

Aus dem Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie
an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
(Direktor: Prof. Dr. I. Hansmann)

**Molekulare Charakterisierung und Mutationsanalyse
der *Fringe*-Genfamilie *Lunatic*-, *Radical*- und *Manic-Fringe* bei Probanden
mit einem *Alagille*-Syndrom**

Dissertation
zur Erlangung des akademischen Grades
Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt
der Medizinischen Fakultät
der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Ursula Irmgard Böhm
geboren am 12.11.1975 in Esslingen am Neckar

Gutachter:

Prof. P. Wieacker
Prof. G. Horneff
Prof. I. Hansmann

verteidigt am 30.11.2004

urn:nbn:de:gbv:3-000007637

[<http://nbn-resolving.de/urn/resolver.pl?urn=nbn%3Ade%3Agbv%3A3-000007637>]

Referat und bibliographische Beschreibung

Das *Alagille*-Syndrom (AGS) betrifft etwa eines von 70.000 Lebendgeborenen und gehört somit zu den häufigsten Ursachen für angeborene chronische Lebererkrankungen. Mutationen im Bereich des *JAG1*-Gens sind ursächlich für die Entstehung des AGS. Doch nur 65-70% der Patienten mit AGS besitzen nachweisbare Veränderungen innerhalb dieses Gens. Aus diesem Grund wird genetische Heterogenität diskutiert. *JAG1* ist ein Bestandteil der sehr komplexen *Notch*-Signalkaskade, welche essentiell für Differenzierungsprozesse während der Embryonalentwicklung ist. Die Wirkung des *JAG1*-Proteins innerhalb der *Notch*-Signalkaskade wird durch die Genprodukte der *Fringe*-Gene [*Lunatic-Fringe*-Gen (*LFNG*), *Manic-Fringe*-Gen (*MFNG*) und *Radical-Fringe*-Gen (*RFNG*)] reguliert. Damit kommen die drei *Fringe*-Gene als Kandidatengene des AGS in Betracht. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, einen möglichen Zusammenhang zwischen der Entstehung des AGS und Mutationen im Bereich der drei *Fringe*-Gene zu untersuchen. Mittels *in silico* Analysen, einem *BAC-Bank-Screening* sowie Sequenzierungen wurden die Sequenzen der *Fringe*-Gene komplettiert sowie die genomische Struktur des *LFNGs* charakterisiert. Es wurde ein Mutationsscreening aller drei *Fringe*-Gene bei 38 Patienten mit AGS ohne nachweisbare Mutationen im Bereich des *JAG1*-Gens durchgeführt. Nicht untersucht wurden die Exons 1 und 8 des *LFNGs* sowie das Exon 1 des *RFNGs*. Es konnten mittels *SSCP*-Analyse und anschließender Sequenzierung bei *band shifts* im *SSCP*-Lauf die folgende Polymorphismen identifiziert werden. Im *LFNG* c:433-106C→T, c:433-78C→T, c:733-51C→A, c:733-36C→T, c:969G→A, c:985-53G→A, c:985-37G→A, im *RFNG* c:460A→C, c:574-5C→T, c:993+102G→A und im *MFNG* c:648-56C→T. Es wurden keine pathogenen Mutationen innerhalb der untersuchten Exonbereiche bei Patienten mit AGS nachgewiesen. Somit kann ein Zusammenhang zwischen Mutationen im Bereich der *Fringe*-Gene und der Entstehung des AGS mit großer Wahrscheinlichkeit ausgeschlossen werden.

Böhm, Ursula Irmgard: Molekulare Charakterisierung und Mutationsanalyse der *Fringe*-Genfamilie *Lunatic*-, *Radical*- und *Manic-Fringe* bei Probanden mit einem *Alagille*-Syndrom Halle, Martin-Luther-Univ., Med.Fak., Diss., 76 Seiten, 2004

1	Einleitung	1
1.1	Das <i>Alagille</i> -Syndrom (AGS)	1
1.2	Das <i>Notch</i> -Signalsystem	3
1.2.1	Die <i>Notch</i> -Proteine	4
1.2.2	Der <i>Notch</i> -Ligand <i>JAG1</i>	6
1.2.3	Das <i>Notch</i> -Signalsystem	7
1.2.4	Die <i>Fringe</i> -Gen-Familie	8
1.3	Fragestellung und Zielsetzung vorliegender Arbeit	9
2	Material und Methoden	11
1.1	Material	11
1.1.1	Chemikalien	11
1.1.2	Längenstandards	12
1.1.3	Gebrauchswaren	12
1.1.4	Geräte	13
1.1.5	Puffer und Stammlösungen	13
1.1.6	Nährböden und Medien	14
1.1.7	Sterilisation von Lösungen und Geräten	15
1.1.8	<i>Primer</i>	15
1.1.9	Art und Herkunft der untersuchten DNA	16
2.1.10	Art und Herkunft der <i>BAC</i> -Bank	16
1.2	Methoden	17
1.2.1	Isolierung genomischer DNA aus Blut	17
1.2.2	Isolierung von <i>BAC</i> -DNA	17
1.2.3	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels photometrischer Bestimmung	18
1.2.4	Horizontale Agarose-Gelelektrophorese	19
1.2.5	Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen	20
1.2.6	Polymerase Kettenreaktion (<i>PCR</i>)	20
1.2.7	DNA-Sequenzierung	22
1.2.8	Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (<i>single stranded conformation polymorphism, SSCP</i>)	24
3	Ergebnisse	25
3.1	Komplettierung der DNA-Sequenzen sowie Darstellung der genomischen Struktur des humanen <i>Lunatic-Fringe</i> -Gens	25
3.1.1	Komplettierung von DNA- Sequenzen des <i>Lunatic-Fringe</i> -Gens mittels <i>in silico</i> Analyse	25

3.1.2	Komplettierung von cDNA-Sequenzen des <i>Lunatic-Fringe</i> -Gens mittels <i>BAC-Bank-Screening</i>	29
3.1.3	Darstellung der vorhergesagten genomischen Struktur des <i>Lunatic-Fringe</i> -Gens	32
3.2	Komplettierung der DNA-Sequenzen sowie Darstellung der genomischen Struktur des humanen <i>Radical-Fringe</i> -Gens	34
3.2.1	Komplettierung von DNA-Sequenzen des <i>Radical-Fringe</i> -Gens mittels Amplifikation und Sequenzierung der Introns 4 bis 7	35
3.2.2	Darstellung der genomischen Struktur des <i>Radical-Fringe</i> -Gens	37
3.3	Darstellung der genomischen Struktur des <i>Manic-Fringe</i> -Gens	39
3.4	Suche nach Mutationen innerhalb der drei humanen <i>Fringe</i> -Gene (<i>Lunatic</i> -, <i>Radical</i> -, <i>Manic-Fringe</i> -Gen) bei 38 Probanden mit <i>Alagille</i> -Syndrom	40
3.4.1	Sequenzvarianten im <i>Lunatic-Fringe</i> -Gen	42
3.4.2	Sequenzvarianten im <i>Radical-Fringe</i> -Gen	44
3.4.3	Sequenzvariante im <i>Manic-Fringe</i> -Gen	46
4	Diskussion	48
4.1	Komplettierung von DNA-Sequenzen sowie Ermittlung der Exon- Intron-Struktur des <i>Lunatic-Fringe</i> -Gens	50
4.2	Mutationsanalyse im Bereich des <i>Lunatic</i> -, des <i>Radical</i> - und des <i>Manic-Fringe</i> -Gens	53
4.3	Die <i>Fringe</i> -Gene	56
4.3.1	<i>Lunatic-Fringe</i> -Gen	57
4.3.2	<i>Manic-Fringe</i> -Gen	59
4.3.3	<i>Radical-Fringe</i> -Gen	60
4.4	Ausblick	62
5	Zusammenfassung	63
6	Literaturverzeichnis	65
7	Thesen	76

Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
ADAM	<i>A Disintegrin And Metalloproteinase Domain</i>
AGS	Alagille-Syndrom
APS	Ammoniumperoxidsulfat
AS	Aminosäure
abs.	absolut
BAC	<i>Bacterial Artificial Chromosome</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BLASTN	<i>Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotides</i>
bp	Basenpaar
°C	Grad Celsius
C	Cytosin
CADASIL	<i>Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy</i>
C.elegans	Caenorhabditis elegans
CSL	CBF1, <i>Suppressor of hairless</i> , LAG1
c	Konzentration
ca.	circa
cDNA	komplementäre Desoxyribonukleinsäure
DII3	murines <i>Delta-Like 3</i> Gen
DLL3	humanes <i>Delta-Like 3</i> Gen
DMSO	Dimethylsulfoxyd
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DSL	Delta Serrate Lag2
ES	<i>Ewing</i> Sarkom
dNTPs	Desoxynukleotidtriphosphat
ddNTPs	Didesoxynukleotidtriphosphat
E	Extinktionswert
e	Extinktionskoeffizient
EDTA	Ethylendiaminetetraacetat
EGF	Epidermaler Wachstumsfaktor
EST	<i>Expressed Sequence Tag</i>
et al.	et alteres

f	Verdünnungsfaktor
g	Gramm
G	Guanin
GlcNac	N-Acetyl-Glucose
H ₂ O	Wasser
HCl	Salzsäure
kbp	Kilobasenpaare
KHCO ₃	Kaliumhydrogencarbonat
kPa	Kilopascall
LFNG	humanes <i>Lunatic-Fringe</i> -Gen
Lfng	murines <i>Lunatic-Fringe</i> -Gen
LOH	<i>Loss Of Heterozygoty</i>
μ	mikro (1x10 ⁻⁶)
M	molar
Mb	Megabase
MFNG	humanes <i>Manic-Fringe</i> -Gen
Mfng	murines <i>Manic-Fringe</i> -Gen
MIM	<i>Mendelian Inheritance in Man</i>
MLU	Martin-Luther-Universität
m	Meter
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute
ml	Milliliter
mRNA	<i>Messenger-Ribonukleinsäure</i>
NaAc	Natriumacetat
NaCl	Kochsalz
NaOH	Natronlauge
NEXT	<i>Notch Extracellular Truncation</i>
NICD	<i>Notch Intracellular Domain</i>
NLS	<i>Nuclear Lokalisierung Signals</i>
Nr.	Nummer
OFUT	O-Fucosyltransferase
ORF	<i>Open-Reading-Frame</i>
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEST-Sequ.	Prolin-, Glutaminsäure-, Serin- und Threoninreiche Sequenz

PIC	Polymorphismusinformationsgehalt
PNET	primitiver neuroektodermaler Tumor
RFNG	humanes <i>Radical-Fringe</i> -Gen
Rfng	murines <i>Radical-Fringe</i> -Gen
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
SNP	<i>Single Nucleotide Polymorphism</i>
SSCP	<i>Single Stranded Conformation Polymorphism</i>
T	Thymin
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TACE	<i>Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme</i>
TBE	Tris-Borsäure-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
Temp.	Temperatur
U	<i>Unit</i>
U/min	Umdrehung/Minute
UV	Ultra-Violett
V	Volt
vgl.	vergleiche
Vol.	Volumen

1. Einleitung

Die gesamte menschliche Erbinformation ist auf schätzungsweise 30.000-40.000 Genen enthalten (Lander et al., 2001; Venter et al., 2001). Schon Veränderungen in nur einem dieser Gene können zu Abweichungen im Phänotyp und zur Entstehung von Erkrankungen unterschiedlicher Schweregrade führen. Bekannte Beispiele hierfür sind Mukoviszidose und Chorea Huntington (Estivill et al., 1987; MacDonald et al., 1992).

Je mehr über die molekulargenetischen Ursachen von Erkrankungen bekannt wird, desto größer wird auch die Rolle sein, welche genetische Diagnostik, einschließlich vorgeburtlicher Diagnostik, sowie Gentherapie in der Medizin einnehmen werden.

Neben den unbestreitbaren ethischen Problemen, die diese Entwicklung mit sich bringt, entstehen durch diese Möglichkeiten, die sich auf Grund der Gentechnik ergeben, Chancen auch im therapeutischen Bereich. So werden wahrscheinlich defekte Gene in absehbarer Zeit mit Hilfe somatischer Gentherapie durch intakte ersetzt werden können (Anderson et al., 1994). Bisher unheilbare Patienten könnten so die Chance auf eine bessere Lebensqualität bekommen. In vielen Fällen könnten an die Stelle der Therapie weit fortgeschrittener Erkrankungen die Diagnose individueller Krankheitsprädispositionen und die damit verbundenen Präventionsmaßnahmen treten (Hennen et al., 1996). Durch Kenntnis individueller Genprofile würden sich Medikamente bei den einzelnen Patienten viel spezifischer einsetzen lassen (Hoehe et al., 2000). Dies sind nur einige von vielen Möglichkeiten, die der Medizin in Zukunft zur Verfügung stehen könnten.

Um die Grundlagen für medizinische Diagnose- und Therapiemaßnahmen zu schaffen ist es jedoch unerlässlich, die krankheitsverursachenden Gene zu detektieren und zu charakterisieren.

1.1 Das *Alagille-Syndrom (AGS)*

Das *Alagille-Syndrom (AGS)*; Alagille et al., 1969; Watson et al., 1973; MIM#118450), auch bekannt unter den Bezeichnungen *Alagille-Watson-Syndrom*, Cholestase mit peripherer Pulmonalstenose, arteriohepatische Dysplasie, sowie syndromatische, hepatische Gallengangshypoplasie, stellt eine der am häufigsten vorkommenden angeborenen chronischen Lebererkrankungen dar (Danks et al., 1977). Es tritt bei etwa einem von 70.000 Lebendgeborenen auf (Danks et al., 1977).

Die Patienten weisen neben Erkrankungen des Gallengangsystems (von schwach ausgeprägter Cholestase und Pruritus bis zu progressivem Leberversagen auf Grund

biliärer Zirrhose) hauptsächlich Defekte im kardiovaskulären System, im Skelettsystem, im Auge und im Gesicht auf (Watson et al., 1973; Alagille et al., 1975; Rosenfield et al., 1980).

Es gibt fünf in verschiedener Ausprägung auftretende, charakteristische Merkmale, welche das *Alagille*-Syndrom definieren (Alagille et al., 1987).

- Gallengangshypoplasie mit Cholestase (95%) (von schwach ausgeprägter Cholestase und Pruritus bis zu progressivem Leberversagen auf Grund biliärer Zirrhose (15%)); in Folge davon Wachstumsstörungen wegen Mangelernährung (bei 50-90% der Patienten)
- Angeborene kardiovaskuläre Fehlbildungen einschließlich peripherer Pulmonalstenose (92%) und Herzfehlbildungen (30%) (Fallot-Tetralogie, Ventrikel-Septum-Defekt, Vorhof-Septum-Defekt, Aortenstenose)
- Defekte der vorderen Augenkammer (78%) (posteriores Embryotoxon, Axenfeldsanomalie, Riegeranomalie) und Pigmentstörungen der Retina
- Defekte im Skelettsystem (70%) (meistens Schmetterlingswirbel; Verengung des Interpedunkularraumes im lumbalen Bereich, Spina bifida occulta, Fusion benachbarter Wirbel, verkürzte Ulna, verkürzte distale Phalangen)
- Charakteristische Fazies (91%) (prominente Stirn, tiefsitzende Augen mit mäßigem Hypertelorismus, spitzes Kinn, Sattelnase)

Die angegebenen Prozentzahlen stellen das Ergebnis verschiedener Studien dar, bei denen insgesamt 110 Patienten untersucht wurden (Krantz et al., 1997).

Außerdem kommen seltener renale Defekte, Defekte im Nervensystem, Pankreasinsuffizienz, Hörverlust, neurovaskuläre Schäden, mentale Retardierung, sowie eine hohe Stimme vor (Mueller et al., 1984; Raymond et al., 1989; Krantz et al., 1997).

Liegen neben der Gallengangshypoplasie mit Cholestase nur zwei bis drei weitere der oben beschriebenen Hauptmerkmale vor, wird von einem partiellen *Alagille*-Syndrom gesprochen (Alagille et al., 1987).

Das *Alagille*-Syndrom wird autosomal-dominant mit reduzierter Penetranz (94%) vererbt (Dhorne-Pollet et al., 1994). Die Expressivität des *Alagille*-Syndroms ist stark variabel (LaBrecque et al., 1982; Shulman et al., 1984). Je nach Ausprägung der

Merkmale variiert die Prognose dieser Krankheit vom Tod beim Neugeborenen auf Grund schwerer Herz- und Lebererkrankungen bis zur subklinischen Ausbildung des *Alagille*-Syndroms mit „normaler“ Lebenserwartung. Ein Teil der Patienten (15-30%) ist im Verlauf der Erkrankung auf eine Lebertransplantation angewiesen. Die Mortalität des *Alagille*-Syndroms beträgt 10-20% (Elmslie et al., 1995).

Von verschiedenen Arbeitsgruppen (Byrne et al., 1986; Schnittger et al., 1989; Anad et al., 1990; Legius et al., 1990; Zhang et al., 1990; Teebi et al., 1992) wurden mit Hilfe zytogenetischer Untersuchungen Deletionen auf dem kurzen Arm von Chromosom 20 (Banden 20p11.2p12) bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom beschrieben. Daraufhin wurde die für das *Alagille*-Syndrom kritische Region auf Grund von Studien über die minimale Überlappung dieser Deletionen auf 20p12 festgelegt (Schnittger et al., 1989). Zwei *expressed sequence tagged sites* (ESTs), deren cDNAs eine große Homologie zur *Jagged*-m-RNA der Ratte aufweisen, wurden innerhalb dieser Region lokalisiert (Franke et al., 1996). Dass *JAG1* (das menschliche Homolog zu *Jagged1* der Ratte und zu *Serrate* bei *Drosophila*) das Kandidatengen für das *Alagille*-Syndrom darstellt, wurde durch Nachweis von Mutationen innerhalb dieses Gens bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom bewiesen (Oda et al., 1997; Li et al., 1997). Verschiedene Mutationen im *JAG1*-Gen, die zum *Alagille*-Syndrom führen, wurden seitdem beschrieben. Deletionen, Insertionen, Punktmutationen, *Nonsense*-Mutationen sowie *Missense*-Mutationen (Li et al., 1997; Oda et al., 1997; Krantz et al., 1998; Yuan et al., 1998; Crosnier et al., 1999; Pilia et al., 1999; Röpke et al., 2003). Allerdings konnten bisher nur bei 65-70% der Patienten mit *Alagille*-Syndrom auch tatsächlich Mutationen im Bereich des *JAG1*-Gens nachgewiesen werden. Bei einer Untersuchung durch SSCP-Analyse und Sequenzierungen fanden Krantz et al. (1998) bei 69% der Patienten mit *Alagille*-Syndrom Mutationen, Crosnier et al. (1999) wiesen bei einer Studie an 109 Patienten bei 63% *JAG1*-Mutationen nach und Röpke (1999) entdeckte bei 64% der untersuchten 59 Patienten Mutationen. Dieser hohe Prozentsatz an nicht detektbaren Mutationen lässt vermuten, dass auch andere Gene eine Rolle bei der Entstehung des *Alagille*-Syndroms spielen.

1.2 Das *Notch*-Signalsystem

Im Verlauf von Differenzierungsprozessen werden aus unreifen, nicht differenzierten Vorläuferzellen reife, differenzierte Zellen. Die Kontrolle über den Zeitpunkt, den Ort und die Menge der Vorläuferzellen, die in differenzierte und terminale Zellen

umgewandelt werden ist wichtig für die Entwicklung und das Überleben eines Organismus. Ein System, welches Zellschicksal, Proliferation und Apoptose steuert, ist das *Notch*-Signalsystem (Artavanis-Tsakonas et al., 1995).

Das *Notch*-Signalsystem ist im Tierreich hochkonserviert und wurde bereits bei *Drosophila*, *Caenorhabditis elegans* und bei verschiedenen Vertebraten studiert (Artavanis-Tsakonas und Simpson, 1991). Es besteht aus den *Notch*-Rezeptoren, den *Notch*-Liganden und verschiedenen Modulatoren. Bei Vertebraten existieren vier *Notch*-Rezeptoren (*Notch1*, *Notch2*, *Notch3*, *Notch4*) und mindestens fünf *Notch*-Liganden (*JAG1*, *JAG2*, *Delta1*, *Delta3*, *Delta4*) (Ellisen et al., 1991; Lardelli et al., 1993; Lardelli et al., 1994; Bettenhausen et al., 1995; Lindsell et al., 1995; Uyttendaele et al., 1996; Dunwoodie et al., 1997; Jen et al., 1997; Luo et al., 1997; Haddon et al., 1998; Li et al., 1998). Des Weiteren gibt es *Notch*-Modulatoren, zu welchen die Mitglieder der *Fringe*-Gen-Familie gehören (Panin et al., 1997; Irvine et al., 1997).

Auf Grund der essentiellen Rolle, welche das *Notch*-Signalsystem während zahlreicher Entwicklungsprozesse spielt, sind Veränderungen in diesem System an der Entstehung zahlreicher Erkrankungen beteiligt. So führen zum Beispiel Mutationen von *Notch1* zu T-Zell-Lymphomen (Ellisen et al., 1991), Veränderungen von *Notch3* zu *CADASIL* (*Cerebral Autosomal Dominant Arteriopathy with Subcortical Infarcts and Leukoencephalopathy*; Joutel et al., 1997) und Mutationen im *JAG1*-Gen zum *Alagille*-Syndrom (Oda et al., 1997; Li et al., 1997).

1.2.1 Die *Notch*-Proteine

Die *Notch*-Proteine bilden eine Familie großer (etwa 2500 Aminosäuren), hochkonservierter Typ1- Transmembranrezeptoren, welche durch den direkten Kontakt mit ligandenexprimierenden Zellen aktiviert werden. Erstmals wurde *Notch* bei *Drosophila* beschrieben, wo es die Differenzierung einer Vielzahl von Zellentwicklungsprozessen kontrolliert. Bei Säugern wurden bisher vier Homologe zum *Drosophila Notch*-Gen identifiziert: *Notch1*, *Notch2*, *Notch3* und *Notch4* (Weinmaster et al., 1991; Reaume et al., 1992; Weinmaster et al., 1992; Franco del Amo et al., 1993; Kopan et al., 1993; Lardelli et al., 1994).

