PolyPhen, SIFT, SNAP und SNPs3D) diesen hinsichtlich der Vorhersagewerte überlegen war. Bei einer falsch positiven Rate von 20% lag die richtig positive Rate je nach Gen bei 92% beziehungsweise 73% (Adzhubei et al. 2010).

Neben der erhöhten falsch positiven Rate kommt hinzu, dass PolyPhen-2 und SIFT nur AS-Substitutionen bewerten. In der hier vorgelegten Studie gab es nur einen AS-Austausch im kodierenden Bereich (c.542C>T; p.P181L), alle anderen Varianten waren entweder synonyme Varianten (c.1413T>C; p.L471L) oder in intronischen Genabschnitten, 3'-UTR-Bereichen und stromabwärts gelegenen Bereichen lokalisiert. Von den hier angewandten Vorhersageprogrammen bewertet ausschließlich Mutation Taster auch SNPs und Varianten, die Spleißstellen oder Polyadenylierungssignale betreffen. Somit wurde für den Großteil der Genvarianten nur ein Auswerteprogramm genutzt, welches zusätzlich noch mit einer relativ hohen Fehlerquote belastet ist. Aus diesem Grund sind die mittels Auswerteprogrammen erhobenen Daten lediglich als richtungsweisend und mit eingeschränkter Aussagefähigkeit zu betrachten (Tabelle 4-2).

Tabelle 4-2: Übersicht zur Prädiktion der verwendeten Auswerteprogramme

Genetische Variante	SIFT Score/Prädiktion	PolyPhen-2 Score/Prädiktion	Mutation Taster Score/Prädiktion	ExAC: Allelfrequenz
c.1651_1652delAG	-	-	kausal	0.00002664
c.82+62C>T	-	-	Polymorphismus	-
c.542C>T	0,18/tolerated	0,047/benign	kausal	0.0009281
c.1413T>C	-	-	Polymorphismus	0.2103

Möglicher Einfluss der genetischen Veränderungen auf die Proteinbildung

Im kodierenden Bereich von *FAM222B* wurden zwei verschiedene Veränderungen gefunden. Bei einem Indexpatienten konnte eine Missense-Variante an der Position c.542C>T gefunden werden, wodurch die Aminosäure Prolin durch ein Leucin ausgetauscht wird. Diese Veränderungen können die Funktion und Stabilität eines Proteins negativ beeinflussen oder zum vorzeitigen Abbau führen. Demzufolge ist es möglich, dass diese genetische Veränderung bei diesem Indexpatienten mit multiplen Kavernomen und symptomatischer Epilepsie

krankheitsrelevant ist. Die Tatsache, dass bisher kein homozygoter Träger dieser Veränderung bekannt ist und nur eine niedrige minore Allelfrequenz von 0,0928% (ExAC) vorliegt, unterstützt diese Annahme. Hinzu kommt, dass dieser DNA-Bereich sehr stark konserviert ist (Abb. 4-1 und GERP-Score von 3,73) und somit von Bedeutung für die Proteinfunktion ist. Die Prädiktionsprogramme SIFT und PolyPhen-2 bewerten die Variante jedoch als benigne.

Um die Pathogenität von Genveränderungen einschätzen zu können, ist die Betrachtung der Konservierung eines Proteins unerlässlich. Diese kennzeichnet den Erhaltungsgrad eines Gens im Verlauf der Evolution und damit die Ähnlichkeit und Verwandtschaft zwischen den verschiedenen Spezies. Man geht davon aus, dass hoch konservierte Bereiche evolutionär bedeutsamer sind als andere und Mutationen darin demzufolge eher einen pathogenen Einfluss haben als in nicht konservierten Bereichen (Abb. 4-1) (Vingron 2005).

Abbildung 4-1 (Waterhouse et al. 2009) stellt die Ähnlichkeit von *FAM222B* zwischen den Spezies Mensch, Chimpanse, Kuh, Maus und Zebrafisch dar. Die dunkelblau markierten Bereiche sprechen für eine starke Konservierung und damit für evolutionär bedeutendere Genabschnitte, in denen Mutationen durchaus pathogen sein könnten. Die Variante rs200961802 an Position c.542C>T; p.P181L (Pfeil) liegt in einem Bereich hoher Konservierung, wohingegen sich der SNP rs2043031 an Position c.1413T>C; p.L471L in einem Bereich sehr geringer Konservierung befindet. Hier haben Veränderungen wahrscheinlich weniger Relevanz. Dies bestätigt die bisherige Vermutung, dass die beim Indexpatienten 18 gefundene Missense-Variante (c.542C>T; p.P181L) im Gegensatz zu den übrigen SNPs ein möglicherweise pathologisches Potenzial aufweist und die genetische Grundlage für die Ausbildung zerebraler Kavernome beim Patienten darstellen könnte.

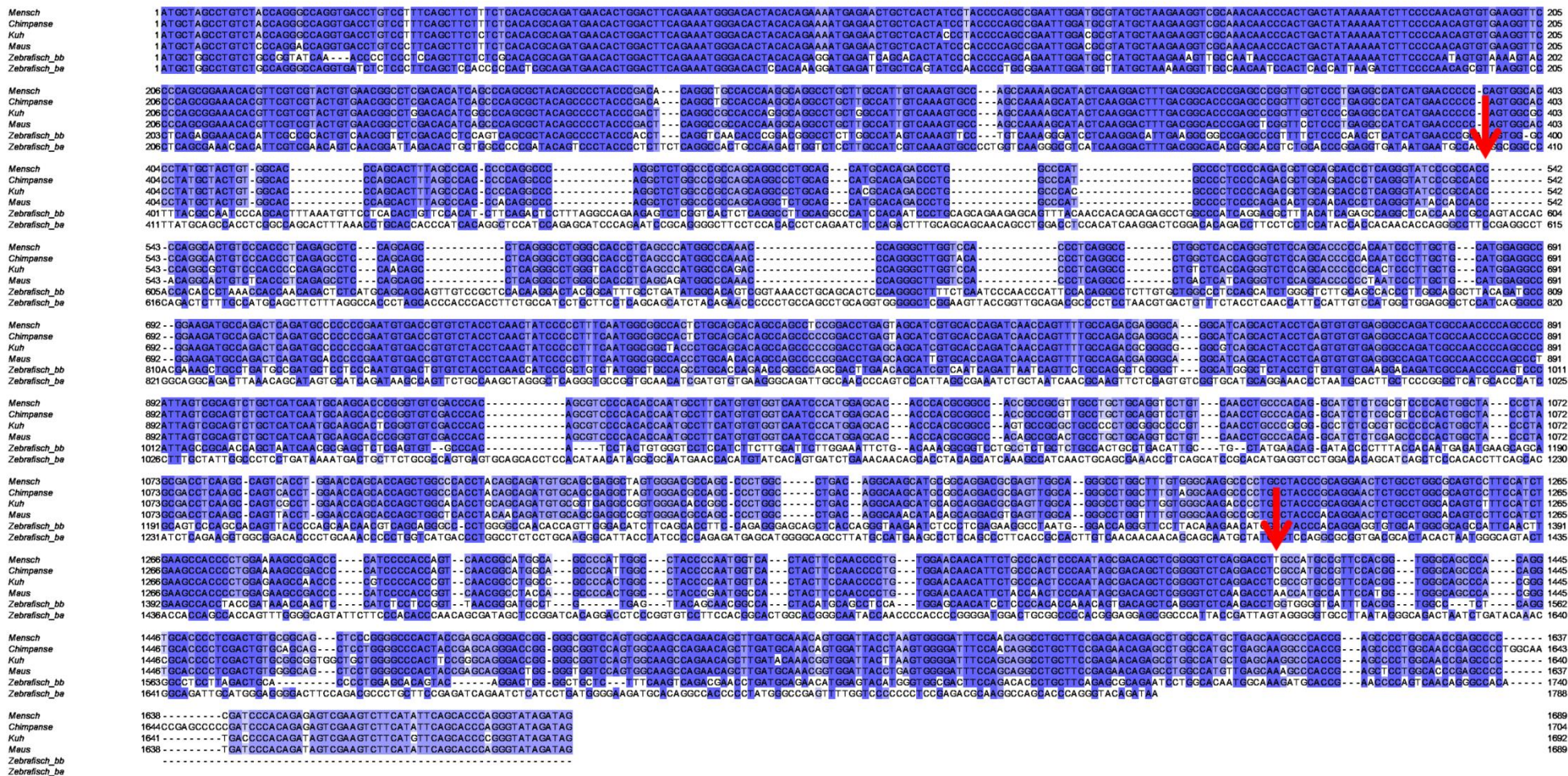


Abb. 4-1: Konservierung der cDNA von *FAM222B* (Ensembl; Jalview (Waterhouse et al. 2009); erstellt im Oktober 2014)

Das Alignment wurde für Mensch, Chimpanse, Kuh, Maus, sowie beide Duplikate des Zebrafischs erstellt. Dunkelblau gekennzeichnete Bereiche weisen eine hohe Konservierung auf, hellere Blautöne eine geringere Konservierung und weiß keine Konservierung. Die Pfeile markieren die Positionen der SNPs c.542C>T; p.P181L und c.1413T>C; p.L471L.