Die hochkonservierte Struktur dieser Proteine wird im Folgenden dargestellt. Die aktivierte Form der *Notch*-Proteine (vgl. Abb.1) befindet sich an der Zelloberfläche und besteht aus einer extra- und einer intrazellulären Domäne. Die extrazelluläre Domäne der *Notch*-Proteine enthält bis zu 36 *EGF*-ähnliche Wiederholungen (*Epidermal Growth Factor*), welche in die Ligand-Rezeptor-Interaktion involviert sind (Rebay et al.,

1991). Jede der *EGF*-Wiederholungen besteht aus etwa 40 Aminosäuren mit einer bestimmten Reihenfolge an Cysteinresten. In den *EGF*-Domänen 11 und 12 liegt die Bindungsstelle für die *Notch*-Liganden. Den *EGF*-ähnlichen Wiederholungen folgen drei *lin12/Notch*-Motive.

Die intrazelluläre Domäne der *Notch*-Proteine enthält die funktionellen Motive einer subtransmembranären Region, genannt *RAM*-Domäne (Tamura et al., 1995; Kurooka et al., 2000), welche die Fähigkeit besitzt, im Kern mit Transkriptionsfaktoren zu interagieren (Christensen et al., 1996; Wettstein et al., 1997), sechs *ankyrin/CDC*-Wiederholungen (*ANK*), die eine putative Protein-Protein-Interaktionsstelle enthalten, sowie mindestens zweier Kernlokalisierungssignale (*NLS*, *Nuclear Localization Signals*), welche die *ankyrin/CDC*-Wiederholungen flankieren. Außerdem sind *PEST*-Sequenzen (reich an Prolin, Glutamin, Serin und Threonin), welche Proteine für proteolytische Spaltungen markieren und somit dem schnellen proteolytischen Abbau dienen, und eine glutaminreiche Domäne (*OPA*) vorhanden.

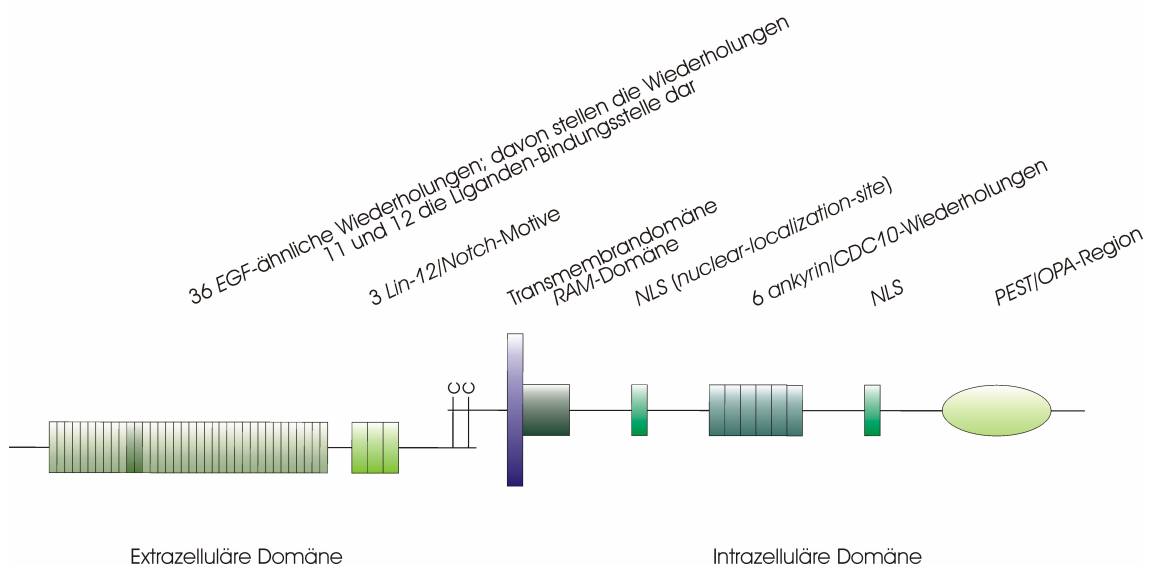


Abb.1. Struktur eines *Notch*-Rezeptors am Beispiel von *Drosophila melanogaster* (modifiziert nach Mumm et al., 2000).

1.2.2 Der *Notch*-Ligand *JAG1*

Von *Drosophila* bis zu den Vertebraten sind verschiedene *Notch*-Liganden bekannt. Unter anderem *Delta* und *Serrate* bei *Drosophila* (Muskavitch et al., 1994), *Lag-2* bei *C.elegans* (Henderson et al., 1994), *Jagged* bei der Ratte (Kopan et al., 1993) und *JAG1*, *JAG2*, *Delta1*, *Delta3*, *Delta4* beim Menschen. *Jagged* bei der Ratte und die Homologen *JAG1* und *JAG2* beim Menschen weisen eine sehr große Ähnlichkeit zu *Serrate* bei *Drosophila* auf. Diese *Notch*-Liganden sind durch eine gemeinsame Struktur gekennzeichnet. Sie besitzen ein hochkonserviertes Motiv in der extrazellulären Domäne, nämlich die *DSL*-Domäne (nach *Delta*, *Serrate*, *Lag2*) (Tax et al., 1994), gefolgt von einer variablen Anzahl an *EGF*-ähnlichen Wiederholungen, einer cysteinereiche Region sowie einer einzelnen transmembranären Domäne. Sowohl die *EGF*-ähnlichen Motive, als auch die *DSL*-Domäne spielen eine Rolle bei der Ligand-Rezeptor-Interaktion (Lieber et al., 1992; Henderson et al., 1994) mit *Notch*.

Da Mutationen in einem der *Notch*-Liganden, dem humanen *JAG1*, zum *Alagille*-Syndrom führen (Li et al., 1997; Oda et al., 1997), soll auf diesen im Folgenden näher eingegangen werden.

JAG1 (MIM#601920) liegt auf Chromosom 20p12 (Gray et al., 1999). Das *JAG1*-Gen besteht aus 26 Exons, die 28 bp bis 2284 bp umfassen. Das Gen codiert eine *mRNA* von 5,5kb (Li et al., 1997) und ein Protein mit einer Länge von 1219 Aminosäuren (Oda et al., 1997). Das humane *JAG1* Protein besteht aus verschiedenen Domänen, einer *DSL*-Domäne, 16 *EGF*-ähnlichen Wiederholungen, einer cysteinereichen Region, einer Transmembrandomäne und einem verhältnismäßig kleinen intrazellulären Bereich (vgl. Abb.2).

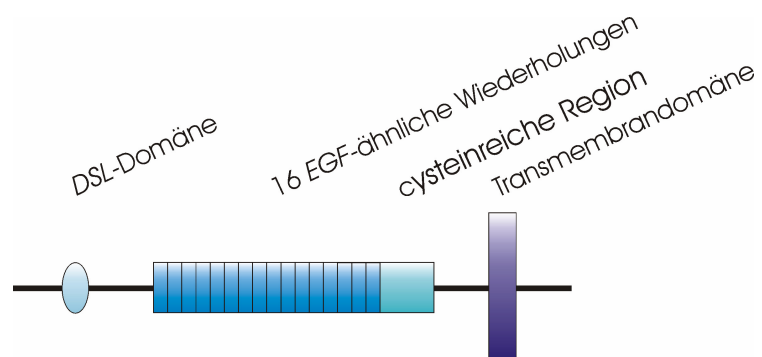


Abb.2. Struktur des humanen *JAG1*-Proteins (modifiziert nach Oda et al., 1997).

1.2.3 Das *Notch*-Signalsystem

Das *Notch*-Signalsystem (vgl. Abb.3) stellt einen wichtigen Mechanismus zur Steuerung von Zellschicksalen, Proliferation und Apoptose dar. Drei proteolytische Spaltungen des *Notch*-Rezeptors sind Voraussetzung für die Reifung und Aktivierung dieses Systems (Chan und Jan, 1998; 1999).

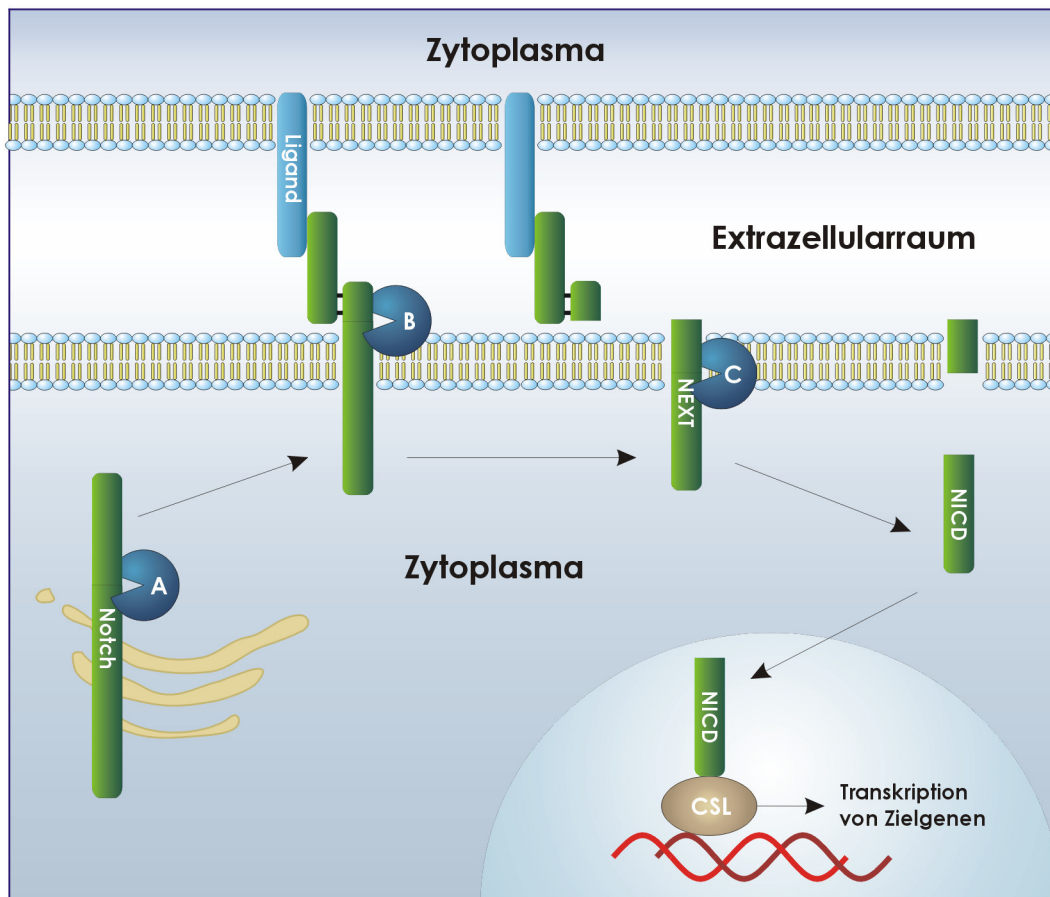


Abb.3. Das *Notch*-Signalsystem; A. furinähnliche Konvertase; B. *TACE*; C. *Presenilin* enthaltender Komplex mit γ -Sekretase-Aktivität (modifiziert nach Literaturbefunden, siehe 1.2.3).

In einem ersten Schritt wird das inaktive *Notch*-Protein von einer furinähnlichen Konvertase (Abb.3, A) im trans-Golgi-Netzwerk gespalten (Kopan et al., 1996; Logeat et al., 1998), wobei die resultierenden Polypeptide als intramolekulares Heterodimer assoziieren (Blaumueller et al., 1997; Logeat et al., 1998). Das nun aktive *Notch*-Protein befindet sich an der Zelloberfläche. Durch Ligandenbindung an den *Notch*-Rezeptor wird eine zweite, extrazelluläre Spaltung erleichtert (Mumm et al., 2000). *TACE*, eine Metalloprotease (Abb.3, B) spaltet das aktivierte *Notch*-Protein (Brou et al., 2000), sodass das intermediäre Peptid *NEXT* (*Notch Extracellular Truncation*) entsteht.

Die Folge hiervon ist eine dritte Spaltung innerhalb der Transmembrandomäne, welche durch einen *Presenilin* enthaltenden Komplex (DeStrooper et al., 1999; Struhl und Greenwald, 1999; Ye et al., 1999) mit γ -Sekretase-Aktivität (Abb.3, C) katalysiert wird. Die hierbei entstehende, sogenannte *NICD* (*Notch Intracellular Domain*) transloziert in den Kern (Kidd et al., 1998; Schroeter et al., 1998; Struhl et al., 1998; Struhl und Greenwald, 1999). *NICD* bindet an verschiedene nukleäre und zytoplasmatische Proteine (Artavanis-Tsakonas et al., 1999; Miele et al., 1999). Der im Detail erforschte Mechanismus ist die Bindung der *NICD* an Transkriptionsfaktoren der *CSL*-Familie (beim Menschen zum Beispiel *RBP-J_k*) im Kern. Durch diese Interaktion konvertieren die *CSL*-Proteine von Transkriptionsrepressoren zu Transkriptionsaktivatoren (Hsieh et al., 1996).

1.2.4 Die *Fringe*-Gen-Familie

In dieses oben beschriebene *Notch*-Signalsystem greifen verschiedene Modulatoren ein. Dazu gehören die Mitglieder der *Fringe*-Gen-Familie, welche die Fähigkeit von *Notch*, seine Liganden zu binden, auf verschiedene Weise beeinflussen (Panin et al., 1997; Fleming et al., 1997). Erstmals wurde *fringe* bei *Drosophila* als ein für die Flügelentwicklung essentielles Gen identifiziert (Irvine und Wieschaus, 1994). Es konnten drei *fringe*-Homologe beim Menschen gefunden werden. Das *Manic-Fringe*-Gen (*MFNG*), das *Lunatic-Fringe*-Gen (*LFNG*) und das *Radical-Fringe*-Gen (*RFNG*). Zu Beginn dieser Arbeit im November 1999 war über diese Gene folgendes bekannt. Das *Radical-Fringe*-Gen liegt auf Chromosom 17q25 (Moran et al., 1999), das *Lunatic-Fringe*-Gen auf Chromosom 7p22 (Egan et al., 1998) und das *Manic-Fringe*-Gen auf Chromosom 22q13.1 (Van Tine et al., 1999). Die genomische Organisation der Mitglieder der *Fringe*-Gen-Familie ist hoch konserviert; alle bestehen aus acht Exons, wobei sich Exon 1 als evolutionär labil erweist (Moran et al., 1999). Die menschlichen *Fringe*-Gene waren nur zu Teilen sequenziert, die Exon-Intron-Strukturen nur unvollständig beschrieben. Vom humanen *Lunatic-Fringe*-Gen war eine partielle *cDNA*-Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer AF193612) verfügbar. Vom murinen *lunatic-fringe*-Gen waren die komplette *cDNA*-Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer U94351) sowie dessen genomische Struktur bekannt.

Die *DNA*-Sequenzen des humanen *Radical-Fringe*-Gens waren nur zu Teilen in den Datenbanken vorhanden. Die *cDNA* war ab einschließlich Exon 4 (Genbank-Zugriffsnummer U94353), die gesamtgenomische Sequenz bis einschließlich Exon 4

bekannt (Genbank-Zugriffsnummer AF108139; vgl. Abb.14.); außerdem war die genomische Struktur dieses Gens beschrieben.

Vom humanen *Manic-Fringe*-Gen war sowohl die *cDNA*-Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer U94352) als auch die gesamtgenomische Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer Z93096) vollständig den Datenbanken zu entnehmen; auch die genomische Struktur war bekannt (Moran et al., 1999).

Außerdem wurde beschrieben, dass die Mitglieder der *Fringe*-Gen-Familie eine Ähnlichkeit zu Glykolsyltransferasen aufweisen, sowohl in der Primär-, als auch in der vorhergesagten Sekundärstruktur (Yuan et al., 1997).

1.3 Fragestellung und Zielsetzung vorliegender Arbeit

Es wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen (Oda et al., 1997; Li et al., 1997) gezeigt, dass Mutationen im *JAG1*-Gen zum *Alagille*-Syndrom führen. Allerdings konnten bisher nur bei 65-70% der Patienten mit *Alagille*-Syndrom tatsächlich Mutationen im *JAG1*-Gen nachgewiesen werden. Es ist davon auszugehen, dass ein Teil der Patienten Mutationen hat, welche bisher nur nicht nachgewiesen werden konnten, da zum Beispiel die Sensitivität der *SSCP*-Analyse nur 80% beträgt (Heritage et al., 2000), bisher nur die kodierenden Bereiche inklusive der *Splice*-Stellen des *JAG1*-Gens untersucht wurden und bei Patienten mit Mosaiken die Detektion mittels *SSCP* und Sequenzierung schwierig ist. Trotzdem gibt der besonders hohe Prozentsatz von Patienten mit *Alagille*-Syndrom ohne nachgewiesene Mutationen im *JAG1*-Gen Anlass zur Vermutung, dass genetische Heterogenität vorliegt. Diese wird auch bei anderen Erkrankungen wie zum Beispiel der *Fanconi*-Anämie (Moustacchi und Diatloff-Zito, 1985) oder dem *Saethre-Chotzen*-Syndrom (Ma et al., 1996; Paznekas et al., 1998) beschrieben.

Wie oben beschrieben handelt es sich bei der *Notch*-Signalkaskade um eine komplexe Signalweiterleitung, die von weiteren Proteinen abhängig ist. Zu diesen gehören die *Fringe*-Proteine, welche die Bindung von *JAG1* an *Notch* kontrollieren. Dieser Zusammenhang macht die *Fringe*-Gene zu möglichen Kandidatengenen des *Alagille*-Syndroms.

Ziel der Arbeit sollte es sein, zu untersuchen, ob bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom, bei denen bisher keine Mutationen im *JAG1*-Gen nachweisbar waren Veränderungen im Bereich der *Fringe*-Gene vorliegen.

Aus den oben geschilderten Tatsachen ergaben sich für die vorliegende Arbeit folgende Aufgaben.

1. Komplettierung der *DNA*-Sequenzen des *Lunatic-Fringe*-Gens sowie des *Radical-Fringe*-Gens
2. Darstellung der genomischen Struktur des *Lunatic-Fringe*-Gens
3. Suche nach Mutationen innerhalb des *Lunatic*-, des *Radical*- sowie des *Manic-Fringe*-Gens bei Probanden mit *Alagille*-Syndrom

2. Material und Methoden

2.1. Material

2.1.1 Chemikalien

Ampuwa	Fresenius AG, Bad Homburg, D
AdvanTAge PCR Cloning Kit	Clontech, Palo Alto, USA
Agar	Fluka Chemika AG, Buchs, Schweiz
Agarose	Gibco BRL, Eggenstein, D
Ammoniumperoxodisulfat	Serva, Heidelberg, D
Borsäure	Merck, Darmstadt, D
Bromphenolblau	Merck, Darmstadt, D
Chloramphenicol	Fluka, Buchs, Schweiz
Chlorophorm	Merck, Darmstadt, D
Clontech-2-Polymerase-Mix	Clontech, Heidelberg, D
Desoxyribonukleotide (dNTPs)	Amersham, Cleveland, Ohio, USA
	Boehringer, Mannheim, D
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Roth, Karlsruhe, D
Dye Terminator Cycle Sequencing Kit	ABI, Weiterstadt, D
EDTA	USB, Cleveland, Ohio, USA
Essigsäure	Merck, Darmstadt, D
Ethanol	Merck, Darmstadt, D
Ethidiumbromid	Merck, Darmstadt, D
Ficoll 400	Sigma, Deisenhofen, D
Formamid	Fluka, Neu-Ulm, D
Formamid loading dye	Amersham, Cleveland, Ohio, USA
Glycerin	GIBCO/BRL, Paisley, Schottland
Hefeextrakt	GIBCO/BRL, Paisley, Schottland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, D
Kaliumacetat	Roth, Karlsruhe, D
MDE	Biozym
Natriumhydroxyd	Roth, Karlsruhe, D
Natriumacetat	Applied Biosystems
Natriumchlorid	Roth, Karlsruhe, D
Oligonukleotide	Amersham Pharmacia

OrangeG	Sigma, Deisenhofen, D
Phenol	Gibco BRL, Eggenstein, D
RNAse A	Boehringer, Mannheim, D
SDS	USB Amersham, Cleveland, Ohio, USA
Taq-DNA-Polymerase	Boehringer, Mannheim, D
Taq-Polymerase	Promega
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Merck, Darmstadt, D
Tris	Sigma, Deisenhofen, D
Trypton	GIBCO/BRL, Paisley, Schottland

2.1.2 Längenstandards

pUC-Mix Marker 8	MBI/Fermentas, St. Leon-Roth, D
λ -DNA-HindIII	NEB, Schwalbach, Taunus, D
1kb-Leiter	Boehringer, Mannheim, D

2.1.3 Gebrauchswaren

Filterpapier	Schleicher&Schüll, Dassel, D
Glaswaren	Schott, Jena, D
Petrischalen	Greiner, Nürtingen, D
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, D
Plastikwaren	Falcon, Heidelberg, D
	Greiner, Nürtingen, D
	MbP, San Diego, USA
	Sarstedt, Nümbrecht, D
Reaktionsgefäße	Eppendorf, Hamburg, D
Skalpelle, steril	Swann-Morton, Sheffield, UK
Sterilfilter	Renner, Darmstadt, D

Hier nicht aufgeführte Gebrauchswaren wurden von den Firmen Schütt, Krannich und Heinemann (alle Göttingen) bezogen.