Der SNP c.1413T>C ist ein Basenaustausch, der nicht zum veränderten AS-Einbau führt und somit eine synonyme oder stille Variante darstellt. Es ist zwar bekannt, dass auch stille Mutationen krankheitsverursachend sein können, da sich die Faltung der mRNA auf dem Weg vom Zellkern zum Ribosom ändern kann und es somit zu Translationsfehlern kommt (Helmich 2015). Jedoch kann in diesem Fall bei einer hohen MAF von 21,03% (ExAC) nicht von Kausalität ausgegangen werden.

Neben den SNPs im kodierenden Abschnitt von *FAM222B* wurden auch zwei Veränderungen in der 3'-UTR gefunden: c.*1700G>A (rs190603192) und c.*64_*67delGTAA. Allgemein können Mutationen in der 3'-UTR von Genen, wie sie auch bei einigen der 27 Indexpatienten gefunden wurden, die Translationskontrolle beeinflussen oder sogar inhibieren (Mazumder et al. 2003). Die Translationskontrolle erfolgt durch Interaktion von microRNAs mit der 3'-UTR der mRNA. Je nach Komplementarität wird die Translation entweder inhibiert oder es erfolgt eine Degradation der mRNA (Wienholds und Plasterk 2005). Mazumder und Kollegen konnten beispielsweise die Interferon- γ -vermittelte Hemmung der Coeruloplasmin-Expression nachweisen. Dabei bindet der Interferon- γ -aktivierte Translationsinhibitor (GAIT) an ein Strukturelement in der 3'-UTR des *Coeruloplasmin*-Gens und führt somit zur Translationsinhibition (Mazumder et al. 2005). Inwieweit die detektierten Veränderungen in *FAM222B* einen pathogenen Effekt auf die Proteinbildung und letztlich auf die Ausbildung von Kavernomen haben, lässt sich bis dato nur schwer sagen. Vor allem die bis dahin mangelnden Informationen über die Domänenstruktur, Funktion und Bindestellen von *FAM222B* lassen konkrete Aussagen nicht zu.

Diskussion der genetischen Konstellation der Indexfamilie des Patienten 21

Die genetische Konstellation des Indexpatienten 21 und seiner Angehörigen nahm eine zentrale Rolle in der Erarbeitung dieser Studie ein und soll deshalb hier noch einmal aufgegriffen werden.

Möglicher Verlust der Heterozygotie und angewandte qPCR

Nachdem bereits 2005 der genaue Genlocus von *CCM3* durch ein Loss-of-Heterozygosity-Mapping ermittelt wurde (Bergametti et al. 2005), könnte dies auch bei einem vierten *CCM*-Gen der Fall sein. Das Vorkommen homozygot

erscheinender SNPs oder Mutationen bei einem Probanden kann ein Hinweis auf eine größere Deletion und damit einen Verlust der Heterozygotie sein. Eine solche heterozygote Deletion größerer Genabschnitte oder sogar des gesamten Gens könnte den Funktionsverlust des Proteins erklären.

Unter den 27 Patienten wurden bei dem Indexpatienten Nr. 21 (Tabelle 3-6 und 3-7, fett markiert) ausschließlich homozygote Varianten gefunden (c.1413T>C; p.L471L, c.*2290+60_*2290+62dupACA). Zum Nachweis größerer, zuvor nicht detektierter Genverluste und somit einem möglichen Nachweis des Verlustes der Heterozygotie als Ursache der Kavernomatose erfolgte eine quantitative Analyse. Durchgeführt wurde die qPCR beim Indexpatienten 21 und dessen Angehörigen (Mutter, Großmutter und Tante), ebenso wie bei allen weiteren Indexpatienten, die ausschließlich homozygot waren. Es konnte keine quantitative Verminderung im Gen *FAM222B* im Vergleich zu einer Normalperson nachgewiesen werden. Bei den Patienten wurde lediglich ein Bereich von 168 Basenpaaren um den SNP c.1413T>C; p.L471L untersucht, da hier ein Verlust von genetischem Material aufgrund der homozygoten Veränderung c.1413T>C; p.L471L beim Indexpatienten 21 am wahrscheinlichsten erschien. Durch die einheitliche Primerkonstruktion und Etablierung der qPCR für diesen Genabschnitt erfolgte die Analyse auch bei den anderen sieben Patienten in diesem Bereich. Somit ist auch mit diesem Ergebnis eine größere Deletion beim Indexpatienten 21 nicht eindeutig auszuschließen, da die Analyse nur für einen kleinen DNA-Abschnitt vom Kandidatengen erfolgte.

Segregationsanalyse in der Indexfamilie 21

Zur weiteren Abklärung der genetischen Konstellation in der Indexfamilie wurde die DNA des Indexpatienten und seiner Angehörigen (Mutter, Tante und Großmutter) einer Segregationsanalyse unterzogen (Abb. 3-13). Wie in den Ergebnissen beschrieben (Tabelle 3-10), tragen alle vier Familienmitglieder den Wildtyp TT an Position c.82+62C>T. Die beiden anderen Varianten wurden bei der Mutter und der Tante in heterozygoter Form gefunden, die Großmutter trägt jeweils den Wildtyp. Es erfolgte somit kein Segregationsnachweis für die SNPs c.1413T>C; p.L471L und c.*2290+60_*2290+62dupACA innerhalb der Familie. Eine mögliche mit den CCMs in der Familie segregierende größere Deletion ist für den 3'-Bereich von *FAM222B* somit ausgeschlossen, da Heterozygotie vorliegt.

Damit ist unwahrscheinlich, dass die Angehörigen des Indexpatienten von einem Verlust der Heterozygotie in *FAM222B* betroffen sind, der die Kavernomatose erklären könnte.

Die Mutter des Indexpatienten trägt dieselben heterozygoten Veränderungen wie ihre erkrankte Schwester (Tabelle 3-10). Bei der variablen Expressivität und unvollständigen Penetranz der CCMs ist es möglich, dass sie asymptomatische Kavernomträgerin ist (Abb. 3-13). Ob bildmorphologisch mittels MRT ein Kavernomnachweis oder -ausschluss bei der Mutter erfolgte, ist nicht bekannt. Anamnestisch berichtet wurde auch eine Epilepsie des Großonkels (Abb. 3-13, grau markiert). Er wurde jedoch nie bild- oder molekulardiagnostisch untersucht. Am Haplotyp (Abb. 3-13) wird deutlich, dass der Indexpatient 21 nicht das großmütterliche Allel, sondern mit großer Wahrscheinlichkeit von seiner Mutter das großväterliche *FAM222B*-Allel geerbt hat. Da die Großmutter MRT-gesicherte Trägerin von drei großen und 30 kleineren Kavernomen ist, sie jeweils den Wildtyp für die untersuchten Varianten trägt, ist es sehr unwahrscheinlich, dass *FAM222B* bei ihr die Ursache für die Kavernomatose ist. Aufgrund der ausgeprägten MRT-Befunde wird in dieser Familie jedoch weiterhin von einer hereditären Kavernomatose ausgegangen. Theoretisch denkbar ist in der Indexfamilie auch das Vorkommen zweier voneinander unabhängiger Mutationen, da sowohl die mütterliche als auch die väterliche Seite der Mutter möglicherweise von CCMs betroffen sind.

Weitere mögliche Ursachen für Mutationsnegativität in der Indexfamilie 21

Mutationen in intronischen Bereichen

Wieviel Einfluss Veränderungen in intronischen Bereichen ausüben, kann nicht mit Sicherheit geklärt werden. Bekannt ist, dass Mutationen in Introns Spleißstellen betreffen können, die nachfolgend veränderte mRNAs hervorbringen und so zur fehlerhaften Translation führen. Ein bekanntes Beispiel hierfür ist die β -Thalassämie, bei der Mutationen in intronischen Bereichen zu einem veränderten Spleißen führen (Iida 1993). Auch bei den CCM-Genen spielt dieser Mechanismus eine Rolle. Stahl und Kollegen fanden, dass Spleißmutationen in hochkonservierten Bereichen fast 20% aller identifizierten CCM-Mutationen ausmachen. Beispielsweise führte eine Mutation am 3'-Ende des Intron 2 von

CCM2 zur Nutzung einer kryptischen Spleißakzeptorstelle und letztlich zum vorzeitigen Einbau eines Stopcodons (Stahl et al. 2008). Es wurden jedoch nicht alle intronischen Bereiche untersucht. Bei Patienten mit zerebrovaskulären Erkrankungen können gelegentlich hereditäre hämorrhagische Teleangiektasien (HHT) gefunden werden. Eine gefürchtete Komplikation der HHTs sind pulmonale arteriovenöse Malformationen (PAVM), welche zu embolisch bedingten Schlaganfällen führen können. Bei einer japanischen Familie mit PAVM wurde kürzlich eine heterozygote Mutation im intronischen Bereich des Gens *ENG* (*Endoglin*) identifiziert: c.360+4delAGTG. Diese führte zu einer in-frame-Deletion von Exon 3 und damit zu einem verkürzten ENG-Protein (Saji et al. 2015). Die Relevanz von intronischen Veränderungen bei anderen Gefäßmalformationen, wie zum Beispiel der PAVM, zeigt, dass diese möglicherweise auch bei den CCMs Bedeutung haben könnten. Da bei der SANGER-Sequenzierung von *FAM222B* nur ein Bereich von ungefähr 100 Basenpaaren von Intron 2 untersucht wurde, ist eine den Spleißvorgang betreffende Mutation in tiefen intronischen Bereichen nicht sicher auszuschließen. Ebenso sind intronische Mutationen auch für *CCM1-3* als Ursache für zerebrale Kavernome in Betracht zu ziehen.