2.1.4 Geräte

ABI Sequencer 733	Applied Biosystems, Weiterstadt, D
Autoklav, Modell Sanoclav	Schütt, Göttingen, D
Elektrophoresekammern	Owl Separat. Systems Inc., Portsmouth, USA
Heizblock	HLC-Heap Labor Consult Bovenden, D
Mikroliterpipetten, Gilson, Pipettman	Abimed, Langenfeld, D
Mikrowelle	Privileg
Multipette	Eppendorf, Hamburg, D
pH-Meter, Typ CG 810	Schott, Hofheim, D
Schüttelinkubator	New Brunswick, Edison, New Jersey, USA
Schüttler, 3005	GFL
Sequenziergerät, Alf Express mit Auswertungs- programmen für Computer	Pharmacia, Freiburg, D
Thermocycler, GeneAmp 9600	Perkin Elmer Cetus, Weiterstadt, D
Thermocycler, Mastercycler Gradient	Eppendorf, Hamburg, D
Transilluminator	Herolab, Wiesloch, D
Videoprinter, E.A.S.Y. Image Plus	Herolab, Wiesloch, D
Video copy Processor	Mitsubishi, Japan, D
Vortex, Reax-top	Heidolph, Schwabach, D
Waagen	Sartorius, Göttingen, D
Zentrifuge, Megafuge 1.0R	Heraeus, Osterode, D
Zentrifuge, 3K20	Sigma, Deisenhofen, D
Tischzentrifuge, Biofuge pico	Heraeus, Osterode, D
Tischzentrifuge, Biofuge A	Heraeus, Osterode, D

2.1.5 Puffer und Stammlösungen

AL1	50 mM Glukose
	25 mM Tris, pH 8,0
	10 mM EDTA, pH 8,0
AL2	0,2 N NaOH
	1 % SDS

AL3	3 M	Kaliumacetat, pH 5,5
Elektrophorese-Ladepuffer	0,1 %	Bromphenolblau
	15 %	Ficoll 400
Formamid-Ladepuffer	85 %	Formamid
	0,1 %	Dextranblau
Lysepuffer (Blut)	155 mM	NH ₄ Cl
	10 mM	KHCO ₃
	0,1 mM	EDTA
SE-Puffer	75 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
TBE-Puffer (5X)	445 mM	Tris
	445 mM	Borsäure
	10 mM	EDTA, pH 8,0
TE-Puffer (10x)	100 mM	Tris-HCl, pH 7,6
	10 mM	EDTA, pH 8,0

2.1.6 Nährböden und Medien

LB-Medium (Luria-Bertrani)	1 %	Bacto-Trypton
	0,5 %	Bacto-Hefeextrakt
	1 %	NaCl, pH 7,2

Das Nährmedium wird autoklaviert und anschließend bei etwa 50 °C mit Chloramphenicol (25 µg/ml) versetzt.

Zur Herstellung von LB-Agar-Nährböden wird das Medium vor dem Autoklavieren mit 1,5 % Agar versetzt. Im Anschluss daran wird bei einer Temperatur von etwa 50 °C Chloramphenicol (25 µg/ml) zugesetzt. Nun wird das Medium zügig unter der Sterilbühne in Petrischalen gegossen und nach dem Erstarren bei 4 °C gelagert.

2.1.7 Sterilisation von Lösungen und Geräten

Hitzestabile Lösungen wurden bei 120 °C und 100 kPa für die Dauer von 20 Minuten autoklaviert. Temperaturempfindliche Lösungen wurden steril filtriert (Porengröße 0,2 µm). Die Sterilisation von Gebrauchsgegenständen wurde durch Autoklavieren oder Hitzesterilisation (12 Stunden, 180 °C) erreicht.

2.1.8 Primer

Alle *Primer* (vgl. Tab.1) wurden mit Hilfe des Programmes *Primer3* unter [http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer](http://www.genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer) ausgehend von den im Ergebnisteil genannten Sequenzen generiert.

Tab.1. Bezeichnung, Sequenzen und Größen der *PCR*-Produkte der im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Primer*.

<i>forward-Primer</i>	<i>Primersequenz</i>	<i>Reverse-Primer</i>	<i>Primersequenz</i>	Größe des <i>PCR</i> -Prod. (bp)
lunex2-f	aga agg gtg ggt gtc agt	lunex2-r	gtt cgg ctc tgg atg gag	231
lunex3-f	gcc ggc tca gac cta ctc	lunex3-r	cag aac cac ctg agg aca ag	244
lunex4-f	atg gcc ctg cct tgt cct	lunex4-r	gct ggg aga agg gag aag gt	293
lunex5-f	gcg aga aca agg tgg tga g	lunex5-r	gct ggg aag atg aac taa gc	298
lunex6-f	cct ctg ctc act ggt ctg g	lunex6-r	ctt cct gtg ctc tcg gag tc	248
lunex7-f	ggt gtc ctt cca ggt cca ag	lunex7-r	cct acg caa gcc cat ctg	247
lunex8-f	cac gag ctc aca gag tcc ac	lunex8-r	aga ggg agg tgc agc att ac	178
nx2-r	ggc ggg gag gtt taa gag	xn-r	tga gca ggc tga agt act cg	
lunin2ex3-f	gaa aaa gct gcc tga atg g	lunin2ex3-r	ttt gtg atg acc acg ttg c	
manex1-f	cct gtc tgg ttg gga ttt g	manex1-r	tag aaa ggc ctc tga gaa cc	376
manex2-f	cac tgg agg agt aca gag tcc	manex2-r	cag gca aca gct aaa gtc c	206
manex3-f	gcc ttg ctc tgt att ctg tg	manex3-r	cag ggg tta ttt tca atg g	242
manex4-f	act gtt gac cga ctg tgg	manex4-r	tct cac ctc tct agc aca cc	329
manex5-f	ttc aaa ata aag ggc ttt tg	manex5-r	aaa ggc ccc tcc tgt acc	272
manex6-f	cag ctt gtc cca gtg gag	manex6-r	ccc atg ttc ctt tgg ttc	316
manex7-f	tta aaa ccc ctc ctc cac	manex7-r	gtt tgg atg cct gga ctc	238
manex8-f	tag gag agt ggg ctg aga g	manex8-r	aag gca cac cca gaa gtc	181
radex2-f	gct gcg cac ctg gat ctc	radex2-r	gct tcg gag cga gaa agg	304
radex3-f	cag tgc cag cct cta cgt g	radex3-r	atc atc cac gtg gca aaa c	275

radex4-f	aga gct cag agc caa gct g	radex4-r	gtg tca agg aag gcg tct g	281
radex5-f	gag tcc cat gaa gag tca gg	radex5-r	cag cac ctt tca ggt ctc ag	216
radex6-f	ctg aga cct gaa agg tgc tg	radex6-r	aaa gcc cag gtg gca gag	242
radex7-f	aca cac tct gcc cac acc	radex7-r	tgt gta gag gga gct gat gc	263
radex8-f	tga ccc cta ctt ctt cct tcc	radex8-r	agg tgc ctg cat ctc act g	226
radex4-ex5-f	acc tgc tct cca gct tct c	radex4-ex5-r	cat ggg ctcbatc ttg agg	395
radex5-ex6-f	aag ttc tgg ttt gct act gg	radex5-ex6-r	gcc aac tgt gca gtc atc	75
radex6-ex7-f	ccc tct tcc act ctc acc tg	radex6-ex7-r	acg ttc acc acg ttc tgt g	585
radex7-ex8-f	ctc cag cag gtt acc ttg ag	radex7-ex8-r	tgg tgt cac cga gag gtc	242

Die Positionen der einzelnen *Primer* in bestimmten Sequenzen werden unter "Ergebnisse" aufgeführt.

2.1.9 Art und Herkunft der untersuchten DNA

Patienten mit Verdacht auf AGS wurde von betreuenden Ärzten EDTA- und Heparinblut entnommen und dem Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg zugeschickt. Dort wurde aus dem Blut DNA isoliert, die anschließend auf Mutationen im *JAG1*-Gen untersucht wurde (Röpke et al., 2003). Konnten keine solche Mutationen nachgewiesen werden, wurde sie für die Untersuchungen vorliegender Arbeit verwendet.

2.1.10 Art und Herkunft der *BAC*-Bank

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die *BAC*-Bank 753 verwendet, welche DNA aus der Bank „RPCI-11 *Human Male BAC*“ enthielt. Der Klon RPCIB753O16811Q2 enthält das *LFNG* und wurde für den Versuch, unbekannte Sequenzen zu entschlüsseln verwendet.

Das Material wurde vom Ressourcenzentrum für das deutsche Humangenomprojekt am Max Plank Institut für Molekulare Genetik in Berlin zur Verfügung gestellt (<http://www.rzpd.de>).

2.2 Methoden

Die Methoden wurden, wenn nicht anders angegeben, nach Sambrook et al. (1989) durchgeführt.

2.2.1 Isolierung genomischer *DNA* aus Blut (nach Baas et al., 1984; Miller et al., 1988)

10 ml Vollblut werden mit 30 ml kaltem Lysepuffer versetzt, gemischt und für 30 Minuten auf Eis gelegt. Anschließend werden die Lymphozyten durch Zentrifugation (2000 U/min; 15 Minuten; 4°C) pelletiert. Das *Pellet* wird in 10 ml Lysepuffer resuspendiert, für 15 Minuten auf Eis inkubiert und nochmals zentrifugiert (2000 U/min; 15 Minuten; 4°C). Alles wird so lange wiederholt, bis das *Pellet* beigefarben erscheint. Das *Pellet* wird nun über Nacht bei 55°C in SE-Puffer vollständig resuspendiert und die Lymphozyten durch Zugabe von 25 ml Proteinase K (10 mg/dl) und 500 µl SDS proteolytisch gespalten. Am nächsten Tag wird der Ansatz nach Abkühlung auf Raumtemperatur und Zugabe von 1,5 ml gesättigter Kochsalzlösung 15 Sekunden lang gut gemischt. Nach Zentrifugation (4000 U/min; 15 Minuten; Raumtemperatur) wird der Überstand in ein neues *Tube* gefüllt, die *DNA* mit 2 Vol. Ethanol_{abs.} gefällt. Nachdem das Präzipitat mit Hilfe einer Pipettenspitze in ein Reaktionsgefäß gebracht und pelletiert (10000U/min; 10 Minuten; 4°C) wurde, wird das *Pellet* mit 70%igem Ethanol gewaschen, luftgetrocknet und in 250 µl 1xTE-Puffer aufgenommen. Die *DNA* wird bei 4°C gelagert.

2.2.2 Isolierung von *BAC-DNA*

Für den Aufbau einer Genbank wird genomische *DNA* isoliert, fragmentiert und die Fragmente in einen Vektor eingebaut. Damit wird dann eine Wirtszelle infiziert. Dadurch können einzelne Abschnitte der *DNA* beliebig vermehrt werden. Als Bank wird die Gesamtheit der Klone bezeichnet, die alle unterschiedliche *DNA*-Insertionen enthalten. Im Falle der *BAC*-Bank sind diese Vektoren künstliche Bakterienchromosomen (*Bacterial Artificial Chromosomes*). *BACs* sind zirkuläre Vektoren, die Fragmente bis über 300 kbp aufnehmen können. Ihr Vorteil gegenüber anderen Vektoren liegt in der großen Stabilität der klonierten *DNA* und der einfachen *DNA*-Isolierung.

Im Folgenden wird die Isolierung von *BAC-DNA* beschrieben, die auf der alkalischen Lyse von Birnboim und Doly (1979) beruht.

35 ml chloramphenikolhaltiges (25 µg/ml) LB-Medium wird mit einer einzelnen Plattenkolonie angeimpft. Diese wird bei 37°C für 20 bis 24h unter Schütteln wachsen gelassen. Anschließend folgt eine Zentrifugation der Bakterienkultur (4000 U/min; 10 Minuten). Das *Pellet* wird in 3 ml gekühlter AL1-Lösung resuspendiert und anschließend mit 10 ml AL2-Lösung versetzt. Diese Lösung bewirkt die Lyse der Bakterien. Nachdem der Ansatz gut gemischt wurde erfolgt der Zusatz von 7,5 ml AL3-Lösung, wodurch es zum Ausfallen von Proteinen, chromosomaler *DNA* und hochmolekularer *RNA* kommt. Nach erneutem guten Mischen wird der Ansatz 5 Minuten auf Eis gelegt und anschließend der Niederschlag abzentrifugiert (4000 U/min; 10 Minuten; 4°C). Der Überstand, in welchem sich die *BACs* befinden, wird in ein neues Reaktionsgefäß filtriert und nach Zugabe von 10 ml Isopropanol gut gemischt. Nachdem der Ansatz 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert wurde erfolgt eine erneute Zentrifugation (4000 U/min; 15 Minuten; 4°C). Der Überstand wird verworfen, das *Pellet* bei Raumtemperatur getrocknet und anschließend in 200 µl Wasser aufgenommen. Anschließend werden 200 ng/µl *RNAse A* zugegeben. Es folgt eine Inkubation bei 37°C von 1h. Durch die anschließende Phenol-/Chloroform-Extraktion werden die Proteine aus der Lösung entfernt. Zum Schluss erfolgt noch eine Fällung der *DNA* mit 0,1 Vol. NaAc, 2Vol. Ethanol_{abs.} und 1 mg Glykogen. Danach wird das *Pellet* in 20 µl H₂O aufgenommen und steht der weiteren Verwendung zur Verfügung. Eine andere Methode *BAC-DNA* zu gewinnen ist die sogenannte Kochmethode. Der Vorteil dieser Methode ist vor allem die kurze Dauer. Nachteile sind unter anderem die größere Menge an Bakterienkolonien die benötigt wird um nur sehr wenig *DNA* zu gewinnen und das relativ große Risiko, verunreinigte *DNA* zu erhalten. Es werden etwa drei Bakterienkolonien gepickt. Diese werden in 50 µl H₂O aufgenommen und anschließend 5 bis 10 Minuten bei 100°C gekocht. Nun folgt über 5 Min eine Zentrifugation der Lösung bei 13000 U/min. 5 µl des Überstandes können nun als *Template* für eine *PCR* eingesetzt werden.

2.2.3 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren mittels photometrischer Bestimmung

Die Bestimmung der *DNA*-Konzentration erfolgte im Spektralphotometer. Das Prinzip beruht darauf, dass hochmolekulare *DNA* ein Absorptionsmaximum bei 260 nm aufweist, Salze und organische Lösungsmittel bei 230 nm ihr Absorptionsmaximum haben, während es für Proteine bei 280 nm liegt.

Zur Bestimmung des *DNA*-Gehaltes wird auf der Grundlage des Lambert-Beer-Gesetzes bei einer Küvettendicke von 10 mm der gemessene Extinktionswert (E) bei 260 nm mit dem molekularen Extinktionskoeffizienten (e) für Säuger-Doppelstrang-*DNA* und dem Verdünnungsfaktor (f) multipliziert.

$$c_{\text{DNA}} = E_{260} \cdot e \cdot f$$

Die Konzentration der Nucleinsäuren wird in $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ angegeben. Bei einem Extinktionswert $E_{260} = 1$ gilt:

$c = 50 \mu\text{l}/\mu\text{g}$ bei doppelsträngiger *DNA*

$c = 40 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei *RNA*

$c = 25 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ bei Oligonukleotiden

Eine Verunreinigung der *DNA* durch Proteine wird durch eine anschließende Messung bei 280 nm festgestellt. Es wird dazu der Quotient aus beiden Messungen ($E_{260\text{nm}}/E_{280\text{nm}}$) gebildet. Optimal ist ein Quotient zwischen 1,7 und 2,0.

Ein Wert über 2,0 spricht für eine Verunreinigung mit degradiertes *DNA* oder *RNA*, ein Wert unter 1,4 lässt auf eine Verunreinigung durch Proteine schließen.

2.2.4 Horizontale Agarose-Gelelektrophorese

Bei einer Elektrophorese werden Proteine oder Nucleinsäuren auf Grund ihrer geladenen oder ionisierbaren Gruppen und ihres Molekulargewichtes innerhalb eines elektrischen Feldes getrennt. Dieses ist abhängig vom pH-Wert des verwendeten Mediums und der Art und Konzentration des verwendeten Puffers. Als Trägermatrix werden netzbildende Substanzen verwendet, im Fall der horizontalen Agarose-Gelelektrophorese Agarose. Abhängig von der erwarteten Größe der aufzutrennenden Produkte werden Agarosegele mit einer Agarosekonzentration zwischen 0,5 (bei sehr großen Fragmenten) und 2,0 (bei kleinen Fragmenten) verwendet. Bei vorliegender Arbeit wurden meistens *PCR*-Produkte zwischen 180 und 400 bp aufgetrennt. Bei Fragmenten dieser Größenordnung wurde eine Agarosekonzentration von 1,5% gewählt.

Um die Fragmente im Anschluss sichtbar zu machen wird die Interkalation des Basenanalogs Ethidiumbromid genutzt, welches bei UV-Bestrahlung Licht im sichtbaren Bereich emittiert.

Die Größe der Fragmente wird durch Vergleich mit Fragmenten definierter Größe eines parallelgelaufenen Markers bestimmt.

Durchführung:

1,5 g Agarose werden in 100 ml 0,5xTBE-Puffer durch Kochen in einem Mikrowellengerät gelöst, bis beim Schwenken im Gel keine Schlieren mehr zu erkennen sind. Nach Abkühlen unter Rühren auf ca. 60°C wird das Gel in eine Gelkammer mit eingehängtem Kamm gegossen. Nach ca. 20 min ist das Gel ausgehärtet, der Kamm wird gezogen und der Laufpuffer (0,5xTBE-Puffer) in die Elektrophoresekammer gegossen. Die mit jeweils 0,2 Vol. Ladepuffer (Ficoll) versetzten Proben werden nun jeweils in eine Geltasche eingebracht, eine Tasche wird mit einem Längenstandard beschickt. Nach dem Auftragen aller Proben wird eine Spannung an die Elektrophoresekammer angelegt. Diese sollte etwa 3V/cm Gelgröße betragen.

Nach dem Lauf werden die nun aufgetrennten Proben durch Färben mit Hilfe der Ethidiumbromidlösung markiert und durch einen UV-Transilluminator sichtbar gemacht.

2.2.5 Isolierung von *DNA*-Fragmenten aus Agarosegelen

Die durch die Agarosegelelektrophorese isolierten *DNA*-Fragmente müssen aus dem Gel eluiert und von Verunreinigungen getrennt werden. Die gewünschten *PCR*-Fragmente werden unter UV-Licht aus dem Agarosegel ausgeschnitten. Daraufhin wird die *DNA* bei 13 000 U/min durch einen Filter in ein Eppendorfgefäß abzentrifugiert. Die *DNA* befindet sich nun, auf Grund der Zentrifugalkräfte gelöst und durch den Filter von Rückständen getrennt, im Reaktionsgefäß. Anschließend wird die *DNA* mit 2,5 Vol. Ethanol_{abs.} und 0,1 Vol. 7,5 M Ammoniumacetat gefällt und mit 70%igem Ethanol gewaschen. Die *DNA* ist nun auch von gelösten Verunreinigungen getrennt und wird in H₂O aufgenommen.

2.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) (nach Saiki et al., 1988)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*PCR*) stellt ein Verfahren dar mit dem es möglich ist gezielt *DNA*-Abschnitte, die von zwei bekannten Sequenzen begrenzt werden, exponentiell zu vervielfältigen. Dies ist selbst bei geringen Ausgangsmengen möglich.

Voraussetzung sind chemisch synthetisierte Oligonukleotid $primer$ als Starthilfe. Diese sind kurze, einzelsträngige DNA -Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA -Matrize ($Template$) sind. Eine hitzestabile Polymerase verlängert, unter den richtigen Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxyribonucleotiden, die $Primer$ entlang der einzelsträngigen, denaturierten DNA -Matrize und synthetisiert so neue DNA -Stränge, deren Sequenz komplementär zur Matrize ist. Dieser Vorgang wird mehrere Male wiederholt, wobei das synthetisierte DNA -Fragment exponentiell vermehrt wird.

In der vorliegenden Arbeit wurde zur Durchführung der $PCRs$ in den meisten Fällen der im Folgenden aufgeführte Ansatz (vgl. Tab.2) angewandt. Je nach $Primer$ paar und DNA -Qualität wurde er jedoch modifiziert um die Bindungsspezifität der $Primer$ zu optimieren. So kommt es zum Beispiel durch Zugabe von Formamid oder DMSO zu einer Steigerung der Bindungsspezifität, während $MgCl_2$ eine Abnahme derselben bewirkt.

Tab.2. Standardansatz der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten $PCRs$.

	Menge (μ l)	Konzentration der Stammlösung
Puffer	2	10 x
dNTPs	0,5	10 mM
Taq	0,14	5 U/ μ l
<i>Primer forward</i>	1	10 pmol/ μ l
<i>Primer reverse</i>	1	10 pmol/ μ l
DNA	1	100 ng/ μ l
H₂O	14,36	

Die im Folgenden aufgeführten PCR -Programme wurden im Verlauf dieser Arbeit angewandt.

Programm 1:

Denaturierung	3' bei 94 °C	} 35 Zyklen
Denaturierung	45'' bei 94 °C	
<i>Annealing</i>	45'' bei Temp. s. Ergebnisteil	
Elongation	45'' bei 72 °C	
Elongation	7' bei 72 °C	

Programm 2:

Denaturierung	3´ bei 94°C	} 35 Zyklen
Denaturierung	45´´ bei 94°C	
<i>Annealing</i>	45´´; von Zyklus zu Zyklus sinkt die Temperatur um 1°C von 65°C auf 55°C; die verbleibenden Zyklen werden bei 55°C gefahren	
Elongation	45´´ bei 72°C	
Elongation	7´ bei 72°C	

Programm 3:

Denaturierung	3´ bei 94°C	} 35 Zyklen
Denaturierung	45´´ bei 94°C	
<i>Annealing</i>	<i>Annealingzeit</i> verlängert sich pro Zyklus um eine Sek. von 45 auf 80 Sek.; Temp. s. Ergebnisteil	
Elongation	45´´ bei 72°C	
Elongation	7´ bei 72°C	

Programm 4:

Denaturierung	3´ bei 94°C	} 35 Zyklen
Denaturierung	45´´ bei 94°C	
<i>Annealing</i>	45´´ bei 58°C	
Elongation	3´ bei 72°C	
Elongation	7´ bei 72°C	

2.2.7 DNA-Sequenzierung (nach Sanger et al., 1977)

Die Sequenziermethode nach Sanger beruht auf dem zufälligen Einbau von Didesoxinukleotiden (ddNTPs) während der Polymerasekettenreaktion. Die DNA-Matrize ist einzelsträngig. In dem Sequenzieransatz sind außer dNTPs auch mit verschiedenen Fluorophoren markierte ddNTPs vorhanden. Diese liegen in wesentlich geringeren Mengen als die dNTPs vor. Es kommt nun in statistischer Verteilung an

einer der vielen Positionen, an denen das entsprechende Nukleotid vorkommt, zu einem Abbruch der *DNA*-Synthese. Dies liegt am Fehlen der für die Kettenverlängerung notwendigen 3`-OH-Gruppe an der Didesoxyribose. Es entsteht dadurch eine Serie komplementärer Fragmente, die gelelektrophoretisch ihrer Größe nach aufgetrennt werden können. Während der Elektrophorese misst ein Detektor die verschiedenen Fluoreszenzsignale. Diese werden von einem Computer ausgewertet und als vollständige Sequenz wiedergegeben.

Im Rahmen vorliegender Arbeit wurde die im Folgenden beschriebene nichtradioaktive „Taq-Dye-Terminator-Sequenzierung“ durchgeführt. Die *PCR*-Fragmente, welche sequenziert werden sollen, werden in Form von Agaroseblöckchen aus dem Gel herausgeschnitten. Die *DNA* wird durch Abzentrifugieren bei 13000 U/min durch einen Filter eluiert. Der Sequenzieransatz wurde aus folgenden Chemikalien zusammengesetzt:

11 μ l *PCR*-Amplifikat
1 μ l *Primer* (5 pmol)
8 μ l *Taq Dye Terminator*

Die Sequenzierungsreaktion erfolgt unter folgenden Bedingungen:

30 sek	95°C	Vordenaturierung	} 25 Zyklen
30 sek	95°C	Denaturierung	
15 sek	50°C	<i>Annealing</i>	
4 min	60°C	Elongation	

Nach Abschluss der Sequenzierreaktion wird die *DNA* mit 2 μ l 3M Natriumacetat und 45 μ l Ethanol_{abs.} versetzt. Als Fällungshilfe kann außerdem 0,5 – 1 ml Glykogen dazugegeben werden. Das Ganze wird über Nacht bei -20°C inkubiert und anschließend 15 Minuten bei 13000 U/min zentrifugiert. Das *Pellet* wird in ca. 250 μ l 70%igem Ethanol gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Abgießen des Überstandes bei 36°C getrocknet. Das *Pellet* wird in 4 μ l Formamid-Ladepuffer aufgenommen.

Die gelelektrophoretische Analyse der Sequenzierung erfolgt auf einem *ABI-Sequencer* 733 der Firma Applied Biosystems, im Zentrum für medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Medizinischen Fakultät Halle.

2.2.8 Analyse von Einzelstrangkonnformationspolymorphismen (*single-stranded conformation polymorphism, SSCP*) (nach Orita et al., 1989)

Die *SSCP* gestattet die Untersuchung mutierter oder polymorpher *DNA*-Abschnitte, ohne genaue Kenntnis der zugrundeliegenden Veränderung. Die Zielsequenz, meist im kodierenden Bereich der Gene, wird mittels *PCR* amplifiziert, wobei die *Primer* *Cy5*-markiert sein müssen. Die *PCR*-Produkte werden dann verdünnt und denaturiert auf einem nativen, nicht-denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die beiden Einzelstränge der *PCR*-Produkte wandern separat durch das Gel, wobei die Wanderungsgeschwindigkeit von der räumlichen Konformation der Moleküle abhängt. Diese wiederum hängt von der Art und Weise, wie die Einzelstrang-*DNA* mit sich selbst eine partielle Basenpaarung eingeht, und damit letztlich von der Basensequenz, ab. Unterscheidet sich die Basensequenz einer Probe von der des Wildtyps, so ergeben sich Verschiebungen von Banden (*band-shifts*), weil der mutierte Einzelstrang eine andere Wanderungsgeschwindigkeit besitzt, als der Wildtyp-Einzelstrang.

Das zur Durchführung der *SSCP* benötigte Gel wurde wie folgt hergestellt. 7,5 ml eines 2xMDE-Gels werden mit 3,6 ml 5xTBE und 18,9 ml H₂O in einen Entgasungskolben gefüllt, gemischt und anschließend 5 Minuten lang entgast. Daraufhin wird der Inhalt mit 12 µl TEMED und 120 µl APS (10%) versetzt, gemischt und zügig in die vorbereitete Glaskammer gegossen. Die Polymerisationszeit beträgt etwa 2 Stunden.

Nachfolgend werden die Durchführung und die Auswertung einer *SSCP* beschrieben. Es werden 0,5 µl des *PCR*-Produktes zusammen mit 20 µl Ladepuffer in ein Eppendorfgefäß gefüllt. Anschließend wird die Lösung 3 Minuten lang auf 90 °C erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt um eine Renaturierung zu vermeiden. Nun werden jeweils 2 µl der Proben auf jeweils zwei Gele aufgetragen, von denen eines bei 10 °C, das andere bei 18 °C läuft. Die Elektrophorese wird bei einer Spannung von 1500 V und einer Leistung von 15 Watt durchgeführt. Als Laufpuffer wird 0,6x TBE-Puffer verwendet. Die Laufzeit beträgt, je nach Größe der Fragmente, zwischen 2 und 6 Stunden.

Die Aufzeichnung und Auswertung der Ergebnisse erfolgt mit Hilfe des Computerprogramms Allelink (Pharmacia).

3. Ergebnisse

3.1 Komplettierung der *DNA*-Sequenzen sowie Darstellung der genomischen Struktur des humanen *Lunatic-Fringe*-Gens

Zu Beginn dieser Arbeit war das humane *Lunatic-Fringe*-Gen nicht charakterisiert. Es war eine 1067 bp umfassende *cDNA*-Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer AF193612, vgl. Abb.4) dieses Gens verfügbar. Diese *cDNA*-Sequenz endete in 3'-Richtung mit dem Translations-Stopcodon TAG; das Translations-Startcodon war jedoch in dieser Sequenz nicht enthalten. Somit bestand das Ziel, die *cDNA*-Sequenz des humanen *Lunatic-Fringe*-Gens zu komplettieren, sowie die Sequenz der gesamtgenomischen *DNA* dieses Gens zu ermitteln. Neben der partiellen *cDNA*-Sequenz des humanen *Lunatic-Fringe*-Gens war die komplette *cDNA*-Sequenz des murinen *lunatic-fringe*-Gens verfügbar (Genbank-Zugriffsnummer U94351); außerdem war die genomische Struktur des murinen *lunatic-fringe*-Gens beschrieben (Moran et al., 1999).

3.1.1 Komplettierung von *DNA*-Sequenzen des *Lunatic-Fringe*-Gens mittels *in silico* Analyse

Die partielle *Lunatic-Fringe*-*cDNA* AF193612 wurde mittels *BLASTN* (*Basic Local Alignment Search Tool for Nucleotids* unter <http://www.blast.genome.ad.jp>) mit Nukleotidsequenzen verschiedener Datenbanken verglichen (*EMBL*, *Swissprot*, *GeneBank*). Durch diesen Vergleich wurde eine 167.469 bp umfassende Sequenz gesamtgenomischer *DNA* (Genbank-Zugriffsnummer AC012351; vgl. Abb.4) gefunden. Diese setzte sich aus fünf zufällig angeordneten *Kontigs* des homo sapiens *BAC*-Klons MS2312I03 zusammen, wobei sich die *cDNA* AF193612 vollständig im 5'-Bereich eines dieser *Kontigs* befand (vgl. Abb.4). Bei der in Abb.4 dargestellten Reihenfolge der *Kontigs* handelt es sich um eine willkürliche Anordnung der Teilsequenzen durch den Herausgeber dieser Sequenz (unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov> am 28.10.1999). Die gesamtgenomische *DNA*-Sequenz AF012351 entsprach exakt der *cDNA*-Sequenz AF193612 und enthielt somit keine neuen Informationen über bisher unbekannte Sequenzen im kodierenden Bereich des *Lunatic-Fringe*-Gens. Sowohl die *cDNA*-Sequenz als auch die gesamtgenomische Sequenz brachen an identischer Stelle in 5'-Richtung ab (vgl. Abb.4,↓).

AF193612

Partielle cDNA
des LNFGTeilsequenz aus
AC012351

AC012351

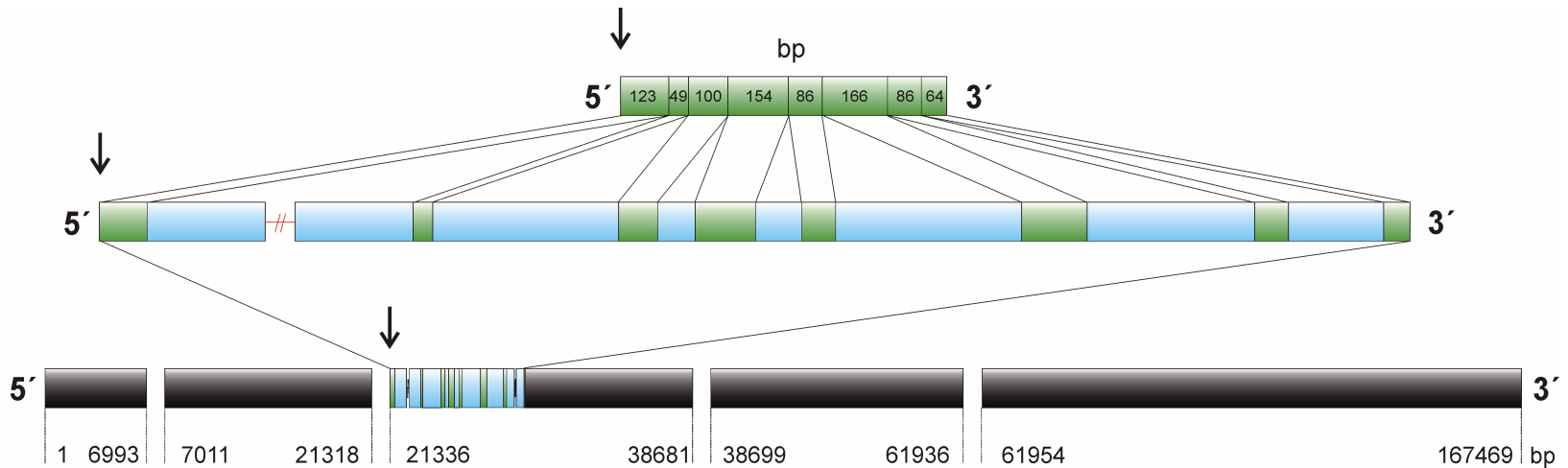
Homo sapiens BAC-
Klon bestehend aus
fünf willkürlich ange-
ordneten Kontigs

Abb.4. Partielle *cDNA*-Sequenz des *Lunatic-Fringe*-Gens (*LFNG*) und deren Zuordnung zu genomischen Sequenzen nach *in silico* Analyse. Es konnte anhand der partiellen *cDNA*-Sequenz des humanen *Lunatic-Fringe*-Gens (Genbank-Zugriffsnummer AF193612) mittels *BLASTN* die humane genomische Sequenz (Genbank Zugriffsnummer AC012351) gefunden werden. AC012351 setzt sich aus fünf zufällig angeordneten *Kontigs* des *Homo sapiens* BAC-Klons MS2312I03 zusammen. Eines dieser *Kontigs* enthält die komplette *cDNA*-Sequenz AF193612. -/- steht für eine bekannte Sequenz, die aufgrund ihrer Größe nicht maßstabgetreu abgebildet werden konnte.

Um weitere Informationen über den unbekanntes 5´-Bereich des *Lunatic-Fringe*-Gens zu erhalten, wurde mittels *BLAST* ein Vergleich der kompletten *cDNA*-Sequenz des murinen *lunatic-fringe*-Gens (Genbank-Zugriffsnummer U94351) mit der partiellen humanen *cDNA*-Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer AF193612) durchgeführt. Das Ergebnis zeigte eine sehr große Homologie (87%) zwischen den beiden Sequenzen; die Größen der murinen Exons 2 bis 8 stimmten mit den korrespondierenden Sequenzen der humanen *cDNA* zu 100% überein (vgl. Abb.5). Im 5´-Bereich enthielt die murine Sequenz 306 bp, welche in der Sequenz der humanen *cDNA* AF193612 nicht vorhanden waren (vgl. Abb.5).

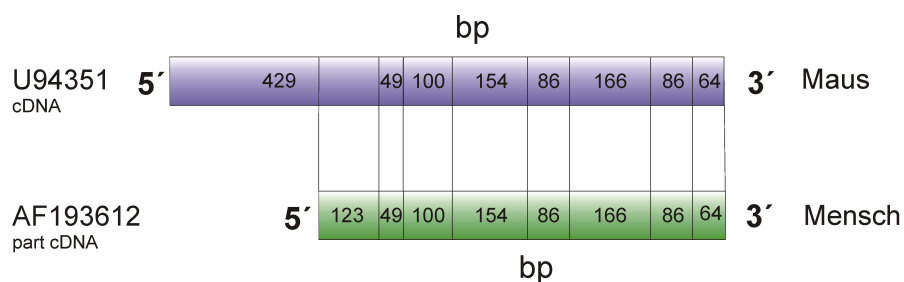


Abb.5. Die komplette murine *lunatic-fringe-cDNA* (U94351) im Vergleich zur humanen partiellen *Lunatic-Fringe-cDNA* (AF193612).

Aufgrund der Vermutung, dass sich der gesuchte 5´-Bereich des humanen *Lunatic-Fringe*-Gens auf einem der anderen *Kontigs* der gesamtgenomischen Sequenz AC012351 befindet, wurde ein *BLAST* der kompletten murinen *lunatic-fringe-cDNA* (U94351) mit der aus fünf ungeordneten *Kontigs* bestehenden humanen gesamtgenomischen Sequenz AC012351 durchgeführt. Hierbei fiel eine sehr große Homologie des 5´-Endes der murinen *cDNA* mit dem 3´-Bereich eines der *Kontigs* aus AC012351 auf (vgl. Abb.6). Das führte zu der Annahme, dass das gesuchte 5´-Ende des humanen *Lunatic-Fringe*-Genes in diesem Bereich liegt.

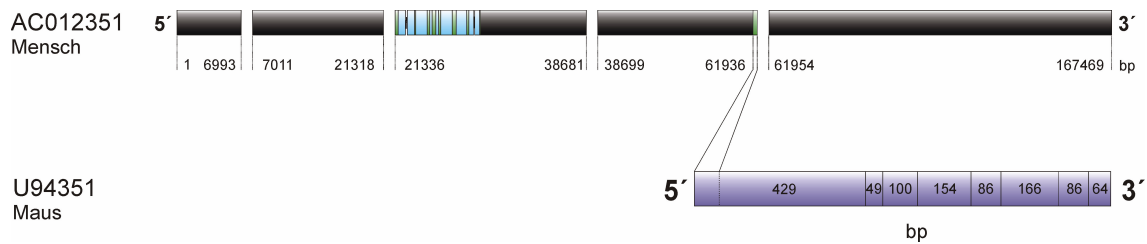


Abb.6. Homologie zwischen AC012351 (Mensch) und U94351 (Maus) im Bereich von Exon 1 des murinen *lunatic-fringe*-Gens. Ein *BLASTN* der kompletten murinen *lunatic-fringe*-cDNA mit der das humane *Lunatic-Fringe*-Gen enthaltenden Sequenz AC012351 ergab eine sehr große Homologie zwischen dem 5'-Bereich von U94351 und dem 3'-Bereich eines der *Kontigs* aus AC012351.

Zusätzlich zeigte die *in silico* Erstellung von Restriktionskarten der fünf *Kontigs* aus AC012351 mit Hilfe eines Programms der Seite <http://genius.embnet.dkfz-heidelberg.de>, dass die einzige Region, in der sogenannte *rare cutter* deutlich häufiger schneiden, ebenfalls der 3'-Bereich dieses oben genannten *Kontigs* ist (vgl. Abb.7). *Rare cutter*, wie zum Beispiel *NotI*, *BssHII*, *NaeI*, *MluI* und *NruI*, sind selten schneidende Restriktionsenzyme, deren Erkennungsstellen oft innerhalb von CpG-Inseln liegen (Bird, 1987). Solche CpG-Inseln bestehen aus einer Folge von Cytidin-Guanidin-Nukleotiden und sind verhältnismäßig oft in den 5'-Bereichen von Genen lokalisiert, sodass eine Anhäufung von CpG-Inseln auf den 5'-Bereich von einem Gen hinweist.

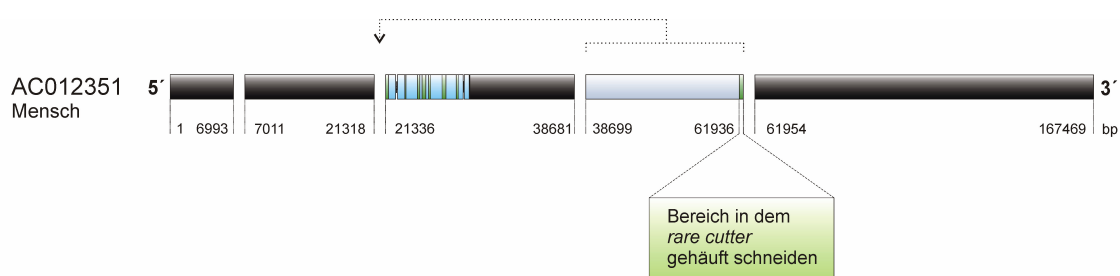


Abb.7. Gehäuftes Schneiden von *rare cuttern* in AC012351 nach *in silico* Analyse

Aus der Beobachtung, dass im 3'-Bereich eines der *Kontigs* der humanen gesamtgenomischen Sequenz AC012351 eine sehr große Homologie mit dem 5'-Bereich der murinen *lunatic-fringe*-cDNA besteht, und sich in der selben Region ein

Cluster von CpG-Inseln befindet, ließ sich ableiten, dass dieser Bereich der 5'-Region des *Lunatic-Fringe*-Gens entsprechen sollte.

Somit wurde die Anordnung der *Kontigs* aus der humanen gesamtgenomischen Sequenz AC012351 verändert (vgl. Abb.8).

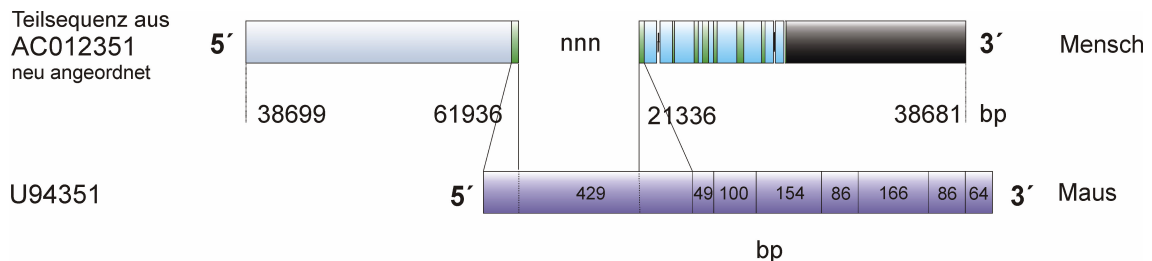


Abb.8. Anordnung der *Kontigs* aus AC012351, welche Anteile des *Lunatic-Fringe*-Gens enthalten, von 5' nach 3'. „nnn“ steht für eine unbekannte Sequenz. Im Vergleich dazu die Darstellung der murinen *cDNA* U94351.

Durch daran anschließende Laboruntersuchungen sollte der in Abb.8 mit nnn bezeichnete Abschnitt unbekannter Sequenz amplifiziert und sequenziert werden (siehe 3.1.2).

3.1.2 Komplettierung von *cDNA*-Sequenzen des *Lunatic-Fringe*-Gens mittels *BAC*-Bank-Screening

Der bisher unbekannte Bereich (vgl. Abb.8) der kodierenden Sequenz innerhalb des *Lunatic-Fringe*-Gens sollte amplifiziert und sequenziert werden. Die *Primer* wurden so gewählt, dass sie komplementär zu den den unbekanntem Bereich flankierenden Sequenzen binden. Die Amplifikation ließ sich, vermutlich auf Grund des hohen CG-Gehalts dieser Region, nicht mit der vollständigen genomischen *DNA* als Matritze durchführen, sodass ein *BAC*-Bank-Screening durchgeführt wurde. Später sollte die Amplifikation des unbekanntem Bereiches mit einem *BAC*-*DNA*-*Template* durchgeführt werden.

Die verwendete *BAC*-Bank, RPCI-11 *Human Male BAC*, wurde vom „Resource Center of the German Human Genome Project“ bezogen. Als *Primer*paar für das *Screening* wurden lunin2ex3-f,-r (vgl. Tab.3) generiert. Lunin2-ex3-f liegt in Intron 2, lunin2ex3-r in Exon 3 des humanen *Lunatic-Fringe*-Gens (vgl. Abb.11). Das *PCR*-Produkt umfasst 245 bp.

Tab.3. *Primer des BAC-Bank-Screenings.*

Name des Primers	5'-Position des Primers in Abb.17	Primer-Sequenz
lunin2ex3-f	5267	gaa aaa gct gcc tga atg g
lunin2ex3-r	5513	ttt gtg atg acc acg ttg c

Es wurde das *PCR*-Programm 1 (vgl. 2.2.6) verwendet. Die *Annealing*-temperatur betrug 61 °C.