Neben intronischen Mutationen, die nicht standardmäßig überprüft werden, sind es auch Promotorregionen oder die UTRs, die nicht analysiert werden und damit möglicherweise kausale Mutationen in diesen Bereichen nicht detektiert werden. So könnte die Ursache der Kavernomatose bei der Indexfamilie dennoch in *CCM1-3* liegen, obwohl bei der Standardstufendiagnostik Mutationsnegativität festgestellt wurde.

Genomische Rearrangements

Genomische Rearrangements umfassen Insertionen, Deletionen, Duplikationen und Translokationen. Diagnostiziert wurden genomische Rearrangements in Familien mit hereditärem Brust- und Ovarialkarzinom (HBOC) (Fachal et al. 2014). Die Deletion oder Insertion von DNA-Sequenzen im kodierenden Bereich führt beispielsweise zu Translationsfehlern und damit zum Funktionsverlust des Proteins (Preisler-Adams et al. 2009). Sowohl in *BRCA1* als auch in *BRCA2* sind solche Rearrangements bekannt (Hansen et al. 2009). Woodward und Kollegen konnten 2005 bei Patienten mit hereditärem Brust- und Ovarialkarzinom nachweisen, dass Rearrangements in *BRCA1* häufiger bei

Patienten vorkommen, die sowohl an einem Mammakarzinom als auch an einem Ovarialkarzinom leiden. Außerdem zeigten die Patienten mit einem genomischen Rearrangement in *BRCA1* ein jüngeres Erkrankungsalter. *BRCA2*-Mutationen kamen vor allem in Familien mit mindestens einem männlichen Patienten mit Brustkrebs vor (Woodward et al. 2005). Da die DNA-Sequenzierung keine quantitative Detektionsmethode ist, können solche großen genomischen Rearrangements im normalen Screening übersehen werden (Armour et al. 2002). Auch im Fall der Indexfamilie wäre ein Vorkommen von Rearrangements möglich, welche mit der bisherigen Diagnostik nicht detektiert werden können.

Weitere allgemeine mögliche Ursachen für Mutationsnegativität

Stufendiagnostisch nicht detektierte Mutationen in *CCM1*, 2 und 3

Neben der Vermutung, dass weitere Gene existieren, in welchen Mutationen zur Ausbildung von kavernösen Malformationen führen, gibt es noch andere Erklärungsansätze für eine erfolglose Mutationssuche in *CCM1*, 2 und 3. So könnten die verbliebenen 13% der klinisch auffälligen und mutationsnegativen Patienten mit positiver Familienanamnese beispielsweise durch Mutationen bedingt sein, die in der Standarddiagnostik unentdeckt bleiben.

Die Standarddiagnostik besteht neben der MRT-Bildgebung in einer molekulargenetischen Stufendiagnostik, wie sie bereits in der Einleitung beschrieben wurde. Da die Sequenzierung der kompletten Gene zu zeit- und kostenintensiv wäre, beschränkt man sich lediglich auf die proteinkodierenden Abschnitte. Im *CCM1*-Gen sind das die Exons 5-20, in *CCM2* 1-10 und in *CCM3* 4-10. Die restlichen nicht proteinkodierenden Exons in *CCM1* und 3 werden nicht analysiert ebenso wie Promotorregionen, intronische Bereiche oder die 3'-UTR, die Einfluss auf Transkription und Translation haben können. Dies führt dazu, dass einige Patienten als mutationsnegativ für *CCM1*, 2 und 3 eingestuft werden, obwohl die Krankheitsursache möglicherweise in einem dieser Gene liegt, nur stufendiagnostisch nicht erfasst wurde. Ebenso können solche Bereiche bei der Sequenzierung von *FAM222B* der hier untersuchten Kohorte unentdeckt geblieben sein.

Somatische Mosaik

Somatische Mutationen treten postzygotisch während der mitotischen Zellteilung auf und führen zu somatischen Mosaiken. Damit wird es möglich, dass sich pathogene genetische Veränderungen nur lokal im betroffenen Gewebe, nicht jedoch in den standardgemäß untersuchten Leukozyten nachweisen lassen und somit gar nicht detektiert werden. So ergaben Untersuchungen einen unterschiedlichen DNA-Status im Blut und Gehirn bei Alzheimer Patienten bezüglich vorkommender SNVs (single nucleotide variations) (Parcerisas et al. 2014). In einer anderen Studie lag der Anteil somatischer Mutationen im *Presenilin-1*-Gen bei einem Alzheimer Patienten bei 8% in den peripheren Lymphozyten und 14% im Zerebralkortex (Beck et al. 2004). Auch bei der Parkinson Erkrankung wird angenommen, dass somatische Mutationen in Zellen des ZNS vorliegen und die krankheitsursächlichen dopaminergen Neurone betreffen und somit auch ohne Keimbahnmutation zur Erkrankung führen (Han-Joon und Beom 2014).

Außer bei Parkinson (Han-Joon und Beom 2014) und Alzheimer (Parcerisas et al. 2014; Beck et al. 2004) wurde über somatische Mosaik ebenso bei der hereditären spastischen Paraplegie im Gen *SPG4/SPAST* (Depienne et al. 2007) und bei einem isolierten Fall der Creutzfeldt-Jakob Krankheit berichtet (Alzualde et al. 2010). Identifiziert wurden somatische Mosaik zum Beispiel auch beim Rett-Syndrom (Armstrong et al. 2001; Pieras et al. 2011; Topçu et al. 2002), beim Morbus Huntington (Hashida et al. 2001; Swami et al. 2009) und der Friedreich-Ataxie (Montermini et al. 1997).

Das Vorkommen biallelischer somatischer Mutationen, die durch eine Knudson'sche Zwei-Treffer-Hypothese zu erklären sind, ist auch für die zerebralen Kavernome bekannt (Akers et al. 2009; Gault et al. 2005; Kehrer-Sawatzki et al. 2002). Die Knudson'sche Zwei-Treffer-Hypothese wurde zusätzlich durch immunhistologische Untersuchungen unterstützt (Pagenstecher et al. 2009). In zerebralen Läsionen von Patienten mit isolierten CCMs wurden somatische Mosaik in den *CCM*-Genen erst später identifiziert (Mc Donald et al. 2014). Von Patienten mit negativer Familienanamnese wurden elf chirurgisch exzidierte Kavernome untersucht. Vier von ihnen wiesen neue somatische Mutationen auf, dabei hatten drei eine einzelne somatische Mutation und eine Läsion beinhaltete

zwei biallelische somatische Mutationen (Mc Donald et al. 2014). Der Nachweis einer somatischen Mutation ist nur schwer realisierbar, da DNA aus dem oftmals kalzifizierten Kavernomgewebe zur Analyse benötigt wird. Innerhalb des Kavernomgewebes trägt nur ein kleiner Anteil der Zellen die Mutation, wohingegen umliegende nicht-endotheliale Zellen intakt sein können. Diese Heterogenität des Vorkommens von somatischen Mutationen in zerebralem Gewebe zeigte auch die Publikation von Lodato und Kollegen (Lodato et al. 2015). Mittels Einzelzell-Sequenzierung wurden 36 Neuronen von drei verschiedenen Patienten untersucht und in jedem Neuron jeweils zwischen 1458 und 1580 somatische SNVs (single nucleotide variants) gefunden. Diese kamen mit einer unterschiedlichen Häufigkeit in den unterschiedlich lokalisierten Neuronen des Kortex vor. Entscheidend ist hier die Entstehung während der Entwicklung, früh aufgetretene Mutationen sind prozentual in mehr Zellen zu finden als später aufgetretene Mutationen. Aufgrund dieser Tatsache kann eine Diagnostik trotz Probeentnahme aus dem betroffenen Gewebe negativ ausfallen, obwohl eine somatische Mutation vorliegt. Insgesamt konnte gezeigt werden, dass Gene, die eine wichtige Funktion im menschlichen Gehirn ausüben, häufiger somatische SNVs tragen und somit anfälliger für Mutationen sind (Lodato et al. 2015). Diese entstehen bei den postmitotischen Zellen transkriptionsabhängig, im Gegensatz zu SNVs in der Keimbahn oder in Krebszellen, welche abhängig von der Replikation einer Zelle entstehen (Lodato et al. 2015). Geht man davon aus, dass solche somatischen Mutationen in Form von Endothelzellmosaiken auch für *FAM222B* vorkommen könnten, wären diese mittels SANGER-Sequenzierung von Leukozyten-DNA nicht detektiert worden.

Uniparentale Isodisomie

Unter uniparentaler Isodisomie (UPD) versteht man die Duplikation eines mutierten Allels als Kompensationsversuch bei Verlust des Wildtyp-Allels mit der Folge eines Funktionsverlustes oder einer Funktionsänderung. Dementsprechend stammen dann beide Allele von einem Elternteil (Robinson 2000). Eine zur Zeit der Erarbeitung dieser Dissertation veröffentlichte Publikation beschreibt die Identifizierung von somatischen uniparentalen Isodisomien als Ursache der glomuvenösen Malformationen (GVM) (Amyere et al. 2013). Diese treten, wie auch die CCMs, multifokal mit variabler Expressivität und unvollständiger Penetranz auf. Daher vermuteten Vikkula und Kollegen, dass das Knudson'sche

Zwei-Treffer-Modell hier eine Rolle spielen könnte. Bei Patienten mit demselben Genotyp hinsichtlich der Keimbahnmutation zeigten sich unterschiedliche Phänotypen, was eine zweite somatische Mutation vermuten ließ, die in Glomuszellen durch Laser-Mikrodissektion bei 16 von 28 Patienten nachgewiesen werden konnte. Darunter waren 17,65% Deletionen und 11,75% Punktmutationen. Die häufigste Form stellten jedoch die UPD mit 70,6% in Chromosom 1p dar (Amyere et al. 2013). Diese entstehen als Duplikation des mutierten Allels bei Verlust des Wildtyp-Allels, ohne einen quantitativen Verlust von Genen zu verursachen. Wie auch beim Knudson'schen Zwei-Treffer-Modell liegen die UPD als somatische Mosaik vor und sind somit schwer zu identifizieren. Der Verlust der Heterozygotie durch Isodisomie oder eine zweite somatische Mutation in den Glomuszellen erklärt die klinische Variabilität dieser Gefäßmalformationen. Die Äquivalenz des Erbganges mit variabler Expressivität und unvollständiger Penetranz, ebenso wie das multifokale Auftreten lassen das Vorkommen von UPD auch bei den CCMs vermuten.

Neumutation

Auch das Auftreten einer Neumutation in der elterlichen Keimbahn in den drei bekannten CCM-Genen oder im Kandidatengen *FAM222B* wäre denkbar. Diese wäre dann nur in der DNA des Patienten nachweisbar, nicht jedoch bei den Angehörigen. Neumutationen wurden für die Gene *CCM1-3* bislang nur sehr selten experimentell eindeutig belegt (Bergametti et al. 2005; Stahl et al. 2008).

Phänokopien

Des Weiteren ist das seltene Vorkommen von Phänokopien zu beachten. Bei Phänokopien werden bestimmte Erscheinungsbilder hervorgerufen, die dem jeweiligen Krankheitsbild stark ähneln, jedoch einzig und allein durch den Einfluss eines Umweltreizes zu einem bestimmten Zeitpunkt der Entwicklung hervorgerufen wurden und nicht durch vererbte Mutationen in den ursächlichen Genen. Ein bekanntes Beispiel dafür ist die Thalidomid-Embryopathie, die sich beispielsweise wie der Phänotyp des Holt-Oram-Syndroms darstellt (Van Regemorter et al. 1982). Symptome wie Dismelie, Phokomelie und Aplasien ganzer Gliedmaßen wurden durch die Einnahme von Thalidomid während der Schwangerschaft in den 1960er Jahren hervorgerufen. Ähnliche Symptome zeigen

beispielsweise auch das Okihiro-Syndrom und das Akro-reno-okuläre-Syndrom, die jedoch durch Mutationen im *SALL4*-Gen (SalLike Protein 4) auf Chromosom 20 hervorgerufen werden (Kohlhase et al. 2003).

***FAM222B* – ein fragliches Kandidatengen für zerebrale kavernöse Malformationen**

Ziel der Arbeit war eine Überprüfung des Kandidatengens *FAM222B* bezüglich der möglichen Relevanz für die Ausbildung zerebraler kavernöser Malformationen. Anlass war eine 2-Basenpaar-Deletion mit nachfolgender Leserasterverschiebung in *FAM222B* bei einem betroffenen Vater und seiner Tochter. Die im Rahmen dieser Studie gefundenen Veränderungen in *FAM222B* zeigten sich insgesamt eher als SNPs oder Varianten und nicht als eindeutige Mutationen. Die MAF der SNPs entspricht größtenteils denen gesunder europäischer Referenzprobanden und ein eindeutiger Einfluss auf die Proteinbildung war nicht erkennbar. Bei 25 der 27 Patienten wurde keine eindeutig pathogene Mutation nachgewiesen. Bei den anderen beiden Patienten sind die Veränderungen in *FAM222B* als fraglich hinsichtlich ihrer Auswirkung zu betrachten. Bei Patient 18 besteht die Möglichkeit einer Kausalität zwischen der Missense-Variante (c.542C>T; p.P181L) und der klinischen Symptomatik, da deutbar ist, dass diese die Funktion und Stabilität des Proteins negativ beeinflussen oder zum vorzeitigen Abbau führen kann. Ebenso interessant wie fraglich ist der Befund des Patienten 21 und seiner Angehörigen. Das Vorliegen von zwei homozygoten Veränderungen konnte bei keinem anderen Patienten festgestellt werden und könnte auf einen Verlust der Heterozygotie hindeuten, welche aber durch die quantitativen Analysen nicht bestätigt werden konnte. Eine größere Deletion beim Indexpatienten 21 ist somit unwahrscheinlich, lässt sich aufgrund der geringen Größe des quantitativ untersuchten DNA-Abschnittes aber nicht eindeutig ausschließen. Trotz einiger Erklärungsansätze für die Mutationsnegativität in *FAM222B* in der Indexfamilie ist dieses Kandidatengen eher nicht als Ursache der hereditären Kavernomatose zu betrachten. Auch in Bezug auf die gesamte untersuchte Kohorte und in Zusammenschau der Ergebnisse konnte keine Evidenz für eine Assoziation von *FAM222B* mit den CCMs gefunden werden.

Unterstützt wird diese Annahme durch funktionale Untersuchungen von *FAM222B* im Rahmen der Promotion von Stefanie Spiegler. Weder in Talen-induzierten mutierten Zebrafischlinien, noch in einem in vitro Angiogenese-Assay ließ sich eine funktionelle Bedeutung von *FAM222B* in der Angiogenese belegen (Spiegler et al. eingereicht).

5. Zusammenfassung

Nach der Identifizierung einer Frameshift-Mutation im *FAM222B*-Gen im Rahmen einer Exomstudie bei einem familiären Fall sollte in der vorliegenden Arbeit die Hypothese geprüft werden, ob das Gen *FAM222B* im mutierten Zustand zerebrale kavernöse Malformationen verursachen kann. Mittels SANGER-Sequenzierung des kodierenden Abschnitts sollte geklärt werden, ob bei weiteren für *CCM1-3* mutationsnegativen Kavernompatienten kausale Mutationen in *FAM222B* vorliegen. 2013 waren in *FAM222B* zwar Missense- und synonyme Varianten bekannt, jedoch keine Loss-of-Function-Mutationen. Als Ergebnis der hier durchgeführten Sequenzierung wurden sowohl im kodierenden als auch im nicht-kodierenden Bereich zwar seltene oder nicht beschriebene Varianten identifiziert. Der Abgleich mit Referenzdatenbanken und die bioinformatische Bewertung ließen deren Einfluss jedoch unwahrscheinlich erscheinen. Ein weiterer Schwerpunkt dieser Arbeit war die quantitative Untersuchung des *FAM222B*-Gens zum Nachweis von größeren Deletionen. Auch hier konnten jedoch keine größeren Allelverluste nachgewiesen werden. Letztlich konnte bei keinem der 27 mutationsnegativen Indexpatienten eine sicher kausale Mutation in *FAM222B* identifiziert werden. Die gefundenen Genvarianten sind nicht als ursächlich für die Ausbildung von zerebralen Kavernomen zu werten. In Zusammenschau des Datenbankabgleiches mit aktuellen Vergleichskohorten, der bioinformatischen Bewertung, der quantitativen Analyse und der parallel durchgeführten in vivo Studie gibt es keine sichere molekulargenetische Evidenz für *FAM222B* als neues Kandidatengen für zerebrale kavernöse Malformationen.