Nach dem Primär- und Sekundärpool-Screening wurde der Klon RPCIB753O16811Q2 als *Lunatic-Fringe*-Gen-positiv identifiziert. Nach Isolierung der *BAC-DNA* wurde mit der *BAC-DNA* als *Template* versucht, den unbekanntem Bereich zu amplifizieren. Das verwendete *Primer*paar wird in Tab.4 dargestellt. Zur Optimierung der *PCR*-Bedingungen wurde eine Temperaturgradienten-*PCR* durchgeführt. Es wurde eine optimale *Annealing*-Temperatur von 60 °C ermittelt. Es wurde *PCR*-Programm 1 (vgl. 2.2.6) verwendet.

Tab.4. *Primer zur Amplifikation der unbekanntem Sequenz im Lunatic-Fringe-Gen.*

Name des Primers	5'-Position des Primers in Abb.12	Primer-Sequenz
nx2-r	9	ggc ggg gag gtt taa gag
xn-r	380	tga gca ggc tga agt act cg

Es kam zur Amplifikation einer ca. 150 bp umfassenden Bande (vgl. Abb.9); diese wurde ausgeschnitten und sequenziert. Ein Vergleich des Sequenzierergebnisses mit der gesamtgenomischen Sequenz AC012351 zeigte, dass die *Primer* in der gewünschte Region gebunden haben. Das Amplifikat enthielt zwischen den bekannten Sequenzen des 5'- und des 3'-Bereichs 17 bisher nicht bekannte bp. Somit konnte die bekannte *Lunatic-Fringe*-Gen-Sequenz um folgende 17 bp ergänzt werden.
5'- cgctgttccg cgactg - 3'

Im weiteren Verlauf wurde die Sequenz des unbekanntenen Bereichs des *Lunatic-Fringe*-Gens im Internet veröffentlicht. Sie zeigte sich in ihrer Größe und Sequenz als sehr homolog zur murinen *DNA*. Somit war die gesamte Sequenz des *Lunatic-Fringe*-Gens bekannt (vgl. Abb.11).

3.1.3 Darstellung der vorhergesagten genomischen Struktur des *Lunatic-Fringe*-Gens

Das Translations-Startkodon *ATG* des *Lunatic-Fringe*-Gens wurde mittels *in silico* Analyse durch einen Vergleich mit der sehr homologen murinen *DNA* und der Translation der *Lunatic-Fringe*-cDNA-Sequenzen in Proteinsequenzen unter Berücksichtigung des *Open-Reading-Frames* bestimmt (vgl. Abb.12). Durch einen anschließenden *in silico* Vergleich der partiellen humanen *Lunatic-Fringe*-cDNA (Genbank-Zugriffsnummer AF193612) mit der gesamtgenomischen *DNA* (Genbank-Zugriffsnummer AC012351), konnten die Exons 1 bis 8 ermittelt werden (vgl. Abb.11,13).

Anhand der Ergebnisse dieser Arbeit ließ sich das *Lunatic-Fringe*-Gen folgendermaßen charakterisieren. Es besteht aus 8 Exons sowie 7 Introns. Die Exons umfassen zwischen 49 bp und 432 bp, die Introns zwischen 95 bp und 4401 bp (vgl. Abb.11,13). Die Gesamtgröße des Gens ab Beginn des Translations-Startcodons bis zum Translations-Stopcodon beträgt 7348 bp. Das Protein umfasst 379 Aminosäuren (vgl. Abb.12), die Gesamtsequenz wird in Abb.11 dargestellt.

```

1  gggaccgggg  cggggaggtt  taagagcgcg  ggacactggt  gctgcgctgc  tggactgcgc
61  cgccggagcg  acgggcttcg  ggtcggtgca  aggcaggcgc  acggggaagg  gcgcgccgcg
121  cggccgccac  cccaccATGC  TCAAGCGCTG  CGGCCGGCGC  CTGCTGCTGG  CGCTGGCGGG
181  CGCGCTGCTC  GCCTGCCTGC  TGGTGCCTAC  CGCCGACCCG  CCGCCGCCTC  CACTGCCCGC
241  CGAGCGCGGC  CGGCGCGCGC  TGCGCAGCCT  GGCGGGCCCC  GCGGGGGCTG  CCCCGGCGCC
301  CGGGCTGGGG  GCGGCGGCGG  CGGCGCCCGG  GGCGCTGGTC  CGCGACGTGC  ACAGTCTGTC
361  CGAGTACTTC  AGCCTGCTCA  CCCGCGCGCG  CAGAGATGCG  GGCCCGCCGC  CCGGGGCTGC
421  CCCCGCCCC  GCCGACGGCC  ACCCGCGCCC  CCTGGCCGAG  CCGCTCGCGC  CCCAGACGTT
481  CTTCATCGCT  GTCAAGACCA  CCAAAAAGTT  CCACCGCGCG  CGCCTCGACC  TGCTGCTGGA
541  GACCTGGATC  TCGCGCCACA  AGGAGATGgt  gagccccccg  cggcctggac  tggcgggcga
601  gcggggcggg  gaccaccat  ctggtccagc  tgggtggcagt  gtcccatggg  agtcaggctg
661  catccccatc  cagccactag  ggccatctgt  gggcgacgcc  agtgcacccc  ggtgcaccca
721  gtttgccctg  tggggccaact  ctcccgttac  agttgtgta  ctgtccccgg  ggccccgcct
781  cctgtccagc  tccagagtcc  tggatggctg  caggacccta  caccagtctc  cagtgccttg
841  ggttgggtgcc  ctgtgatact  tctcaccocg  taaacattgg  agcgattca  tagggcat//
4801  cttgagccct  tctcagcagc  agtggggaaa  ccaaggcccc  gagaagggtg  ggtgtcagtg
4861  tgacgcagct  gcagctgcag  caactccagg  gcgccccgtc  cgccccccac  agatggccct
4921  ggggtgggga  tgaagggtcg  cctgctgaag  gccgattttc  tccttcagA  CGTTCATCTT
4981  CACTGACGGG  GAAGATGAGG  CCCTGGCCAG  GCACACGGgt  gagccctgga  cttggggcgg
5041  gagggggccc  aggcctccat  ccagagccga  acgctcccc  tccagtctcc  ctgccccctc
5101  gggccgagag  gtcaccaagg  gcaggacagg  gagggcagtt  tactcatggg  gtttgctcca
5161  tgccccgccc  caccactcgg  gcccccaat  tctcatgcaa  atgaagccca  ttcagcccc

```

5221 cgggtccctt tgagcccagg cagcggcaac aggtggcggg tgctgggaaa aagctgcctg
 5281 aatgggcggg ggcggggccg cctggaagg ggctgggctg cgggagggtc cacaggccca
 5341 agccccgagc tagggtgggg gaggtacgg ccgcccggcc cagcttgaac tagggggctt
 5401 ttctcgagcc cctgggacct gtggcgccc ccaggccagg cccctctctg ggagccggct
 5461 cagacctact cacagccgct ccctgtcca cag**GCAACGT** **GGTCATCACA** **AACTGCTCGG**
 5521 **CCGCCACAG** **CCGCCAGGCG** **CTGTCTGCA** **AGATGGCCGT** **GGAGTATGAC** **CGCTTCATCG**
 5581 **AGTCCGGCAG** **GAA**gtgagtg tggccccggg ggacccccat ctccctgcc gagcctggca
 5641 gcgcccggcc cggcatgcc tccccgatg gccctgcctt gtccctcag**GT** **GGTTCTGCCA**
 5701 **CGTGGACGAT** **GACAACACTAG** **TCAACCTGCG** **GGCCCTGCTG** **CGGCTGCTGG** **CCAGCTACCC**
 5761 **GCACACGCGG** **GACGTCTACG** **TCGGCAAGCC** **CAGCCTGGAC** **AGGCCATCC** **AGGCCATGGA**
 5821 **GCGGGTCAGC** **GAGAACAAGG** **TG**gtgagtgc ctgcccctcc cagtccccca cgcccacgcy
 5881 gagcgcacac ccggagtggg ggtgggaccg tgaggggag cagcgcctgg gtctcaggac
 5941 accttctccc ttctcccag**C** **GTCCTGTCCA** **CTTCTGGTTT** **GCCACGGGCG** **GCGCTGGCTT**
 6001 **CTGCATCAGC** **CGTGGGCTGG** **CTCTGAAGAT** **GAGCCCGTGG** **GCCAG**gtgag tgccctgcac
 6061 aggttaggcc agcccggctc caggetcctc gccactgtgg ggccctggctt agttcatctt
 6121 cccagccatg ggggtgtccc agcctcctgt gtggcaactgc ccacttactt cctatattcc
 6181 acttccctct gggtttcaga gggcagctgt gtttacggcg gctgccccca agcctgacct
 6241 gctcagagca gccagggggg cgatgagcac ccaggcacc atccggcagg actcttccct
 6301 gcaccagat tccctccaca gagagccag gagcacagga gctgtgcagg gagtgtgcc
 6361 tggctgtggc caggggagcy agagggagct gcagcccaga gctctcctca gggctcctct
 6421 ccctgaggag tgcagcgcct ttgctgggtg gggcctcccc agctcccagc agatggctcc
 6481 cgctctgct cactggtctg ggccctccc tcccgca**CG** **GGGGTCACTT** **CATGAATACG**
 6541 **GCTGAGCGGA** **TCCGGCTGCC** **TGATGACTGC** **ACCATCGGCT** **ACATCGTGA** **GGCCCTGCTG**
 6601 **GGTGTGCCCC** **TCATCCGCAG** **CGGCCTCTC** **CACTCCCACC** **TGGAGAACCT** **GCAGCAGGTG**
 6661 **CCCACCTCGG** **AGCTCCACGA** **GCAG**gtgcac catcctccgg gccccgccag gactccgaga
 6721 gcacaggaag ggacgtgtgg ctgccgagag gggcgcagtg ggggtgggca ctgttctaaa
 6781 cagggaggcc aggcagcact ccactgtcag ccaggggggg tcaactcctgc catgagctca
 6841 aagctgttta tggcgggttg tttcctgcc gtctcttctc tcaactgtga tgcgcctact
 6901 gtgcgtatth tgtccacgct ggcaatgcag ccagccccag ctggtccccca gtttgggacc
 6961 ttattcctgg ggtgtgcagg gcaggtgtcc ttccaggctc aagggaggcc agggcagggc
 7021 cgttgcctca ctcagggtc tgtggccagc ctggggcggg gccagggat gtcgggcccc
 7081 tcccgcatc actccgcccg ctccccacag **GTGACGCTGA** **GCTACGGTAT** **GTTTAAAAAC**
 7141 **AAGCGAAGC** **CCGTCCACGT** **GAAGGGGCC** **TTCTCGGTGG** **AGGCCGACC** **ATCCAG**gtaa
 7201 ggaaaccccg gccagatgg gcttgcgtag ggtggcctag gggcgtcagg gggcctcgtg
 7261 gagctgcagc aggtctctc taagcggcat gactctacat agaggtgtcc cccggagtcc
 7321 tgcttgctcg ggggtggggc gccagtgttg tgggactgca aatgggagct cagcacctgc
 7381 ctgccaccca cgcagaccag ccctgtctct gttcccacag **GTTCCGCTCC** **ATCCACTGCC**
 7441 **ACCTGTACCC** **GGACACACCC** **TGGTGTCCCC** **GCAC TGCCAT** **CTTC**tagtgg ccatggctga
 7501 gacccaatcc ctgggcgccc ctggatcca aagggccag ggaccctgtt gcgctgcct
 7561 ggccctcgca ttcgaggtc ccctagggc gtgcctgtgc gtgtgcgtgt gcgctgtgt
 7621 gtgtgtgtac tgcagccca cccgggtagc aggtgtgtg gcagttctgc tctgtggagg

Abb.11. *Lunatic-Fringe*-Gen. Die großgeschriebenen Bereiche stellen Exons dar, die kleingeschriebenen Introns. Exon 1 beginnt mit dem Translations-Startcodon ATG, Exon 8 endet mit dem Translations-Stopcodon TAG; // steht für eine bekannte Sequenz innerhalb von Intron 1, die auf Grund ihrer Größe nicht abgebildet wird.

MLKRCGRRLLLALAGALLACLVLVLTADPPPPPLPAERGRRLRSLAGPAGAAPAPGLGAAAAAPGALVRD
 VHSLSEYFSLLTRARRDAGPPPGAAPRPADGHPRLAEP LAPRDVFI AVKTTKKFHRARLDLLETWISR
 HKEMTFIFTDGEDEALARHTGNVVI TNCSAAHSRQALSCKMAVEYDRFIESGRKWVCHVDDDNVNLRAL
 LRL LASYPHTRDVYVGKPSLDRP IQAMERVSENKVRPVHFWFATGGAGFCISRGLALKMSPWASGGHFMN
 TAERIRLPDDCTIGYIVEALLGVPLIRSGLFHSHLENLQQVPTSELHEQVTLVSYGMFENKRNAVHVKGPF
 SVEADPSRFRS IHCHLYPDPWCPRTAIF

Abb.12. *Lunatic-Fringe*-Proteinsequenz nach *in silico* Translation.

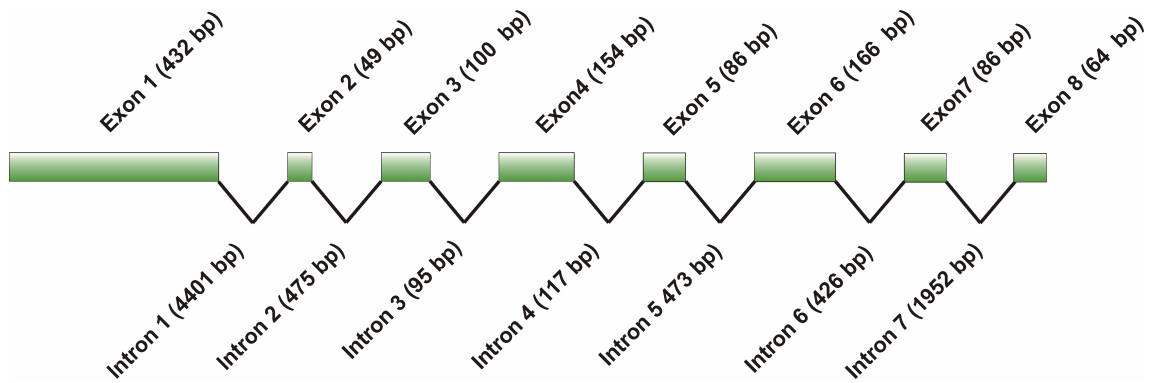


Abb.13. Exon-Intron-Struktur des *Lunatic-Fringe*-Gens (Größe der Introns nicht maßstabsgetreu).

3.2 Komplettierung der DNA-Sequenzen sowie Darstellung der genomischen Struktur des humanen *Radical-Fringe*-Gens

Zu Beginn dieser Arbeit waren folgende Teilesequenzen des humanen *Radical-Fringe*-Gens verfügbar (vgl. Abb.14). Eine *cDNA*-Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer U94353) ab einschließlich Exon 4, sowie die gesamtgenomische Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer AF108139) bis einschließlich Exon 4. Außerdem waren sämtliche Exon-Intron-Übergänge beschrieben und die Tatsache bekannt, dass das Gen aus acht Exons besteht (Moran et al., 1999). Somit fehlten die Sequenzen der Introns 4 bis 7, über die weder in der Literatur, noch in den verschiedenen Datenbanken Sequenzinformationen zu erhalten waren.

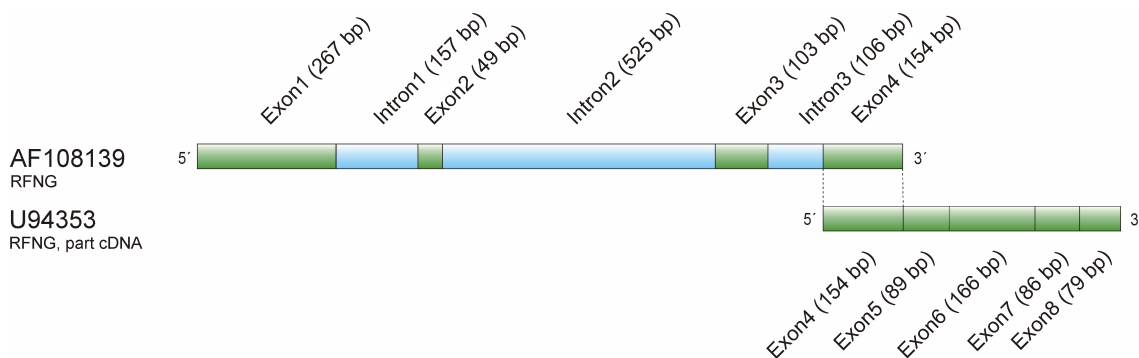


Abb.14. Sequenzen des humanen *Radical-Fringe*-Gens, die zu Beginn der Arbeit zur Verfügung standen.

3.2.1 Komplettierung von *DNA*-Sequenzen des *Radical-Fringe*-Gens mittels Amplifikation und Sequenzierung der Introns 4 bis 7

Um die unbekannt Sequenzen der Introns 4 bis 7 darzustellen wurden unter <http://www-genome.wi.mit.edu/cgi-bin/primer> entsprechende *Primer* (vgl. Tab.5) generiert. Ausgehend von den flankierenden Exons sollten die Introns mittels *PCR* amplifiziert und anschließend sequenziert werden.

Die *PCR*-Bedingungen wurden optimiert (vgl. Tab.6). Die Amplifikate wurden aus dem Agarosegel ausgeschnitten eluiert und sequenziert. In den Abbildungen 15 bis 18 werden die Sequenziererergebnisse dargestellt.

Tab.5. *Primer* zur Amplifikation der Introns 4 bis 7 des *Radical-Fringe*-Gens.

Intron	Name des <i>Primers</i>	5'-Position der <i>Primer</i> in der <i>cDNA</i> -Sequenz U94353	<i>forward-Primer-Sequenz</i> <i>reverse-Primer-Sequenz</i>
4	radex4-ex5-f	53	acc tgc tct cca gct tct c
	radex4-ex5-r	219	cat ggg ctg atc ttg agg
5	radex5-ex6-f	166	aag ttc tgg ttt gct act gg
	radex5-ex6-r	286	gcc aac tgt gca gtc atc
6	radex6-ex7-f	347	ccc tct tcc act ctg acc tg
	radex6-ex7-r	440	acg ttc acc acg ttc tgt g
7	radex7-ex8-f	400	ctc cag cag gtt acc ttg ag
	radex7-ex8-r	564	tgg tgt cac cga gag gtc

Tab.6. *PCR*-Bedingungen der Amplifikationen der Introns 4 bis 7 des humanen *Radical-Fringe*-Gens; die *PCR*-Programme werden unter 2.2.4.2 dargestellt.

Intron	<i>Annealing</i> -Temperatur	<i>PCR</i> -Programm
4	60 °C	1
5	60 °C	1
6	58 °C	4
7	60 °C	1

```

1  gtgagtgtcg gagcagacgc catcggagca gacgccttcc ttgacaccag cccgggaggc
61  acagcagaggg gcgtggaaaag ctggcttgag aagggcatag ggttgggggc ccaagctgat
121 ccacccaggt ggtttgcatg tgggtttca ggagcaggcc aggaggccct caccgtactg
181 ggcagagaggg ggggtgtctgg gccagggtggg gagggtctgg aggctacggg tcaatggcct
241 gcagaagccc cgggctcttc ttgctccaag aagcttctgt tacctgggtg ggatctccta
301 aggggcagct taagaaagat gcctggggag tcccatgaag agtcaggggt gagaagccct
361 gtcctgggca gctctgacca acaccccatc ctgag

```

Abb.15. Sequenz von Intron 4 des *Radical-Fringe*-Gens. Intron 4 besteht aus 395 bp.

```

1  gtgagtgggg gtccagctgc ccgggctggg aggcggaggc tgagacctga aaggtgctga
61  ccggcctccc cccag

```

Abb.16. Sequenz von Intron 5 des *Radical-Fringe*-Gens. Intron 5 besteht aus 75 bp.

```

1  gtacaggcgc cactctgggt gcctctgcca cctgggcttt gccccgcct gactccccc
61  ggggccccac tgccccggcc cgatgcccg ctgagcaggc aggtgggatt tgcattgtggc
121 tgggggtgga ccctggacag gcccttggc ctgctggaca cagggtcctc acgtacagat
181 ggggtatggg gtctggggca gaggaacgag gggagaagca cagttctcgg gccagtgagg
241 cccacgcca gctgggcagt ggtgtggtg tgtatggtga tggtagtcg gaacagggtcc
301 catcacgtgg agcagggagg gaatgagggt cagcttcgcc ctggagttt cagatcacia
361 tattccgtcc cccaggctgt gcatgagggt tccccctact cagctcgcca tgtggcaatg
421 cttttccaag cctggcctcc cagagggcct ggggagaggg ggtgggcaag ggggctctag
481 cagggttcc tggccggggg caggcgtggc ccgagaccag accaggccac aactctgccc
541 cacacccttc cctcccag

```

Abb.17. Sequenz von Intron 6 des *Radical-Fringe*-Gens. Die Sequenz besteht aus 558 bp.

```

1  gtgaagtagg tagtggcatg ggcaggccct cggccccgca ggggctctgg catcagctcc
61  ctctacacac ggccctgacc cccgctgctc cctccacca cggccctgac cccggcttct
121 ccctgtacc acggccctga cccaggttc tcccgccgc cacggccctg gccccgctt
181 ctctctccgc ccacggccct gaccctact tcttccttcc ccag

```

Abb.18. Sequenz von Intron 7 des *Radical-Fringe*-Gens. Intron 7 besteht aus 224 bp.

Die in den Abbildungen 15 bis 18 dargestellten Sequenzen wurden unter folgenden Genbank-Zugriffs-Nummern ins Netz (<http://www.ebi.ac.uk/embl/>) gestellt.