Literaturverzeichnis

- Adzhubei, IA; Jordan, DM; Sunyaev, SR (2013). Predicting functional effect of human missense mutations using PolyPhen-2. In: *Curr. Protoc. Hum. Genet.*, Chapter 7.
- Adzhubei, IA; Schmidt, S; Peshkin, L; Ramensky, VE; Gerasimova, A; Bork, P; Kondrashov, AS; Sunyaev, SR (2010). A method and server for predicting damaging missense mutations. In: *Nat. Methods*. 7 4, S. 248-249.
- Adzhubey, IA. PolyPhen-2 prediction of functional effects of human nsSNPs. <http://genetics.bwh.harvard.edu/pph2/>, 16.04.2015.
- Akers, AL; Johnson, E; Steinberg, GK; Zabramski, JM; Marchuk, DA (2009). Biallelic somatic and germline mutations in cerebral cavernous malformations (CCMs): evidence for a two-hit mechanism of CCM pathogenesis. In: *Hum. Mol. Genet.* 18 5, S. 919–930.
- Alzualde, A; Moreno, F; Martínez-Lage, P; Ferrer, I; Gorostidi, A; Otaegui, D; Blázquez, L; Atares, B; Cardoso, S; Martínez, de; Juste, R; Rodríguez-Martínez, A B; Indakoetxea, B; López, de (2010). Somatic mosaicism in a case of apparently sporadic Creutzfeldt-Jakob disease carrying a de novo D178N mutation in the *PRNP* gene. In: *Am. J. Med. Genet. B. Neuropsychiatr. Genet.* 153B, S. 1283–1291.
- Amyere, M; Aerts, V; Brouillard, P; McIntyre, BA; Duhoux, FP; Wassef, M; Enjolras, O; Mulliken, JB; Devuyst, O; Antoine-Poirel, H; Boon, LM; Vikkula, M (2013). Somatic uniparental isodisomy explains multifocality of glomovenous malformations. In: *Am. J. Hum. Genet.* 92 2, S. 188–196.
- Armour, JA; Barton, DE; Cockburn, DJ; Taylor, GR (2002). The detection of large deletions or duplications in genomic DNA. In: *Hum Mutat.* 20 5, S.325-37.
- Armstrong, J; Pineda, M; Aibar, E; Geán, E; Monrós, E (2001). Classic Rett syndrome in a boy as a result of somatic mosaicism for a *MECP2* mutation. In: *Ann. Neurol.* 50, S. 692.
- Beck, JA; Poulter, M; Campbell, TA; Uphill, JB; Adamson, G; Geddes, JF; Revesz, T; Davis, MB; Wood, NW; Collinge, J; Tabrizi, SJ (2004). Somatic and germline mosaicism in sporadic early-onset Alzheimer's disease. In: *Hum. Mol. Gene.* 13, S.1219–1224.
- Beraud-Dufour, S; Gautier, R; Albiges-Rizo, C; Chardin, P; Faurobert, E (2007). Krit 1 interactions with microtubules and membranes are regulated by Rap1 and integrin cytoplasmic domain associated protein-1. In: *FEBS J.* 274, S. 5518-5532.
- Bergametti, F; Denier, C; Labauge, P; Arnoult, M; Boetto, S; Clanet, M; Coubes, P; Echenne, B; Ibrahim, R; Irthum, B; Jacquet, G; Lonjon, M; Moreau, JJ; Neau, JP; Parker, F; Tremoulet, M; Tournier-Lasserre, E (2005). Mutations within the *programmed cell death 10* gene cause cerebral cavernous malformations. In: *Am. J. Hum. Genet.* 76 1, S. 42–51.

- Bertalanffy, H; Benes, L; Miyazawa, T; Alberti, O; Siegel, AM; Sure, U (2002). Cerebral cavernomas in the adult. Review of the literature and analysis of 72 surgically treated patients. In: *Neurosurg. Rev.* 25 1-2, S. 1-53; discussion 54-5.
- Boulday, G; Blécon, A; Petit, N; Chareyre, F; Garcia, LA; Niwa-Kawakita, M; Giovannini M, Tournier-Lasserre, E (2009). Tissue-specific conditional *CCM2* knockout mice establish the essential role of endothelial *CCM2* in angiogenesis: implications for human cerebral cavernous malformations. In: *Dis. Model Mech.* 2, S. 168-177.
- Brunak, S; Engelbrecht, J; Knudsen, S (1991). Prediction of Human mRNA Donor and Acceptor Sites from the DNA Sequence. In: *J. of Mol. Biology* 220, S. 49-65.
- Chan, AC; Drakos, SG; Ruiz, OE; Smith, AC; Gibson, CC; Ling, J; Passi, SF; Stratman, AN; Sacharidou, A; Revelo, MP; Grossmann, AH; Diakos, NA; Davis, GE; Metzstein, MM; Whitehead, KJ; Li, DY (2011). Mutations in 2 distinct genetic pathways result in cerebral cavernous malformations in mice. In: *J. Clin. Invest.* 121, S. 1871-1881.
- Chang, DD; Hoang, BQ; Liu, J; Springer, TA (2002). Molecular basis for interaction between Icap1 alpha PTB domain and beta 1 integrin. In: *J. Biol. Chem.* 277 10, S. 8140–8145.
- Clatterbuck, RE; Eberhart, CG; Crain, BJ; Rigamonti, D (2001). Ultrastructural and immunocytochemical evidence that an incompetent blood-brain barrier is related to the pathophysiology of cavernous malformations. In: *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatr.* 71 2, S. 188–192.
- Clevers, H (2006). Wnt/beta-catenin signaling in development and disease. In: *Cell* 127 3, S. 469–480.
- Craig, HD; Günel, M; Cepeda, O; Johnson, EW; Ptacek, L; Steinberg, GK; Ogilvy, CS; Berg, MJ; Crawford, SC; Scott, RM; Steichen-Gersdorf, E; Sabroe, R; Kennedy, CT; Mettler, G; Beis, MJ; Fryer, A; Awad, IA; Lifton, RP (1998). Multilocus linkage identifies two new loci for a mendelian form of stroke, cerebral cavernous malformation, at 7p15-13 and 3q25.2-27. In: *Hum. Mol. Genet.* 7 12, S. 1851–1858.
- Cröse, LE; Hilder, TL; Sciaky, N; Johnson, GL (2009). Cerebral cavernous malformation 2 protein promotes smad ubiquitin regulatory factor 1-mediated RhoA degradation in endothelial cells. In: *J. Biol. Chem.* 284 20, S. 13301–13305.
- Dejana, E; Tournier-Lasserre, E; Weinstein, BM (2009). The control of vascular integrity by endothelial cell junctions: molecular basis and pathological implications. In: *Dev. Cell* 16 2, S. 209–221.
- Denier, C; Gasc, JM; Chapon, F; Domenga, V; Lescoat, C; Joutel, A; Tournier-Lasserre, E (2002). *Krit1/cerebral cavernous malformation 1* mRNA is preferentially expressed in neurons and epithelial cells in embryo and adult. In: *Mech. Dev.* 117 1-2, S. 363–367.
- Denier, C; Goutagny, S; Labauge, P; Krivosic, V; Arnoult, M; Cousin, A; Benabid, AL; Comoy, J; Frerebeau, P; Gilbert, B; Houtteville, JP; Jan, M; Lapierre, F; Loiseau, H; Menei, P; Mercier, P; Moreau, JJ; Nivelon-Chevallier, A; Parker, F; Redondo, AM; Scarabin, JM; Tremoulet, M; Zerah, M; Maciazek, J; Tournier-Lasserre, E (2004a). Mutations within the *MGC4607* gene cause cerebral cavernous malformations. In: *Am. J. Hum. Genet.* 74 2, S. 326–337.

- Denier, C; Labauge, P; Brunereau, L; Cavé-Riant, F; Marchelli, F; Arnoult, M; Cecillon, M; Maciasek, J; Joutel, A; Tournier-Lasserre, E (2004b). Clinical features of cerebral cavernous malformations patients with *KRIT1* mutations. In: *Ann. Neurol.* 55 2, S. 213–220.
- Depienne, C; Fedirko, E; Faucheux, JM; Forlani, S; Bricka, B; Goizet, C; Lesourd, S; Stevanin, G; Ruberg, M; Durr, A; Brice, A (2007). A de novo *SPAST* mutation leading to somatic mosaicism is associated with a later age at onset in HSP. In: *Neurogenetics* 8, S. 231–233.
- Desmet, FO; Hamroun, D; Lalande, M; Collod-Beroud, G; Claustres, M; Beroud, C. (2009). Human Splicing Finder: an online bioinformatics tool to predict splicing signals. In: *Nucleic Acid Res.* 37 (9):e67.
- Dubovsky, J; Zabramski, JM; Kurth, J; Spetzler, RF; Rich, SS; Orr, HT; Weber, JL (1995). A gene responsible for cavernous malformations of the brain maps to chromosome 7q. In: *Hum. Mol. Genet.* 4 3, S. 453–458.
- Eerola, I; McIntyre, B; Vikkula, M (2001). Identification of eight novel 5'-exons in cerebral capillary malformation gene-1 (*CCM1*) encoding KRIT1. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1517 3, S. 464–467.
- Fachal, L; Blanco, A; Santamarina, M; Carracedo, A; Vega, A (2014). Large genomic rearrangements of *BRCA1* and *BRCA2* among patients referred for genetic analysis in Galicia (NW Spain): delimitation and mechanism of three novel *BRCA1* rearrangements. In: *PLoS One.* 9 3:e93306.
- Faurobert, E; Albiges-Rizo, C (2010). Recent insights into cerebral cavernous malformations: a complex jigsaw puzzle under construction. In: *FEBS J.* 277 5, S. 1084–1096.
- Felbor, U (2007). Genetik zerebraler kavernöser Gefäßmalformationen. In: *Dtsch. Med. Wochenschr.* 132 38, S. 1967–1970.
- Felbor, U; Sure, U (2006). Zerebrale kavernöse Malformationen. In: *Medizinische Genetik* 18, S. 330-334.
- Fischer, A; Zalvide, J; Faurobert, E; Albiges-Rizo, C; Tournier-Lasserre, E (2013). Cerebral cavernous malformations: from *CCM* genes to endothelial cell homeostasis. In: *Trends Mol. Med.* 5, S. 302-308.
- Fournier, HN; Dupé-Manet, S; Bouvard, D; Luton, F; Degani, S; Block, MR; Retta, SF; Albiges-Rizo, C (2005). Nuclear translocation of integrin cytoplasmic domain-associated protein 1 stimulates cellular proliferation. In: *Mol. Biol. Cell* 16 4, S. 1859–1871.
- Frischer, JM; Göd, S; Gruber, A; Saringer, W; Grabner, G; Gatterbauer, B; Kitz, K; Holzer, S; Kronnerwetter, C; Hainfellner, JA; Knosp, E; Trattnig, S (2012). Susceptibility-weighted imaging at 7 T: Improved diagnosis of cerebral cavernous malformations and associated developmental venous anomalies. In: *Neuroimage Clin.* 1 1, S.116-20.
- Gaetzner, S; Stahl, S; Sürücü, O; Schaafhausen, A; Halliger-Keller, B; Bertalanffy, H; Sure, U; Felbor, U (2007). *CCM1* gene deletion identified by MLPA in cerebral cavernous malformation. In: *Neurosurg Rev.* 30 2, S. 155-159; discussion 159-60.