Intron 4 → AJ297567

Intron 6 → AJ297545

Intron 5 → AJ297544

Intron 7 → AJ297546

3.2.2 Darstellung der genomischen Struktur des *Radical-Fringe*-Gens

Anhand von *in silico* Analysen, den Sequenzierergebnissen die im Rahmen dieser Arbeit gewonnen wurden, sowie der Beschreibung der Exon-Intron-Struktur (Moran et al., 1999) des *Radical-Fringe*-Gens, ließ sich die gesamtgenomische Sequenz des *Radical-Fringe*-Gens komplettieren (vgl. Abb.19). Das *Radical-Fringe*-Gen besteht aus 8 Exons sowie 7 Introns. Die Exons umfassen zwischen 49 bp und 267 bp, die Introns zwischen 75 bp und 558 bp. Die Gesamtgröße ab Beginn des Translations-Startcodons bis zum Translations-Stopcodon beträgt 3033 bp (vgl. Abb.19, 20). Das Protein umfasst 332 Aminosäuren.

```

1  gggggtcccg gcggccgcAT GAGCCGCGCG CGTGGGGCGC TGTGCCGGGC CTGCCTCGCG
61  CTGGCCGCGG CCCTGGCCGC GCTGCTGTTA CTGCCGCTGC CGCTGCCCCG CGCGCCCCGC
121 CCGGCCCGGA CCCCCGCCCC GGCCCCGCGC GCGCCCCCGT CCCGGCCCCG TGCCCCCAGC
181 CTGCGGCCTG ACGACGTCTT CATCGCCGTC AAGACCACCC GGAAGAACCA CGGGCCGCGC
241 CTGCGGCTGC TGCTGCGCAC CTGGATCTCC CGGGCCCCGC AGCAGgtgcg ccggacccccg
301 accccgacgg cgagccccac gccaccgcg cccgcctccc ggggtctagg cccggcccag
361 gcccccgag gctccgcgcg gggcgggtcg gtctccggcc tgggcagcgc cccagaagcc
421 tcatagattg tttctcccc agACGTTTAT CTTCACCGAC GGGGACGACC CTGAGCTCGA
481 GCTCCAGGGC Ggtgagtgtc cccgcctccc cggcgcccgc gggatctgcc ccccgagcct
541 ttctcgctcc gaagccacgg ccccttcgct gctgtgggtg cttttctctg ccaggctccc
601 gagcccgggg aggccccgac gctgccaggt cacgcggtct gcggagggcc caccctgcca
661 gccaagetct gtccccacca gcctctcaca ctagccgctt cccggggcgt ggggctagtg
721 ccacgtcccc tgaagaagcg ccagcagggg atccgccctt ccaggccagg tcagggagag
781 ctgcctccgt cctgtttcca ctcaagagat cccaaccgat ggccgctctg ttcagcctcg
841 gtggcaccag cagggtcagc gcgtgagggc tagggctgtg gttggacca ggcaaggtgt
901 ccaggcatgt cagacagcca cgttgtgcc tggcccttg ggcaggtgg ggcacaggcc
961 ttaccccaac ccagtgcca gcctctacgt gcgtgcttcc cgtctctgat tcgcagGCGA
1021 CCGTGTCATC AACACCAACT GCTCGGCGGT GCGCACTCGT CAGGCCCTCT GCTGCAAGAT
1081 GTCCGTGGAG TATGACAAGT TCATTGAGTC CGGGCGCAAg tacgcggcgc tgacccgacc
1141 cgcagagagc tcagagccaa gctgggtggg ggctcctgt ccagccatgc caggccctcg
1201 tgcccaggac tcccctcgcc cacagGTGGT TTTGCCACGT GGATGATGAC AATTATGTGA
1261 ACGCAAGGAG CCTCCTGCAC CTGCTCTCCA GCTTCTCACC CAGCCAGGAC GTCTACTTGG
1321 GGCGGCCAG CCTGGACCAC CCCATTGAGG CCACCGAGAG GGTCCAGGGT GGCAGAACTg
1381 tgagtgtcgg agcagacgcc atcggagcag acgccttctt tgacaccagc ccgggaggca
1441 cagcagaggg cgtggaaagc tggcttgaga agggcatagg gttgggggcc caagctgatc
1501 caccaggtg gtttgcattg ggtgtttcag gagcaggcca ggagccctc accgtactgg
1561 gcagagaggg ggtgtctggg ccagggtggg agggctctgga ggctacgggt caatggcctg

```

```

1621 cagaagcccc cggctcttct tgctccaaga agcttctggt acctgggtgg gatctcctaa
1681 ggggcagctt aagaaagatg cctggggagt ccatgaaga gtcaggggtg agaagccctg
1741 tcctgggcag ctctgaccaa caccccatcc tcagGTGACC ACGGTCAAGT TCTGGTTTGC
1801 TACTGGTGGG GCCGGGTTCT GCCTCAGCAG AGGCCTTGCC CTCAAGATGA GCCCATGGGC
1861 CAGgtgagtg ggggtccagc tgcccgggct gggaggcgga ggctgagacc tgaaggtgc
1921 tgaccggcct cccccagCC TGGGCAGCTT CATGAGCACA GCTGAGCAGG TGCGGCTGCC
1981 GGATGACTGC ACAGTTGGCT ACATCGTGGA GGGGCTCCTG GGCGCCCGCC TGCTGCACAG
2041 CCCCCTCTTC CACTCTCACC TGGAGAACCT GCAGAGGCTG CCGCCCGACA CCCTGCTCCA
2101 GCAGgtacag gcgccactct gggtgctct gccacctggg ctttgccccg cctgactcc
2161 ccagggggcc cactgcccc ggcccgatgc ccggtgagc aggcaggtgg gatttgcag
2221 tggctggggg tggaccctgg acaggcccct tggcctgttg gacacaggt cctcacgtac
2281 agatggggta tgggtgctgg ggagaggaa cgaggggaga agcacagttc tcgggccagt
2341 gaggccccac gccagctggg cagtgggtgt ggtgtgatg gtgatggtga gtcggaacag
2401 gtcccatcac gtggagcagg gaggaatga ggtcagctt cgccctggag ttttcagatc
2461 acaatattcc gtccccagc ctgtgcatga ggtgtcccc tactcagctc gccatgtggc
2521 aatgcctttc caagcctggc ctcccagagg gcctggggag aggggggtgg caagggggct
2581 ctagcagggc ttctggccg ggggcaggcg tggcccgaga ccagaccagg ccacacactc
2641 tgcccacacc cttccctccc agGTTACCTT GAGCCATGGG GGTCCTGAGA ACCCACAGAA
2701 CGTGGTGAAC GTGGCTGGAG GCTTCAGCCT GCATCAAGAC CCCACACGgt gaagtaggta
2761 gtggcatggg caggccctcg gccccgagg ggctctggca tcagctccct ctacacacgg
2821 ccctgacccc cgctgctccc tccaccacg gcctgaccc cggttctcc ctgtaccac
2881 ggccctgacc ccaggttctc ccgcccacca cggccctggc ccccgcttct ctctccgcc
2941 acggccctga ccctacttc ttccctcccc agGTTTAAGT CTATCCATTG TCTTCTGTAC
3001 CCAGACACGG ACTGGTGTCC CAGGCAGAAA CAGGGCGCCC CGACCTCTCG Gtgacaccaa
3061 ccaccccgac ccagggtgc ctggctctgt ccaggcgcg gggaaccaga gccccctatg
3121 ggctcagtg gctccctcag gtgccacggc cgcacagtga gatgcaggca cctggcagac
3181 cctctgctag ctgcagcccc cctctcc

```

Abb.19. *Radical-Fringe*-Gen. Die Sequenzen aus U94353, AF108139 und die im Rahmen vorliegender Arbeit sequenzierten Introns wurden zur Gesamtsequenz des *Radical-Fringe*-Gens zusammengefasst. Die großgeschriebenen Abschnitte stellen Exons dar, die kleingeschriebenen Introns. Exon 1 beginnt mit dem Translations-Startcodon ATG, Exon 8 endet mit dem Translations-Stopcodon TGA.

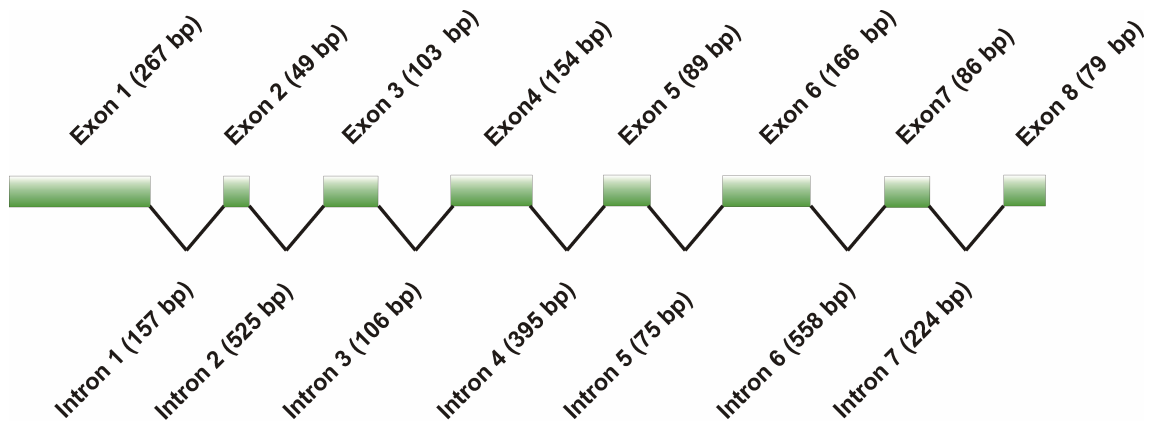


Abb.20. Exon-Intron-Struktur des *Radical-Fringe*-Gens (Größe der Introns nicht maßstabsgetreu).

3.3 Darstellung der genomischen Struktur des *Manic-Fringe*-Gens

Das *Manic-Fringe*-Gen war zu Beginn dieser Arbeit schon vollständig charakterisiert (Moran et al., 1999). Sowohl die komplette *cDNA*-Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer U94352) als auch die gesamtgenomische Sequenz (Genbank-Zugriffsnummer Z93096) waren verfügbar. Das Gen besteht, wie alle Mitglieder der Fringe-Gen Familie aus 8 Exons und 7 Introns. Die Exons umfassen zwischen 49 und 255 bp, die Introns zwischen 421 und 5153 bp. Die Gesamtsequenz besteht aus 16211 bp; das Protein aus 321 Aminosäuren (vgl. Abb.21).

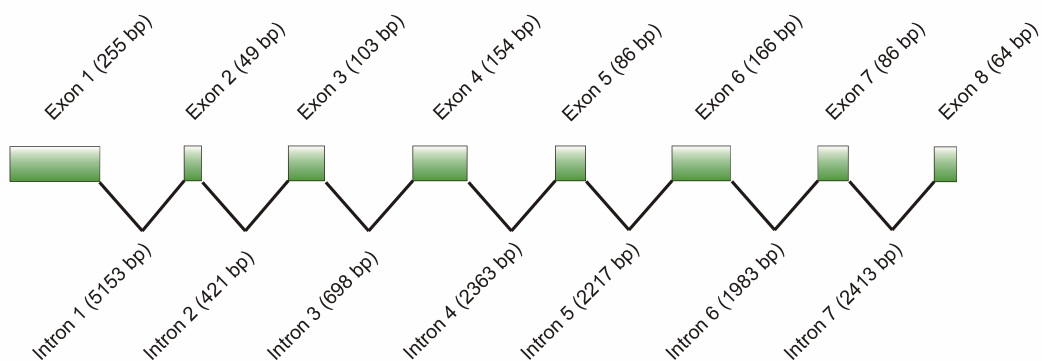


Abb.21. Exon-Intron-Struktur des *Manic-Fringe*-Gens (Größe der Introns nicht maßstabsgetreu).

3.4 Suche nach Mutationen innerhalb der drei humanen *Fringe*-Gene (*Lunatic*-, *Radical*-, *Manic-Fringe*-Gen) bei 38 Probanden mit *Alagille*-Syndrom

Von 38 Patienten mit dem klinischen Bild eines *Alagille*-Syndroms wurden mit den in Tab.7, 10 und 13 angegebenen *Primern* die jeweiligen Exons der Gene *Lunatic*-, *Radical*- und *Manic-Fringe* amplifiziert. Anschließend wurden diese mittels *SSCP*-Analyse und Sequenzierung der DNAs mit auffälligen *band shifts* in der *SSCP*-Analyse auf Sequenzveränderungen untersucht. Die *Primer* wurden so gewählt, dass sie komplementär zu den jeweilig flankierenden Introns binden um eine vollständige Amplifikation der Exons zu ermöglichen. Die Ergebnisse der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Optimierungen der *PCR*-Bedingungen werden in den Tab. 8, 11 und 14 dargestellt.

Auf Grund des sehr hohen CG-Gehalts gelang es trotz Optimierung der *PCR*-Bedingungen für die jeweiligen *Primerpaare* nicht, die jeweiligen Exons 1 des *Lunatic*- sowie des *Radical-Fringe*-Gens zu amplifizieren. Außerdem werden die Sequenziererergebnisse von Exon 8 des *Lunatic-Fringe*-Gens nicht dargestellt, da im Rahmen dieser Arbeit eine Region untersucht wurde, die sich später als Ausschnitt aus Intron 7 herausstellte.

Vor Beginn der *SSCP*-Analyse wurden die Bedingungen optimiert. Die Elektrophoresegele wurden aus der Fertigmatrix *MDE* (*Biozym*) hergestellt. Optimale Laufeigenschaften wurden bei einer Endkonzentration in den Gelen von 0,5 x *MDE* erreicht. Als Laufpuffer wurde 0,6 x *TBE* verwendet. Da die Laufeigenschaften bei verschiedenen Temperaturen stark variierten wurden alle Versuche sowohl bei 10°C als auch bei 18°C durchgeführt. So wurden manche *SSCP*-„*band shifts*“ nur bei 10°C, andere nur bei 18°C sichtbar. Die Auftrennung der Fragmente erfolgte in einem *Alf-Express*-Sequenzierautomaten unter nicht-denaturierenden Bedingungen. Die Leistung betrug 15 Watt.

Es wurde die *DNA* von 38 Patienten mit *Alagille*-Syndrom (*AGS*), bei denen keine Mutationen im *JAG1*-Gen nachweisbar waren auf Mutationen in den Exons der drei humanen *Fringe*-Gene (*Lunatic*-, *Radical*- und *Manic-Fringe*-Gen) untersucht. Ergaben sich auffällige Banden (*band shifts*, vgl. Abb. 22) in der *SSCP*-Analyse, wurde die jeweilige *DNA*-Region bei dem jeweiligen Patienten sequenziert (vgl. Abb. 23).

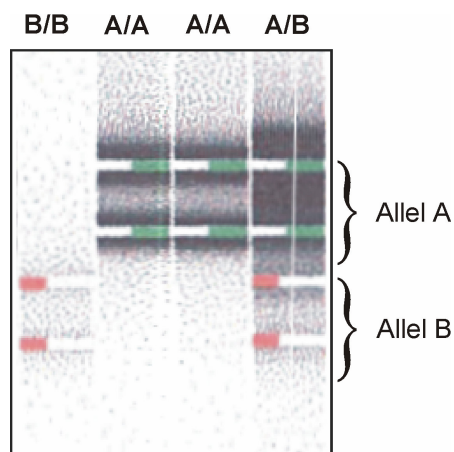


Abb.22. Bandenverschiebungen im SSCP-Gel am Beispiel eines C→A Polymorphismus in DNA-Position 5909 innerhalb von Exon 4 des *Lunatic-Fringe*-Gens (vgl. Abb.11). Ein Adenin in dieser Position entspricht Allel A, ein Cytosin Allel B. Heterozygote Patienten zeigen beide Allele.

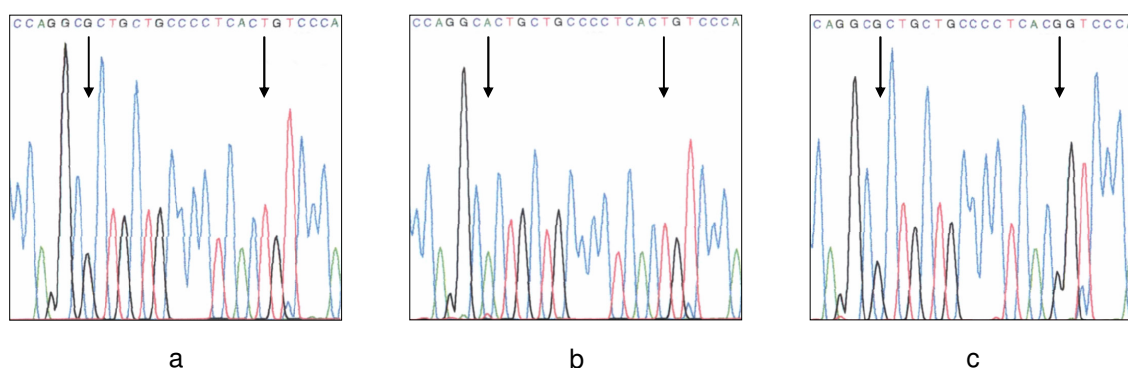


Abb.23. Sequenzvarianten im Bereich des Intron 4 des *Lunatic-Fringe*-Gens (vgl. Tab.9). In dieser Abbildung werden drei verschiedene Varianten (a,b,c) im Bereich des Intron 4 des *Lunatic-Fringe*-Gens (*reverse* Strang) gezeigt. Die Pfeile markieren die variablen Basen. Patient a besitzt in Position 5905 Allel B, in Position 5924 Allel A. Patient b besitzt in Position 5905 Allel B, in Position 5924 Allel B. Patient c besitzt in Position 5905 Allel A und in Position 5924 Allel A. Die DNA-Positionen beziehen sich auf Abb.11.

Die Auswertung der Sequenzierergebnisse erfolgte durch den Vergleich mit den Sequenzen des *Lunatic-Fringe*-Gens (vgl. Abb.11), des *Radical-Fringe*-Gens (vgl. Abb.19) und des *Manic-Fringe*-Gens (Genbank-Zugriffsnummer Z93096). Wurden hierbei Sequenzvarianten festgestellt, wurde anhand der Häufigkeiten von SSCP-band shifts die Allelenhäufigkeit sowie die Häufigkeit der verschiedenen Genotypen

berechnet. Die Ergebnisse wurden durch Berechnung des *Hardy-Weinberg-Gleichgewichts* überprüft und waren mit diesem vereinbar.

3.4.1 Sequenzvarianten im *Lunatic-Fringe-Gen*

Bei 38 Patienten mit dem klinischen Bild eines *Alagille-Syndroms* wurden die Exons 2 bis 7 des *Lunatic-Fringe-Gens* mittels SSCP-Analyse und anschließender Sequenzierung bei SSCP-band shifts auf Sequenzvarianten untersucht. Die verwendeten *PCR-Primer* sind in Tab.7, die *PCR-Bedingungen* in Tab.8 dargestellt. Die verschiedenen Sequenzvarianten werden in Tab.9 aufgeführt.

Tab.7. Primer zur Amplifikation der Exons 2 bis 7 des *Lunatic-Fringe-Gens*.

Exon-Nr.	Name des Primers	5'-Position der Primer in Abb.11	forward-Primer-Sequenz reverse-Primer-Sequenz	Größe PCR-Produkt (bp)
2	lunex2-f lunex2-r	4842 5055	aga agg gtg ggt gtc agt g ggt cgg ctc tgg atg gag	231
3	lunex3-f lunex3-r	5454 5678	gcc ggc tca gac cta ctc cag aac cac ctg agg aca ag	244
4	lunex4-f lunex4-r	5668 5941	atg gcc ctg cct tgt cct gct ggg aga agg gag aag gt	293
5	lunex5-f lunex5-r	5829 6107	gcg aga aca agg tgg tga g gct ggg aag atg aac taa gc	298
6	lunex6-f lunex6-r	6583 6711	cct ctg ctc act ggt ctg g ctt cct gtg ctc tcg gag tc	248
7	lunex7-f lunex7-r	6984 7214	ggt gtc ctt cca ggt cca ag cct acg caa gcc cat ctg	247

Tab.8. PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Exons 2 bis 7 des *Lunatic-Fringe*-Gens. Die PCR-Programme werden unter 2.2.6 dargestellt.

Exon	Annealing-Temperatur	PCR-Programm
2	62 °C	1
3	61 °C	1
4	64 °C	1
5	61 °C	1
6	59 °C	1
7	61 °C	1

Tab.9. Sequenzvarianten im *Lunatic - Fringe*-Gen. Es wurden 38 Patienten mit *Alagille - Syndrom* untersucht, bei denen sich keine Mutationen im *JAG1*-Gen nachweisen ließen. Es werden der Ort und die Art der Sequenzvarianten, die Anzahl untersuchter Patienten, die Häufigkeit der Allele und der Heterozygotie, sowie der Genotyp dargestellt.

Exon/ Intron	AS	DNA-Position in Abb. 11	Position in cDNA	n	Allel		Genotyp			Heterozyg. %
					A %	B %	AA n	AB n	BB n	
Intron 1	-	4864 C→T	433-106 C→T	38	94,7	5,3	35	2	1	5,3
Intron 1	-	4892 C→T	433-78 C→T	38						
Intron 4	-	5909 C→A	733-51 C→A	37	58,1	41,9	14	15	8	40,5
Intron 4	-	5924 C→T	733-36 C→T	37						
Exon 6	Ser	6669 G→A	969 G→A	38	93,4	6,6	34	3	1	7,9
Intron 6	-	7058 G→A	985-53 G→A	38	96,1	3,9	36	1	1	2,6
Intron 6	-	7074 G→A	985-37 G→A	38	80,3	19,7	25	11	2	28,9

Es konnten sieben Sequenzvarianten im Bereich des *Lunatic-Fringe*-Gens nachgewiesen werden (vgl. Tab.9). Davon befanden sich sechs innerhalb von Intron-Sequenzen, eine innerhalb einer Exon-Sequenz. Der Austausch von Guanin nach Adenin im Exon 6 an Position 6669 zeigt keine Auswirkungen auf die Proteinsequenz, da es sich hier um die *wobble base* des Triplets TCG handelt.