- Gault, J; Sarin, H; Awadallah, NA; Shenkar, R; Awad, IA (2004). Pathobiology of human cerebrovascular malformations: basic mechanisms and clinical relevance. In: *Neurosurgery* 55 1, S. 1-16; discussion 16-7.
- Gault, J; Shenkar, R; Recksiek, P; Awad, IA (2005). Biallelic somatic and germ line *CCM1* truncating mutations in a cerebral cavernous malformation lesion. In: *Stroke* 36 4, S. 872–874.
- Gilissen, C; Hoischen, A; Brunner, HG; Veltman, JA (2012). Disease gene identification strategies for exome sequencing. In: *Eur. J. Hum. Gen.* 20 5, S. 490-7.
- Glading, A; Han, J; Stockton, RA; Ginsberg, MH (2007). KRIT-1/CCM1 is a Rap1 effector that regulates endothelial cell cell junctions. In: *J. Cell Biol.* 179, S. 247-254.
- Glading, AJ; Ginsberg, MH (2010). Rap1 and its effector KRIT1/CCM1 regulate beta-catenin signaling. In: *Dis. Model Mech.* 3 1-2, S. 73–83.
- Gore, AV; Lampugnani, MG; Dye, L; Dejana, E; Weinstein, BM (2008). Combinatorial interaction between *CCM* pathway genes precipitates hemorrhagic stroke. In: *Dis. Model Mech.* 1, S. 275-281.
- Günel, M; Awad, IA; Anson, J; Lifton, RP (1995). Mapping a gene causing cerebral cavernous malformation to 7q11.2-q21. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 92 14, S. 6620–6624.
- Haasdijk, RA; Cheng, C; Maat-Kievit, AJ; Duckers, HJ (2012). Cerebral cavernous malformations: from molecular pathogenesis to genetic counselling and clinical management. In: *Eur. J. Hum. Genet.* 20 2, S. 134–140.
- Han-Joon, K; Beom, SJ (2014). Hypothesis: Somatic Mosaicism and Parkinson Disease. In: *Exp. Neurobiol.* 4, S. 271-276.
- Hansen, Tv; Jønson, L; Albrechtsen, A; Andersen, MK; Ejlersen, B; Nielsen, FC (2009). Large *BRCA1* and *BRCA2* genomic rearrangements in Danish high risk breast-ovarian cancer families. In: *Breast Cancer Res Treat.* 115 2, S.315-23.
- Hashida, H; Goto, J; Suzuki, T; Jeong, S; Masuda, N; Ooie, T; Tachiiri, Y; Tsuchiya, H; Kanazawa, I (2001). Single cell analysis of CAG repeat in brains of dentatorubral-pallidoluysian atrophy (DRPLA). In: *J. Neurol. Sci.* 190, S. 87–93.
- Hasmad, HN; Sivanandan, K; Lee, V; Yip, CH; Mohd Taib, NA; Teo, SH (2015). Identification of a recurrent *BRCA1* exon 21-22 genomic rearrangement in Malay breast cancer patients. In: *Clin Genet.* 87 4, S. 392-4.
- He, Y; Zhang, H; Yu, L; Gunel, M; Boggon, TJ; Chen, H; Min, W (2010). Stabilization of VEGFR2 signaling by cerebral cavernous malformation 3 is critical for vascular development. In: *Sci. Signal.* 3 116, ra26.
- Hebsgaard, SM; Korning, PG; Tolstrup, N; Engelbrecht, J; Rouze, P; Brunak, S (1996). Splice site prediction in *Arabidopsis thaliana* DNA by combining local and global sequence information. In: *Nucleic Acids Res.* 24 (17), S. 3439-3452.
- Helmich, U (2015). Helmichs Biologie-Lexikon. Mutation, stille. <http://www.u-helmich.de/bio/lexikon/M/mutationStill.html>, 25.04.2015.

- Iida, Y (1993). Quantification analysis of splice signal sequences. Exon skipping in beta-globin gene of thalassemia. In: *Nucleic Acids Symp. Ser.* 29, S. 161-162.
- Johnson, EW; Iyer, LM; Rich, SS; Orr, HT; Gil-Nagel, A; Kurth, JH; Zabramski, JM; Marchuk, DA; Weissenbach, J; Clericuzio, CL; Davis, LE; Hart, BL; Gusella, JF; Kosofsky, BE; Louis, DN; Morrison, LA; Green, ED; Weber, JL (1995). Refined localization of the cerebral cavernous malformation gene (*CCM1*) to a 4-cM interval of chromosome 7q contained in a well-defined YAC contig. In: *Genome Res.* 5 4, S. 368–380.
- J. Craig Venter Institute. SIFT Human Protein. http://sift.jcvi.org/www/SIFT_enst_submit.html, 16.04.2015.
- Kehrer-Sawatzki, H; Wilda, M; Braun, VM; Richter, HP; Hameister, H (2002). Mutation and expression analysis of the *KRIT1* gene associated with cerebral cavernous malformations (*CCM1*). In: *Acta Neuropathol.* 104 3, S. 231–240.
- Kleaveland, B; Zheng, X; Liu, JJ; Blum, Y; Tung, JJ; Zou, Z; Sweeney, SM; Chen, M; Guo, L; Lu, M-m; Zhou, D; Kitajewski, J; Affolter, M; Ginsberg, MH; Kahn, ML (2009). Regulation of cardiovascular development and integrity by the heart of glass-cerebral cavernous malformation protein pathway. In: *Nat. Med.* 15 2, S. 169–176.
- Knudson, AG (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 68 4, S. 820–823.
- Kohlhase, J; Schubert, L; Liebers, M; Rauch, A; Becker, K; Mohammed, SN; Newbury-Ecob, R; Reardon, W (2003). Mutations at the *SALL4* locus on chromosome 20 result in a range of clinically overlapping phenotypes, including Okihiro syndrome, Holt-Oram syndrome, acro-renal-ocular syndrome, and patients previously reported to represent thalidomide embryopathy. In: *J Med Genet.* 40 7, S. 473-8.
- Kok, FO; Shin, M; Ni, CW; Gupta, A; Grosse, AS; van Impel, A; Kirchmaier, BC; Peterson-Maduro, J; Kourkoulis, G; Male, I; DeSantis, DF; Sheppard-Tindell, S; Ebarasi, L; Betsholtz, C; Schulte-Merker, S; Wolfe, SA; Lawson, ND (2015). Reverse Genetic Screening Reveals Poor Correlation between Morpholino-Induced and Mutant Phenotypes in Zebrafish. In: *Developmental Cell* 32, S. 97–108.
- Kufs H (1928). Über heredofamiliäre Angiomatose des Gehirns und der Retina, ihre Beziehungen zueinander und zur Angiomatose der Haut. In: *Zeitschrift für die gesamte Neurologie und Psychiatrie* 113, S. 651–686.
- Labauge, P; Denier, C; Bergametti, F; Tournier-Lasserre, E (2007). Genetics of cavernous angiomas. In: *Lancet Neurol.* 6 3, S. 237–244.
- Labauge, P; Laberge, S; Brunereau, L; Levy, C; Tournier-Lasserre, E (1998). Hereditary cerebral cavernous angiomas: clinical and genetic features in 57 French families. Société Française de Neurochirurgie. In: *Lancet* 352 9144, S. 1892–1897.
- Laberge-le Couteulx, S; Jung, HH; Labauge, P; Houtteville, JP; Lescoat, C; Cecillon, M; Marechal, E; Joutel, A; Bach, JF; Tournier-Lasserre, E (1999). Truncating mutations in *CCM1*, encoding KRIT1, cause hereditary cavernous angiomas. In: *Nat. Genet.* 23 2, S. 189–193.