3.4.2 Sequenzvarianten im *Radical-Fringe*-Gen

Bei 38 Patienten mit dem klinischen Bild eines *Alagille*-Syndroms wurden die Exons 2 bis 8 des *Radical-Fringe*-Gens mittels SSCP-Analyse und anschließender Sequenzierung bei SSCP-band shifts auf Sequenzvarianten untersucht. Die verwendeten *PCR-Primer* sind in Tab.10 dargestellt, die *PCR*-Bedingungen in Tab.11, die verschiedenen Sequenzvarianten in Tab.12 aufgeführt.

Tab.10. *Primer* zur Amplifikation der Exons 2 bis 8 des *Radical-Fringe*-Gens.

Exon-Nr.	Name des Primers	5'-Position der Primer in Abb. 19	forward-Primer-Sequenz reverse-Primer-Sequenz	Größe PCR-Produkt (bp)
2	radex2-f radex2-r	252 538	gct gcg cac ctg gat ctc gct tcg gag cga gaa agg	304
3	radex3-f radex3-r	973 1229	cag tgc cag cct cta cgt g atc atc cac gtg gca aaa c	275
4	radex4-f radex4-r	1146 1408	aga gct cag agc caa gct g gtg tca agg aag gcg tct g	281
5	radex5-f radex5-r	1707 1903	gag tcc cat gaa gag tca gg cag cac ctt tca ggt ctc ag	216
6	radex6-f radex6-r	1903 2127	ctg aga cct gaa agg tgc tg aaa gcc cag gtg gca gag	242
7	radex7-f radex7-r	2633 2798	aca cac tct gcc cac acc tgt gta gag gga gct gat gc	263
8	radex8-f radex8-r	2948 3155	tga ccc cta ctt ctt cct tcc agg tgc ctg cat ctc act g	226

Tab.11. PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Exons 2 bis 8 des *Radical-Fringe*-Gens. Die PCR-Programme werden unter 2.2.6 dargestellt.

Exon	Annealing-Temperatur	PCR-Programm
2	58 °C	3
3	61 °C	1
4	64 °C	1
5	64 °C	1
6	65 °C	1
7	62 °C	1
8	64 °C	1

Tab.12. Sequenzvarianten im *Radical-Fringe*-Gen. Es wurden Patienten mit *Alagille*-Syndrom untersucht, bei denen sich keine Mutationen im *JAG1*-Gen nachweisen ließen. Es werden der Ort und die Art der Sequenzvarianten, die Anzahl untersuchter Patienten, die Häufigkeit der Allele und der Heterozygotie, sowie der Genotyp dargestellt. 3'NT steht für den 3' nichttranslatierten Bereich.

Exon/ Intron	AS	DNA-Position in Abb. 19	Position in cDNA	n	Allel		Genotyp			Heterozyg. %
					A %	B %	AA n	AB n	BB n	
Exon 4	Ala	1265 A→C	460 A→C	35	61,4	38,6	13	17	5	47,4
Intron 4	-	1770 C→T	574-5 C→T	37	62,2	37,8	14	18	5	47,0
3'NT	-	3152 G→A	993+102 G→A	35	68,6	31,4	17	10	8	43,1

Es wurden zwei Sequenzvarianten im Bereich nicht kodierender Sequenzen des *Radical-Fringe*-Gens nachgewiesen und eine innerhalb von Exon 4 (vgl. Tab.12). Der Austausch an Position 1265 von Alanin nach Cytosin bewirkt keine Veränderung der Proteinsequenz, da die *wobble base* des Triplets GCA betroffen ist.

3.4.3 Sequenzvariante im *Manic-Fringe*-Gen

Bei 38 Patienten mit dem klinischen Bild eines *Alagille*-Syndroms wurden die Exons 1 bis 8 des *Manic-Fringe*-Gens mittels SSCP-Analyse und anschließender Sequenzierung bei SSCP-band shifts auf Sequenzvarianten untersucht. Die verwendeten *PCR-Primer* sind in Tab.13 dargestellt, die *PCR-Bedingungen* in Tab.14, die Sequenzvariante wird in Tab.15 aufgeführt.

Tab.13. *Primer zur Amplifikation der Exons 1 bis 8 des Manic-Fringe-Gens.*

Exon-Nr.	Name des Primers	5'-Position der Primer in Z93096	forward-Primer-Sequenz reverse-Primer-Sequenz	Größe PCR-Produkt (bp)
1	manex1-f manex1-r	541 897	cct gtc tgg ttg gga ttt g tag aaa ggc ctc tga gaa cc	376
2	manex2-f manex2-r	5893 6080	cac tgg agg agt aca gag tcc cag gca aca gct aaa gtc c	206
3	manex3-f manex3-r	6393 6616	gcc ttg ctc tgt att ctg tg cag ggg tta ttt tca atg g	242
4	manex4-f manex4-r	7189 7498	act gtt gac cga ctg tgg tct cac ctc tct agc aca cc	329
5	manex5-f manex5-r	9674 9928	ttc aaa ata aag ggc ttt tg aaa ggc ccc tcc tgt acc	272
6	manex6-f manex6-r	12000 12298	cag ctt gtc cca gtg gag ccc atg ttc ctt tgg ttc	316
7	manex7-f manex7-r	14152 14372	tta aaa ccc ctc ctc cac gtt tgg atg cct gga ctc	238
8	manex8-f manex8-r	16677 16840	tag gag agt ggg ctg aga aag gca cac cca gaa gtc	181

Tab.14. PCR-Bedingungen für die Amplifikation der Exons 1 bis 8 des *Manic-Fringe*-Gens. Die PCR-Programme werden unter 2.2.6 dargestellt.

Exon	Annealing-Temperatur	PCR-Programm
1	61 °C	1
2	65 – 55 °C	2
3	65 – 55 °C	2
4	61 °C	1
5	67 °C	1
6	58 °C	1
7	65 – 55 °C	2
8	65 – 55 °C	2

Tab.15. Sequenzvariante im *Manic-Fringe*-Gen. Es wurden 38 Patienten mit *Alagille*-Syndrom untersucht, bei denen sich keine Mutationen im *JAG1*-Gen nachweisen ließen. Es werden der Ort und die Art der Sequenzvariante, die Anzahl untersuchter Patienten, die Häufigkeit der Allele und der Heterozygotie, sowie der Genotyp dargestellt.

Exon/ Intron	AS	DNA-Position in Z93096	Position in cDNA	n	Allel		Genotyp			Heterozyg. %
					A %	B %	AA n	AB n	BB n	
Intron 5	-	12038 C→T	648-56 C→T	38	96,1	3,9	36	1	1	2,6

Innerhalb des *Manic-Fringe*-Gens wurde nur eine Sequenzvariante nachgewiesen. Diese befindet sich innerhalb von Intron 5.

4. Diskussion

Das *Alagille*-Syndrom (vgl. 1.1) stellt eine komplexe autosomal dominant vererbte Erkrankung dar, welche mit Fehlbildungen des Gallengangsystems sowie mit Defekten im kardiovaskulären System, im Skelettsystem, im Auge und im Gesicht einhergeht. Mutationen im Bereich des *JAG1*-Gens, dessen Transkript einen Bestandteil des *Notch*-Signalsystems darstellt, sind ursächlich für die Entstehung dieses Syndroms (Oda et al., 1997; Li et al., 1997; vgl. 1.2). Es gelang bisher jedoch nur bei 65-70% der Patienten mit *Alagille*-Syndrom funktionelle Mutationen innerhalb des *JAG1*-Gens nachzuweisen (Krantz et al., 1998; Crosnier et al., 1999; Röpke et al., 1999; Heritage et al. 2000; Yuan et al., 2001). Somit stellt sich die Frage, warum bei 30-35% der Patienten mit den gängigen Untersuchungsmethoden keine funktionellen Mutationen im *JAG1*-Gen auffindbar waren.

Es gibt verschiedene Erklärungsansätze für die Diskrepanz zwischen der Anzahl der am *Alagille*-Syndrom Erkrankten und der Anzahl der nachweisbaren Mutationen im Bereich des *JAG1*-Gens. Die üblicherweise zum Mutationscreening des *JAG1*-Gens eingesetzte SSCP-Analyse besitzt nur eine Sensitivität von etwa 80% (Heritage et al., 2000). Somit kann davon ausgegangen werden, dass ein Teil der Mutationen mit den gängigen Suchmethoden nicht erfasst wurde. In den verschiedenen Arbeiten wurden nur die kodierenden Bereiche inklusive der *Splice*-Stellen untersucht (Krantz et al., 1998; Crosnier et al., 1999; Röpke et al., 1999; Heritage et al. 2000; Yuan et al., 2001). Veränderungen in anderen Regionen des *JAG1*-Gens, die zum Beispiel zu einem Wechsel von *splice*-Stellen und somit ebenfalls zu Veränderungen im Protein führen könnten, wurden folglich ebenfalls nicht detektiert. Auch das Vorliegen eines Mosaiks bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom (Giannakudis et al., 2001) kann einen Teil der nicht nachweisbaren funktionellen Mutationen erklären.

Jedoch bieten diese oben aufgeführten Punkte keine ausreichende Erklärung für die verhältnismäßig hohe Prozentzahl von 30-35% nicht nachweisbarer Mutationen. Somit kommt die Möglichkeit in Betracht, dass neben Veränderungen im *JAG1*-Gen auch Mutationen anderer Gene eine Rolle bei der Genese des *Alagille*-Syndroms spielen. Geht man als Folge dieser Überlegungen von genetischer Heterogenität aus, so stellt sich die Frage nach möglichen Kandidatengenen. Da Mutationen im *JAG1*-Gen, einem Bestandteil des sehr komplexen *Notch*-Signalsystems, zur Ausprägung des *Alagille*-Syndroms führen, liegt die Vermutung nahe, dass auch andere Bestandteile dieses Systems Einfluss auf den Pathomechanismus des *Alagille*-Syndroms nehmen können. So wird bei einigen genetisch heterogenen Erkrankungen davon ausgegangen, dass

die Genprodukte der verschiedenen krankheitsverursachenden Gene Bestandteile des gleichen Signalweges sind (Paznekas et al., 1998; Bowles et al., 2000; Levitus et al., 2003; Pei, 2003). Eine dieser Erkrankungen ist die *Fanconi*-Anämie, welche durch eine progressive aplastische Anämie, diverse kongenitale Fehlbildungen und Krebs charakterisiert ist (Liu et al., 1994; D'Andrea et al., 2003). Pathogenetisch gehört die *Fanconi*-Anämie zu den *DNA*-Reperaturerkrankungen. Die *Fanconi*-Anämie wird durch Mutationen in mindestens acht verschiedenen Genen (*FANCA*, *FANCB*, *FANCC*, *FANCD1*, *FANCD2*, *FANCE*, *FANCF*, *FANCG*) hervorgerufen, wobei bisher Mutationen in sechs davon (nicht *B* und *D1*) nachgewiesen wurden. Es wird davon ausgegangen, dass die ersten fünf identifizierten Gene (*ACEFG*) in einem Proteinkomplex miteinander interagieren und anschließend das Gen *D2* aktivieren (Medhurst et al., 2001). Die Proteine der verschiedenen *Fanconi*-Anämie Gene sind demnach Bestandteile des gleichen Signalweges und regulieren sich gegenseitig (Levitus et al., 2003).

Im *Notch*-Signalsystem spielen neben *JAG1*, einem der *Notch*-Liganden, weitere Proteine eine wichtige Rolle (vgl. Abb. 24).

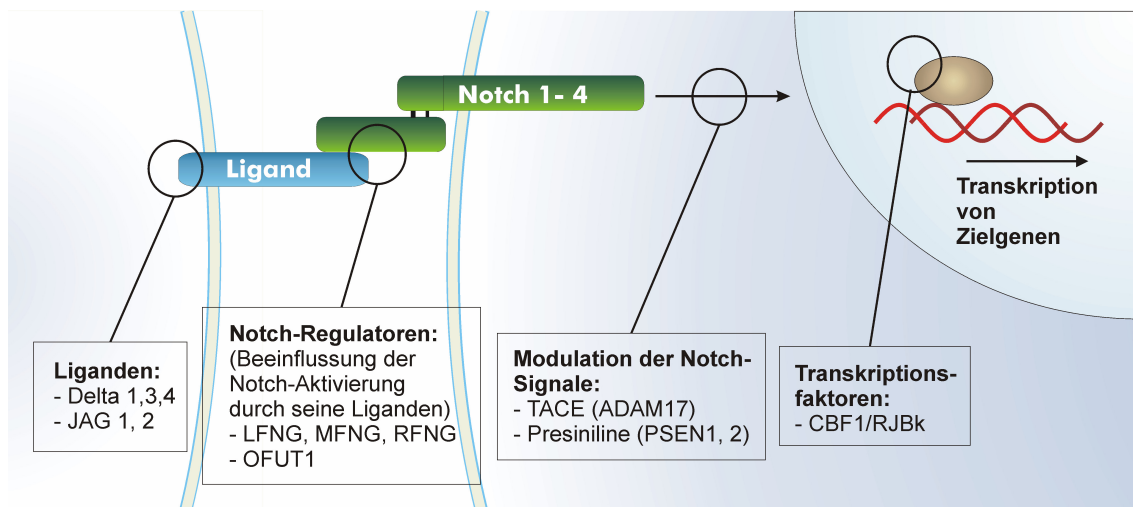


Abb.24. Das *Notch*-Signalsystem (modifiziert nach Literaturbefunden, siehe Text).

Beim Menschen existieren mindestens vier *Notch*-Rezeptoren (*Notch 1-4*) und fünf *Notch*-Liganden (*Delta 1,3,4*; *JAG1,2*) (Ellisen et al., 1991; Lardelli et al., 1993; Lardelli et al., 1994; Bettenhausen et al., 1995; Lindsell et al., 1995; Uyttendaele et al., 1996; Dunwoodie et al., 1997; Jen et al., 1997; Luo et al., 1997; Haddon et al., 1998; Li et al., 1998). Desweiteren gibt es Proteine, welche die Aktivierung von *Notch* durch seine Liganden beeinflussen. Hierzu gehört die Gruppe der *Fringe*-Gen-Produkte (*Lunatic*-, *Manic*-, *Radical-Fringe*-Gen) sowie *OFUT1* (*O-Fucosyltransferase1*) (Panin et al.,

1997; Irvine et al., 1997; Okajima und Irvine, 2002). Es gibt intrazelluläre Modulatoren wie *TACE* (*Tumor Necrosis Factor-Alpha Converting Enzyme*) und die *Presiniline*, welche an der Signalweiterleitung der *Notch*-Signale beteiligt sind (De Strooper et al., 1999; Struhl und Greenwald, 1999; Ye et al., 1999; Brou et al., 2000) und schließlich Transkriptionsfaktoren, wie *CBF1/RJBκ*, welche die Transkription der Zielgene beeinflussen.

Da die Mitglieder der *Fringe*-Gen-Familie die Ligandenbindung von den *Notch*-Liganden an *Notch* und somit auch die Bindung von *JAG1* an *Notch1* modulieren, kommen sie als Kandidatengene für das Auftreten des *Alagille*-Syndroms ohne *JAG1* Mutation in Betracht. Auch die Ergebnisse von Arbeiten der Arbeitsgruppen Zhang und Gridley (1998) sowie Evrard et al. (1998) lassen diese These zu. Sie beschreiben Mäuse, die homozygote Mutationen des *Lunatic-Fringe*-Gens aufwiesen. Die Mutanten zeigten im Wesentlichen Fehlbildungen im Axialskelett, wie fusionierte Wirbel und Rippenfehlbildungen, sowie Minderwuchs (Zhang und Gridley, 1998). Bei 70% der Patienten mit *Alagille*-Syndrom wurden ebenfalls Skelett-Fehlbildungen, unter anderem auch fusionierte Wirbel, beschrieben. Auch Minderwuchs fiel bei einigen Patienten auf (Krantz et al., 1997) .

Aus oben aufgeführten Gründen wurden im Verlauf vorliegender Arbeit Patienten mit *Alagille*-Syndrom, welche keine nachweisbaren Mutationen im *JAG1*-Gen aufweisen, auf Mutationen in den kodierenden Bereichen der drei *Fringe*-Gene untersucht.

4.1 Komplettierung von *DNA*-Sequenzen sowie Ermittlung der Exon-Intron Struktur des *Lunatic-Fringe*-Gens

Eines der Gene, welche im Rahmen dieser Arbeit untersucht wurden, ist das *Lunatic-Fringe*-Gen. Vor der Durchführung der Mutationsanalyse im Bereich dieses Genes wurden die vorhandenen Sequenzinformationen mittels Sequenzierungen sowie *in silico* Analysen komplettiert sowie die Exon-Intron-Struktur festgestellt. Aus der Literatur (Moran et al., 1999) konnte entnommen werden, dass eine partielle *cDNA*-Sequenz bereits veröffentlicht war (Genbank-Zugriffsnummer AF193612; vgl. Abb.4). Mittels *in silico* Analysen (*BLAST*, Erstellung von Restriktionsenzymkarten, Vergleich der humanen mit der murinen *DNA*), einem *BAC-Bank-Screening* und Sequenzierungen konnten die fehlenden Sequenzen bis auf einen, innerhalb von Exon1 des *Lunatic-Fringe*-Gens liegenden Bereich komplettiert werden (vgl. Abb.8). Dieser unbekannt Bereich ließ sich auf Grund seines hohen CG-Gehalts nicht mit der gesamten genomischen *DNA* als Matrize mittels *PCR* amplifizieren. Ein hoher Gehalt

4.2 Mutationsanalyse im Bereich des *Lunatic*-, des *Radical*- und des *Manic-Fringe*-Gens

Die Mutationsanalyse wurde mittels *SSCP* (*Single-Stranded Conformation Polymorphism*, Orita et al., 1989) durchgeführt. Um die Voraussetzungen für die *SSCP*-Analyse zu schaffen, wurden zunächst die Exons aller drei *Fringe*-Gene von jeweils 38 Patienten mit *Alagille*-Syndrom amplifiziert.

Es gelang nicht, die Exons 1, sowohl im *Lunatic*-, wie auch im *Radical-Fringe*-Gen, zu amplifizieren. Trotz vieler Optimierungsversuche mit verschiedenen *PCR*-Varianten, wie *Touch-down*- oder *Gradienten-PCR*, mit dem Zusatz verschiedener Chemikalien, die die Bindungsspezifität steigern, wie zum Beispiel Formamid oder DMSO, und verschiedenen *Primerpaaren*, kam es zu keinen spezifischen *Primerbindungen*. Auch durch Verwendung einer *Taq*-Polymerase mit *Proof-Reading*-Funktion konnte das Ergebnis nicht verbessert werden. Die unspezifischen Bindungen konnten an den zahlreichen verschieden großen Fragmenten im Agarosegel erkannt werden. Die Tatsache, dass sich die beiden Exons so schwer amplifizieren ließen, lag vermutlich an dem sehr hohen CG-Gehalt in diesen Regionen und den damit verbundenen unspezifischen *Primerbindungen* (s.o.). Somit konnten sowohl das Exon 1 des *Lunatic-Fringe*-Gens, als auch das Exon 1 des *Radical-Fringe*-Gens nicht auf Mutationen bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom untersucht werden. Auch das Exon 8 des *Lunatic-Fringe*-Gens wurde nicht auf Veränderungen untersucht, da es, wie oben beschrieben, falsch definiert worden war.

Die *SSCP*-Analyse wurde bei jeweils zwei Temperaturen (10 bzw. 18°C) durchgeführt. Somit wurde durch verschiedene Laufbedingungen die Wahrscheinlichkeit erhöht, Veränderungen, die auf dem einen Gel nicht auffällig waren, auf dem anderen zu detektieren. Kam es zu auffälligen Banden wurden diese sequenziert und die Sequenzen mit den aus Datenbanken entnommenen Sequenzen der entsprechenden Regionen verglichen.

Es konnten eine Reihe von Basenaustauschen entdeckt werden. Diese befanden sich größtenteils in Intronbereichen. *In silico* Analysen ergaben, dass diese Veränderungen innerhalb der Introns zu keinen Veränderungen auf Proteinebene führten und somit sehr wahrscheinlich ohne Krankheitsbedeutung sind. In zwei Fällen lagen die Basenaustausche innerhalb von Exons. In beiden Fällen war jeweils die *wobble*-Base mutiert, so dass es zu keiner Veränderung auf Proteinebene kam. Es konnten also in keinem der *Fringe*-Gene im Rahmen dieser Arbeit funktionelle Mutationen bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom nachgewiesen werden. Die Polymorphismen wurden

durch Berechnung des *Hardy-Weinberg*-Gleichgewichts überprüft und waren mit diesem vereinbar. Zwei der im Rahmen dieser Arbeit charakterisierten Polymorphismen sind als *SNPs* (*single nucleotide polymorphisms*) in Datenbanken eingetragen.

Auf Grund dieser Ergebnisse wurde davon ausgegangen, dass das *Alagille*-Syndrom nicht durch Veränderungen in einem der *Fringe*-Gene verursacht wird. Ein Zusammenhang zwischen Mutationen in den *Fringe*-Genen und dem *Alagille*-Syndrom sind allerdings nicht gänzlich auszuschließen. So kann es zum Beispiel sein, dass die das *Alagille*-Syndroms durch Veränderungen in den nicht untersuchten Exons, in den jeweiligen Promotor-Regionen oder in Intron-Bereichen, welche bisher nicht auf Mutationen bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom untersucht wurden, verursacht wird. Auch ist es möglich, dass die *Fringe*-Gene nur bei einem sehr geringen Anteil der Patienten verändert sind, so dass die untersuchte Gruppe von 38 Patienten zu klein war.