- Liquori, CL; Berg, MJ; Siegel, AM; Huang, E; Zawistowski, JS; Stoffer, T; Verlaan, D; Balogun, F; Hughes, L; Leedom, TP; Plummer, NW; Cannella, M; Maglione, V; Squitieri, F; Johnson, EW; Rouleau, GA; Ptacek, L; Marchuk, DA (2003). Mutations in a gene encoding a novel protein containing a phosphotyrosine-binding domain cause type 2 cerebral cavernous malformations. In: *Am. J. Hum. Genet.* 73 6, S. 1459–1464.
- Liquori, CL; Berg, MJ; Squitieri, F; Ottenbacher, M; Sorlie, M; Leedom, TP; Cannella, M; Maglione, V; Ptacek, L; Johnson, EW; Marchuk, DA (2006). Low frequency of *PDCD10* mutations in a panel of *CCM3* probands: potential for a fourth *CCM* locus. In: *Hum. Mutat.* 27 1, S. 118.
- Liu, H; Rigamonti, D; Badr, A; Zhang, J (2011). *Ccm1* regulates microvascular morphogenesis during angiogenesis. In: *J. Vasc. Res.* 48 2, S. 130–140.
- Li, X; Zhang, R; Zhang, H; He, Y; Ji, W; Min, W; Boggon, TJ (2010). Crystal structure of *CCM3*, a cerebral cavernous malformation protein critical for vascular integrity. In: *J. Biol. Chem.* 285 31, S. 24099–24107.
- Lodato, MA; Woodworth, MB; Lee, Se; Evrony, GD; Mehta, BK; Karger, A; Lee, So; Chittenden, TW; D’Gama, AM; Cai, X; Luquette, LJ; Lee, E; Park, PJ; Walsh, A (2015). Somatic mutations in single human neurons tracks developmental and transcriptional history. In: *Science.* 350 6256, 94-8.
- Marchuk, DA; Gallione, CJ; Morrison, LA; Clericuzio, CL; Hart, BL; Kosofsky, BE; Louis, DN; Gusella, JF; Davis, LE; Prenger, VL (1995). A locus for cerebral cavernous malformations maps to chromosome 7q in two families. In: *Genomics* 28 2, S. 311–314.
- Marchuk, DA; Srinivasan, S; Squire, TL; Zawistowski, JS (2003). Vascular morphogenesis: tales of two syndromes. In: *Hum. Mol. Genet.* 12 Spec No 1, S. R97-112.
- Mazumder, B; Seshadri, V; Fox, P L (2003). Translational control by the 3'-UTR: the ends specify the means. In: *Trends Biochem. Sci.* 2, S. 91-98.
- Mazumder, B; Sampath, P; Fox, PL (2005). Regulation of macrophage ceruloplasmin gene expression: one paradigm of 3'-UTR-mediated translational control. In: *Mol Cells.* 20 2, S. 167-72.
- Mc Donald, DA; Shi, C; Shenkar, R; Gallione, CJ; Akers, AL; Li, S; De Castro, N; Berg, MJ; Corcoran, DL; Awad, IA; Marchuk, DA (2014). Lesions from patients with sporadic cerebral cavernous malformations harbour somatic mutations in the *CCM* genes: evidence for a common biochemical pathway for *CCM* pathogenesis. In: *Hum. Mol. Genet.* 23 16, S. 4357-70.
- Montermini, L; Kish, SJ; Jiralerspong, S; Lamarche, JB; Pandolfo, M (1997). Somatic mosaicism for Friedreich's ataxia GAA triplet repeat expansions in the central nervous system. In: *Neurology* 49, S. 606–610.
- Mülhardt, C (2000). *Der Experimentator: Molekularbiologie.* Spektrum Akademischer Verlag, 2. Auflage. S. 88-92.
- Ng, PC; Henikoff, S (2001). Predicting deleterious amino acid substitutions. In: *Genome Res.*, S. 863-874.
- Ng, PC; Henikoff, S (2002). Accounting for human polymorphisms predicted to affect protein function. In: *Genome Res.*, S. 436-446.

- Pagenstecher, A; Stahl, S; Sure, U; Felbor, U (2009). A two-hit mechanism causes cerebral cavernous malformations: complete inactivation of *CCM1*, *CCM2* or *CCM3* in affected endothelial cells. In: *Hum. Mol. Genet.* 18 5, S. 911–918.
- Parcerisas, A; Rubio, SE; Muhaisen, A; Gómez-Ramos, A; Pujadas, L; Puiggros, M; Rossi, D; Ureña, J; Burgaya, F; Pascual, M; Torrents, D; Rábano, A; Avila, J; Soriano E (2014). Somatic signature of brain-specific single nucleotide variations in sporadic Alzheimer's disease. In: *J. Alzheimers Dis.* 42 4, S. 1357-82.
- Pieras, JI; Muñoz-Cabello, B; Borrego, S; Marcos, I; Sanchez, J; Madruga, M; Antiñolo, G (2011). Somatic mosaicism for Y120X mutation in the *MECP2* gene causes atypical Rett syndrome in a male. In: *Brain Dev.* 33, S. 608–611.
- Preisler-Adams, S; Schönbuchner, I; Fiebig, B; Welling, B; Dworniczak, B; Weber, BH (2006). Gross rearrangements in *BRCA1* but not *BRCA2* play a notable role in predisposition to breast and ovarian cancer in high-risk families of German origin. In: *Cancer Genet Cytogenet.* 168 1, S. 44-9.
- Reese, MG; Eeckman, FH; Kulp, D; Haussler, D (1997). Improved Splice Site Detection in Genie. In: *J. Comp. Biol.* 4 3, S. 311-23.
- Revencu, N; Vikkula, M (2006). Cerebral cavernous malformation: new molecular and clinical insights. In: *J. Med. Genet.* 43 9, S. 716–721.
- Rigamonti, D; Hadley, MN; Drayer, BP; Johnson, PC; Hoenig-Rigamonti, K; Knight, JT; Spetzler, RF (1988). Cerebral cavernous malformations. Incidence and familial occurrence. In: *N. Engl. J. Med.* 319 6, S. 343–347.
- Robinson, WP (2000). Mechanisms leading to uniparental disomy and their clinical consequences. In: *Bioessays* 22 5, S. 452-9.
- Sahoo, T; Johnson, EW; Thomas, JW; Kuehl, PM; Jones, TL; Dokken, CG; Touchman, JW; Gallione, CJ; Lee-Lin, SQ; Kosofsky, B; Kurth, JH; Louis, DN; Mettler, G; Morrison, L; Gil-Nagel, A; Rich, SS; Zabramski, JM; Boguski, MS; Green, ED; Marchuk, DA (1999). Mutations in the gene encoding *KRIT1*, a Krev-1/rap1a binding protein, cause cerebral cavernous malformations (*CCM1*). In: *Hum. Mol. Genet.* 8 12, S. 2325–2333.
- Saji, N; Kawarai, T; Miyamoto, R; Sato, T; Morino, H; Orlacchio, A; Oki, R; Kimura, K; Kaji, R (2015). Exome sequencing identifies a novel intronic mutation in *ENG* that causes recurrence of pulmonary arteriovenous malformations. In: *J. Neurol. Sci.* 352 1-2, S. 29-33.
- Schleider, E; Stahl, S; Wüstehube, J; Walter, U; Fischer, A; Felbor, U (2011). Evidence for anti-angiogenic and pro-survival functions of the cerebral cavernous malformation protein 3. In: *Neurogenetics* 12 1, S. 83-86.
- Schwarz, JM; Cooper, DN; Schuelke, M; Seelow, D (2014). MutationTaster2: mutation prediction for the deep-sequencing age. In: *Nat. Methods.* 11 4, S. 361-362. <http://www.mutationtaster.org/>, 16.04.2015; <http://www.mutationtaster.org/info/FAQs.html>, 25.04.2015.
- Schwarz, JM; Rödelberger, C; Schuelke, M; Seelow, D (2010). MutationTaster evaluates disease-causing potential of sequence alterations. In: *Nat Methods.* 7 8, S. 575-6.
- Sedgwick, SG; Smerdon, SJ (1999). The ankyrin repeat: a diversity of interactions on a common structural framework. In: *Trends Biochem. Sci.* 24 8, S. 311–316.

- Serebriiskii, I; Estojak, J; Sonoda, G; Testa, JR; Golemis, EA (1997). Association of Krev-1/rap1a with Krit1, a novel ankyrin repeat-containing protein encoded by a gene mapping to 7q21-22. In: *Oncogene* 15 9, S. 1043–1049.
- Spiegler, S; Najm, J; Liu, J; Gkalympoudis, S; Schröder, W; Borck, G; Brockmann, K; Elbracht, M; Fauth, C; Ferbert, A; Freudenberg, L; Grasshoff, U; Hellenbroich, Y; Henn, W; Hoffjan, S; Hüning, I; Korenke, GC; Kroisel, PM; Kunstmann, E; Mair, M; Munk-Schulenburg, S; Nikoubashman, O; Pauli, S; Rudnik-Schöneborn, S; Sudholt, I; Sure, U; Tinschert, S; Wiednig, M; Zoll, B; Ginsberg, MH; Felbor, U (2014). High mutation detection rates in cerebral cavernous malformation upon stringent inclusion criteria: one-third of probands are minors. In: *Mol. Genet. Genomic Med.* 2 2, S. 176-185.
- Stahl, S; Gaetzner, S; Voss, K; Brackertz, B; Schleider, E; Sürücü, O; Kunze, E; Netzer, C; Korenke, C; Finckh, U; Habek, M; Poljakovic, Z; Elbracht, M; Rudnik-Schöneborn, S; Bertalanffy, H; Sure, U; Felbor, U (2008). Novel *CCM1*, *CCM2*, and *CCM3* mutations in patients with cerebral cavernous malformations: in-frame deletion in *CCM2* prevents formation of a *CCM1/CCM2/CCM3* protein complex. In: *Hum. Mutat.* 29 5, S. 709–717.
- Swami, M; Hendricks, AE; Gillis, T; Massood, T; Mysore, J; Myers, RH; Wheeler, VC (2009). Somatic expansion of the Huntington's disease CAG repeat in the brain is associated with an earlier age of disease onset. In: *Hum. Mol. Genet.* 18, S. 3039–3047.
- Topçu, M; Akyerli, C; Sayi, A; Törüner, GA; Koçoğlu, SR; Cimbış, M; Özçelik, T (2002). Somatic mosaicism for a *MECP2* mutation associated with classic Rett syndrome in a boy. In: *Eur. J. Hum. Genet.* 10, S. 77–81.
- Trommsdorff, M; Borg, JP; Margolis, B; Herz, J (1998). Interaction of cytosolic adaptor proteins with neuronal apolipoprotein E receptors and the amyloid precursor protein. In: *J. Biol. Chem.* 273 50, S. 33556–33560.
- Van Regemorter, N; Haumont, D; Kirkpatrick, C; Viseur, P; Jeanty, P; Dodion, J; Milaire, J; Rooze, M; Rodesch, F (1982). Holt Oram syndrome mistaken for thalidomide embryopathy--embryological considerations. In: *Eur J Pediatr.* 138 1, S. 77-80.
- Vingron, M (2005). Analysis of binding sites for the activation of genes. In: Forschungsbericht (importiert) – Max Planck Institut für molekulare Genetik. www.molgen.mpg.de/92703/research_report_856784, 28.01.2016)
- Voss, K; Stahl, S; Schleider, E; Ullrich, S; Nickel, J; Mueller, TD; Felbor, U (2007). *CCM3* interacts with *CCM2* indicating common pathogenesis for cerebral cavernous malformations. In: *Neurogenetics* 8 4, S. 249–256.
- Waterhouse, AM; Procter, JB; Martin, DMA; Clamp, M; Barton, GL (2009). Jalview Version 2 – a multiple sequence alignment editor and analysis workbench. In: *Bioinformatics* 25 9, S. 1189-1191.
- Whitehead, KJ; Chan, AC; Navankasattusas, S; Koh, W; London, NR; Ling, J; Mayo, AH; Drakos, SG; Jones, CA; Zhu, W; Marchuk, DA; Davis, GE; Li, DY (2009). The cerebral cavernous malformation signaling pathway promotes vascular integrity via Rho GTPases. In: *Nat. Med.* 15 2, S. 177–184.

- Whitehead, KJ; Plummer, NW; Adams, JA; Marchuk, DA; Li, DY (2004). *Ccm1* is required for arterial morphogenesis: implications for the etiology of human cavernous malformations. In: *Development* 131 6, S. 1437–1448.
- Wienholds, E; Plasterk RH (2005). MicroRNA function in animal development. In: *FEBS Lett.* 579 26, S. 5911-22.
- Wong, JH; Awad, IA; Kim, JH (2000). Ultrastructural pathological features of cerebrovascular malformations: a preliminary report. In: *Neurosurgery* 46 6, S. 1454–1459.
- Woodward, AM; Davis, TA; Silva, AGS; kConFab Investigators; Kirk, JA; Leary, JA (2005). Large genomic rearrangements of both *BRCA2* and *BRCA1* are a feature of the inherited breast/ovarian cancer phenotype in selected families. In: *J Med Genet.* 42, e31 doi:10.1136.
- Zawistowski, JS; Stalheim, L; Uhlik, MT; Abell, AN; Ancrile, BB; Johnson, GL; Marchuk, DA (2005). CCM1 and CCM2 protein interactions in cell signaling: implications for cerebral cavernous malformations pathogenesis. In: *Hum. Mol. Genet.* 14 17, S. 2521–2531.
- Zhang, J; Clatterbuck, RE; Rigamonti, D; Chang, DD; Dietz, HC (2001). Interaction between *krit1* and *icap1alpha* infers perturbation of integrin beta1-mediated angiogenesis in the pathogenesis of cerebral cavernous malformation. In: *Hum. Mol. Genet.* 10 25, S. 2953–2960.
- Zhang, J; Rigamonti, D; Dietz, HC; Clatterbuck, RE (2007). Interaction between *krit1* and *malcavernin*: implications for the pathogenesis of cerebral cavernous malformations. In: *Neurosurgery* 60 2, S. 353-359; discussion 359.
- Zheng, X; Xu, C; Di Lorenzo, A; Kleaveland, B; Zou, Z; Seiler, C; Chen, M; Cheng, L; Xiao, J; He, J; Pack, MA; Sessa, WC; Kahn, ML (2010). *CCM3* signaling through sterile 20-like kinases plays an essential role during zebrafish cardiovascular development and cerebral cavernous malformations. In: *J. Clin. Invest.* 120 8, S. 2795–2804.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbstständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät, keiner anderen wissenschaftlichen Einrichtung vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Greifswald, den 29.02.2016

Unterschrift

Danksagung

Mein großer Dank gilt Frau Prof. Dr. med. Ute Felbor für die Möglichkeit, am Institut für Humangenetik in Greifswald an diesem interessanten Forschungsthema zu arbeiten. Ebenso bedanke ich mich ganz herzlich für die einzigartige Betreuung und stetige Hilfe, die in großem Maße dazu beigetragen haben, dass die Fertigstellung dieser Dissertation für mich so zügig und reibungslos verlief. Die allzeitige Unterstützung und Ansprechbarkeit weiß ich sehr zu schätzen. Vielen Dank!

Weiterhin möchte ich mich bei Frau Dr. rer. nat. Winnie Schröder bedanken, die mich vor allem zu Beginn meiner Arbeit mit dem Thema der CCMs vertraut gemacht hat und jederzeit viele wertvolle Tipps und Anregungen parat hatte.

Mein Dank geht auch an Frau K. Landsberg und Frau S. Göbel, die mir bei der Laborarbeit mit Rat und Tat zur Seite standen und auch dann nicht die Fassung verloren, wenn die Sequenzierung wieder einmal nicht so ganz funktionierte, wie geplant.

Für die technische Unterstützung danke ich Christian Sperling, der immer sofort zur Stelle war, wenn mal wieder ein Gerät oder Programm nicht so wollte wie ich.

Auch richtet sich mein Dank an Dr. rer. nat. Juliane Najm, die mir bei der Auswertung der Ergebnisse dieser Dissertation zur Seite stand.

Ich bedanke mich ebenso ganz herzlich bei Dr. med. Matthias Rath, der insbesondere kurz vor Fertigstellung dieser Arbeit noch einmal viel Zeit und Mühe investierte, mit mir die Ergebnisse und die Diskussion erneut zu durchdenken und zu hinterfragen. Die wertvollen Tipps und Hinweise haben sehr geholfen, die Arbeit schnell zum Abschluss zu bringen.

Ein besonderer Dank gebührt (Dr. rer. nat.) Stefanie Spiegler, die neben ihrer eigenen Dissertation und sonstigen wissenschaftlichen Arbeit immer auch noch ein offenes Ohr für meine Fragen und Probleme hatte. Vom ersten Tag an bis heute habe ich es nie erlebt, dass sie mir einmal nicht weiterhelfen konnte. Egal wann ich mit meinen (wirklich vielen!) Fragen an sie herangetreten bin, suchte sie sofort nach Lösungen und half, wo sie nur konnte. In den bisherigen über zweieinhalb Jahren hatte sie immer wieder neue Ratschläge und Ideen, war immer ansprechbar und hat viel Zeit darin investiert, mich zu unterstützen. Ich bin bis heute sehr dankbar, jemanden wie sie als stetige Hilfe an meiner Seite zu wissen. Danke Steffi, ohne Dich wäre diese Arbeit so nicht möglich gewesen!