Wird jedoch davon ausgegangen, dass Veränderungen im Bereich der *Fringe*-Gene nicht zum *Alagille*-Syndrom führen, stellt sich erneut die Frage warum sich bei 30-35% der Patienten mit *Alagille*-Syndrom keine Mutationen im *JAG1*-Gen nachweisen ließen. Ein möglicher Ansatzpunkt wäre es, weitere Bestandteile des *Notch*-Signalsystems (vgl. Abb.24) auf einen Zusammenhang mit dem *Alagille*-Syndrom zu untersuchen. Genotyp-Phänotyp-Studien zeigten, dass es bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom mit der gleichen Mutation trotzdem zur Ausprägung sehr unterschiedlicher Phänotypen kommt (Heritage et al., 2000; Yuan et al., 2001; vgl.Tab.16). Hieraus kann geschlossen werden, dass die Ausprägung des *Alagille*-Syndroms neben Mutationen im *JAG1*-Gen auch von anderen Faktoren abhängt. Lu et al. (2003) gehen davon aus, dass Polymorphismen von Proteinen, welche die von *JAG1* induzierte *Notch*-Signalkaskade modulieren, als modifizierende Faktoren auf die Ausprägung des *Alagille*-Syndroms wirken. Auch Weinmaster (2000) postuliert, dass Proteine, die in den *Notch*-Signalweg eingreifen, als potentielle Modifikatoren in Frage kommen. Eine Arbeit von McCright et al. (2002) konnte am Maus-Modell zeigen, dass *Notch 2* einen Modifikator des *Alagille*-Syndroms darstellt. Es existieren eine Reihe von weiteren Genen, welche ebenfalls den *Notch*-Signalweg beeinflussen und als Modifikatoren oder auslösende Faktoren des *Alagille*-Syndroms in Frage kommen. *OFUT1* (Protein O-Fucosyltransferase) beeinflusst wie auch die Mitglieder der *Fringe*-Gen-Familie direkt die *Notch*-Liganden-Interaktion (Okajima und Irvine, 2002). Gegen einen Zusammenhang zwischen Veränderungen im *OFUT1*-Gen und dem *Alagille*-Syndrom spricht jedoch der

Phänotyp *OFUT1*-nullmutanter Mäuseembryos. Dieser ähnelt dem Phänotyp von Nullmutanten von Bestandteilen der *Notch*-Signalkaskade, welche, wie zum Beispiel die Preseniline, dem *Notch*-Rezeptor nachgeschaltet sind. Null-Phänotypen von *Notch*-Rezeptor, *Notch*-Ligand, oder *Fringe* zeigen weniger Ähnlichkeiten (Shi und Stanley, 2003). Neben *OFUT1* kommen noch eine Reihe anderer Bestandteile der *Notch*-Signalkaskade in Betracht. *ADAM17*, eine Metalloproteinase, spielt eine prominente Rolle in der Aktivierung des *Notch*-Signalwegs (Brou et al., 2000); die Preseniline *PSEN1* und *PSEN2* sind essentiell als Modulatoren der *Notch*-Signalkaskade (Donoviel et al., 1999; de Strooper et al., 1999). *PSEN1/PSEN2* doppelt nullmutante Mäuse zeigten neben anderen Defekten eine pathologische Herzentwicklung (Donoviel et al., 1999).

Tab.16. Ergebnisse von Genotyp-Phänotyp-Studien (Heritage et al., 2000; Yuan et al., 2001). Es werden die Mutationen im *JAG1*-Gen von fünf ausgewählten Patienten und die entsprechenden Phänotypen dargestellt.

- a.** + leichte Leberenzymabnormitäten; ++ Konstant abnorme Leberfunktion; +++ aktive chronische Hepatitis; ++++ Leberversagen, welches Transplantation nötig macht
- b.** + Herzgeräusche; ++ periphere Pulmonarstenose (PPS); +++ Klappenfehlbildungen mit PPS; ++++ extreme Fallot-Tetralogie oder Herzversagen

Patient	Mutation	Leber ^a	Herz ^b	Skelett	Auge	Gesicht
1	1808+3A→G	+	++	+	+	+
2	1808+3A→G	++++	+++	+	+	+
3	1808+3A→G	++	++	-	-	+
4	3683delICT	++	++++	+	+	+
5	3683delICT	+++	+	+	+	+

4.3 Die *Fringe*-Gene

Im Verlauf der vorliegenden Arbeit wurden die drei menschlichen *Fringe*-Gene (*Lunatic*-, *Manic*-, *Radical-Fringe*-Gen) molekular bzw. durch *in silico* Analyse charakterisiert und bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom auf Mutationen untersucht. Biochemisch stellen die Proteine der *Fringe*-Gene, fucosespezifische β -1,3-N-Acetylglukosaminyltransferasen dar, welche im Golgiapparat ihre Funktion ausüben (Moloney et al. 2000, Brückner et al. 2000). *Fringe* katalysiert die Elongation der an die EGF-ähnlichen Domänen von *Notch* gekoppelten O-Fucose durch N-Acetylglucosaminierung (vgl. Abb.27).

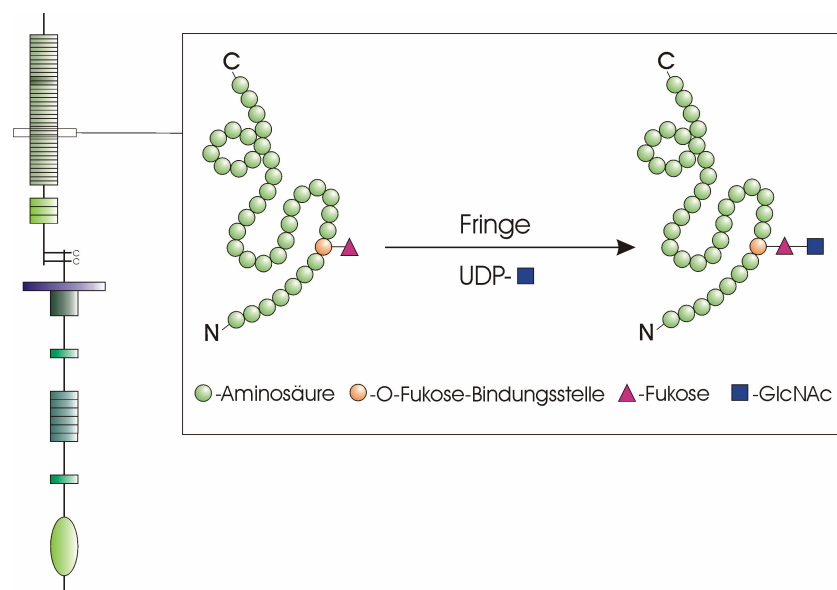


Abb.27. Elongation der O-gekoppelten Fucose an den EGF-ähnlichen Wiederholungen des *Notch*-Proteins durch Addition von β -1,3-GlcNAc durch *Fringe* (modifiziert nach Moloney et al., 2000).

Dadurch wird der Glykosylierungszustand von *Notch* so verändert, dass die Fähigkeit von *Notch*, seine Liganden zu binden, moduliert wird (Moloney et al., 2000; Brückner et al., 2000). Auf Grund dieses modulierenden Effekts, unter anderem auf die Bindung von *JAG1* an *Notch*, wurden die *Fringe*-Gene als mögliche Kandidatengene für die Entstehung des *Alagille*-Syndroms betrachtet. Vorliegende Untersuchungsergebnisse widerlegten diese These allerdings mit großer Wahrscheinlichkeit.

Im Folgenden sollen die Chromosomenregionen, in denen sich die jeweiligen *Fringe*-Gene befinden, näher betrachtet und eine mögliche Assoziation der Gene mit bestimmten Erkrankungen oder Krankheitsloci diskutiert werden.

4.3.1 Lunatic-Fringe-Gen

Das *Lunatic-Fringe*-Gen befindet sich auf dem kurzen Arm des humanen Chromosoms 7 in der Bande p22 (Egan et al. 1998). *In silico* Analysen ergaben, dass der Marker WI-15937, welcher etwa 2,2 Mb vom Telomer des kurzen Arms entfernt liegt, im *Lunatic-Fringe*-Gen enthalten ist. Somit ist darüber die Position des Gens bestimmt. Erst wenige Erkrankungen wurden dieser Region zugeordnet (vgl. Abb.28).

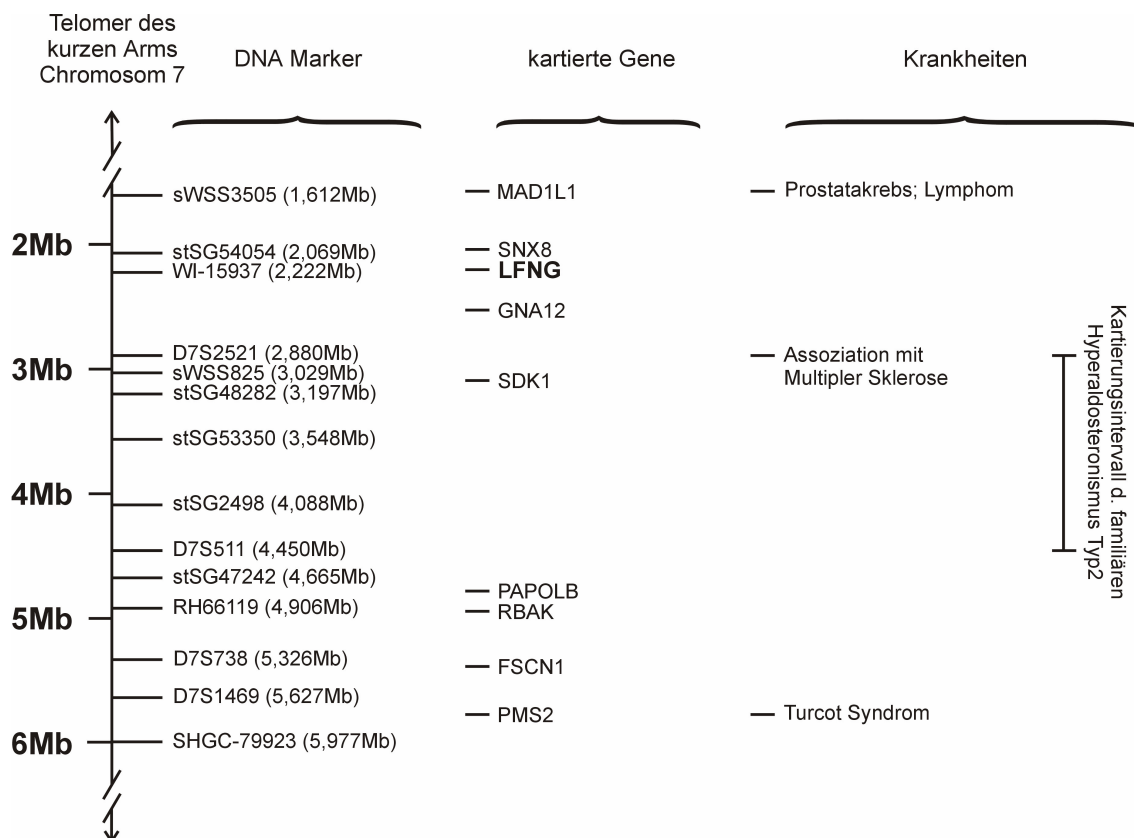


Abb.28. Darstellung der Umgebung des *Lunatic-Fringe*-Gens (*LFNG*) auf Chromosom 7p22. Die Daten wurden den Seiten *OMIM Gene Map*, *Omim Morbid Map* sowie *Map viewer* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* unter <http://www.ncbi.nih.gov/> entnommen.

Zwei dieser Erkrankungen konnten bisher mit keinem Gen assoziiert werden (vgl. Abb.28). Der familiäre Hyperaldosteronismus Typ 2 wurde über Kopplungsanalysen mit den Markern D7S2521 und D7S511 auf 7p22 in Zusammenhang gebracht (Lafferty et al. 2000). Diese Marker liegen 2,88 Mb bzw. 4,45 Mb vom Telomer des kurzen Arms entfernt. Die Multiple Sklerose ist ebenfalls mit dem Marker D7S2521 assoziiert

(Bielecki et al., 2003). Dieser Marker befindet sich etwa 0,5 Mb vom Locus des *Lunatic-Fringe*-Gens entfernt auf 7p22. Von einem Zusammenhang zwischen diesen Erkrankungen und Veränderungen im *Lunatic-Fringe*-Gen ist jedoch nicht auszugehen, da die Symptome dieser Erkrankungen deutlich von den Defekten von Mäusen mit Mutationen innerhalb des *Lunatic-Fringe*-Gens abweichen (Zhang und Gridley, 1998; Evrard et al., 1998). Mäuse, die heterozygote Mutationen im *lunatic-fringe*-Gen aufwiesen waren unauffällig und fruchtbar. Homozygot betroffene Mäuse wiesen schwere Defekte in Derivaten des somitischen Mesoderms, vor allem des axialen Skeletts auf. Die regelmäßige metamerische Gliederung der Wirbelkörper war entlang der gesamten Wirbelsäule gestört; zahlreiche Wirbel und Rippen waren fusioniert und Wirbel waren fehlgebildet. Die mutanten Mäuse wiesen einen verkürzten Körperstamm sowie einen nur noch rudimentär vorhandenen Schwanz auf. Auf Grund der Fehlbildungen des Brustkorbs kam es bei einigen Mäusen zu starker Ateminsuffizienz mit verminderter Überlebensrate nach der Geburt. Dieser Phänotyp *Lfn*-mutanter Mäuse ähnelt sehr stark dem Phänotyp muriner *Dll3*-Mutanten (Zhang et al., 2002). Ein Funktionsverlust des murinen *Dll3*-Gens führte zu schweren Defekten des Axialskeletts mit stark disorganisierten Wirbeln und Fehlbildungen der Rippen (Dunwoodie et al., 2002). Diese Defekte entsprechen der Spondylokostalen Dysplasie beim Menschen, welche durch Mutationen des humanen *DLL3*-Gens hervorgerufen werden kann (Bulman et al., 2000; Turnpenny et al., 2003). Da das *Lunatic-Fringe*-Gen die Bindung zwischen *Notch* und seinen Liganden, zu denen auch *DLL3* gehört, reguliert und der Phänotyp *Lfn*-mutanter Mäuse sehr stark dem Phänotyp muriner *Dll3*-Mutanten ähnelt, wäre es interessant, einen möglichen Zusammenhang zwischen Mutationen im *Lunatic-Fringe*-Gen und der Entstehung der Spondylokostalen Dysplasie zu untersuchen.

4.3.2 *Manic-Fringe-Gen*

Das humane *Manic-Fringe-Gen* liegt auf Chromosom 22q13.1, 36,1 Mb vom Telomer des kurzen Arms entfernt. Die Umgebung dieses Gens wird in Abb.29 dargestellt.

Das *Manic-Fringe-Gen* ist dem Locus des *Ewings-Sarkoms (ES)* benachbart. Das Gen befindet sich knapp distal zu dem Bruchpunkt der t(11;22) (q24;q12) Translokation, welche in 92% der *ES* und der primitiven neuroektodermalen Tumoren (*PNET*) identifiziert wurde, und ist bei Vorliegen eines *EWS/FLI1* Fusionsgenes hochreguliert (May et al., 1997). May et al. folgerten daraus, dass das *Manic-Fringe-Gen* ein *Target-Gen* des *EWS/FLI1*-Fusionsproduktes ist. Im Gegensatz dazu vermuten Moran et al. (1999), dass bei einem Teil der *ES* und *PNET*-Tumoren die Translokationsbruchpunkte cis-aktive Sequenzen beeinflussen, welche die Regulation des *Manic-Fringe*-Gens kontrollieren, woraus die Zuordnung zu einem neoplastischen Phänotyp resultiert.

Das *Manic-Fringe-Gen* liegt in einer Region, in der einige Tumorsuppressorgene vermutet werden. So gehen Ino et al. (1999) davon aus, dass sich auf Chromosom 22, zwischen den Markern D22S280 (30,005 Mb) und D22S282 (40,562 Mb) ein Tumorsuppressorgen befindet, da ein Großteil von Astrozytomen mit Deletionen in diesem Bereich einhergehen. Das *Manic-Fringe-Gen* liegt innerhalb dieser Region. Ein Tumorsuppressorgen wird außerdem auf Grund von *LOH (Loss of heterozygosi)* bei Ovariakarzinomen in der von den Markern NF2 (26,754 Mb) und D22S283 (33,494 Mb) begrenzten Region vermutet (Englefield et al., 1994).

Ein anderer Defekt in dieser Region wurde von Fujita et al. (2000) beschrieben. Ein 18 Monate altes japanisches Mädchen wies eine Deletion von q13.1q13.2 auf Chromosom 22 auf (46,XX,del(22) (q13.1q13.2)). Sie zeigte einen Hörverlust, Innenohranomalien, Hypotonie, ein langes Philtrum, volle Augenlider, einen Epikanthus und eine psychomotorische Entwicklungsverzögerung. Das Wachstum war überdurchschnittlich, die Größe lag zwischen der 75. und der 90. Percentile. Das Gehirn wies Zeichen verzögerter Myelinisierung auf.

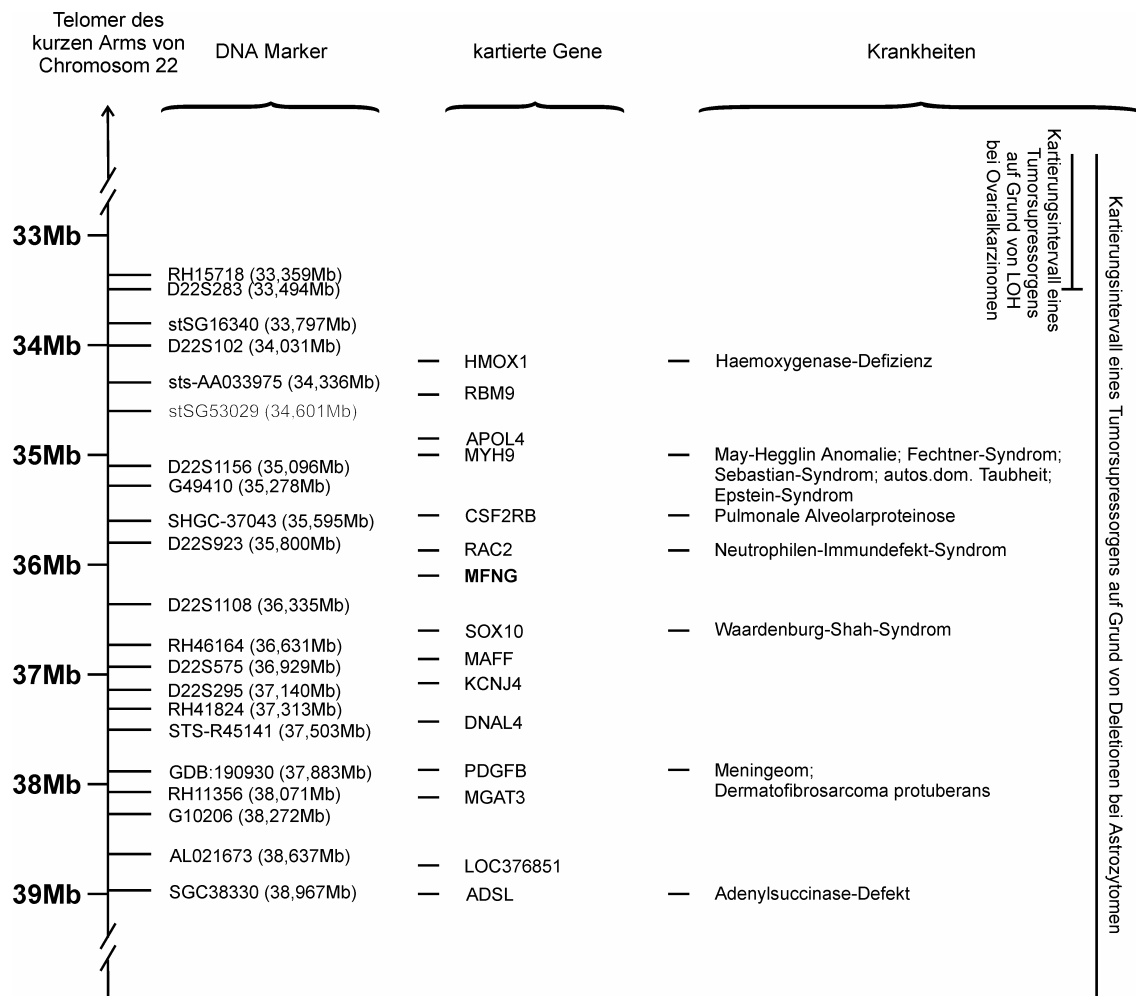


Abb.29. Darstellung der Umgebung des *Manic-Fringe*-Gens (*MFNG*) auf Chromosom 22q13.1. Die Daten wurden den Seiten *OMIM Gene Map*, *Omim Morbid Map* sowie *Map viewer* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* unter <http://www.ncbi.nih.gov/> entnommen.

4.3.3 Radical-Fringe-Gen

Das humane *Radical-Fringe*-Gen liegt auf Chromosom 17 in der Region q25 (Banfi et al. 1996). Pajunen et al. (1991) beschrieb eine Kopplung des *Radical-Fringe*-Gens zu dem Marker SHGC-31983 mit einem *LOD score* von 17,86. Dieser Marker liegt auf 17q25.3, etwa 82,2 Mb vom Telomer des kurzen Arms entfernt. Mittels *BLAST* konnte festgestellt werden, dass der Marker SHGC-31983 ebenso wie das *Radical-Fringe*-Gen in der etwa 150.000 bp umfassenden Sequenz AC105341 enthalten ist. SHGC-31983 liegt nur 430 bp von dem *Radical-Fringe*-Gen entfernt. Somit liegt auch das *Radical-Fringe*-Gen auf 17q25.3, etwa 82,2 Mb vom Telomer des kurzen Arms entfernt. Die Umgebung dieses Gens wird in Abb.30 dargestellt.

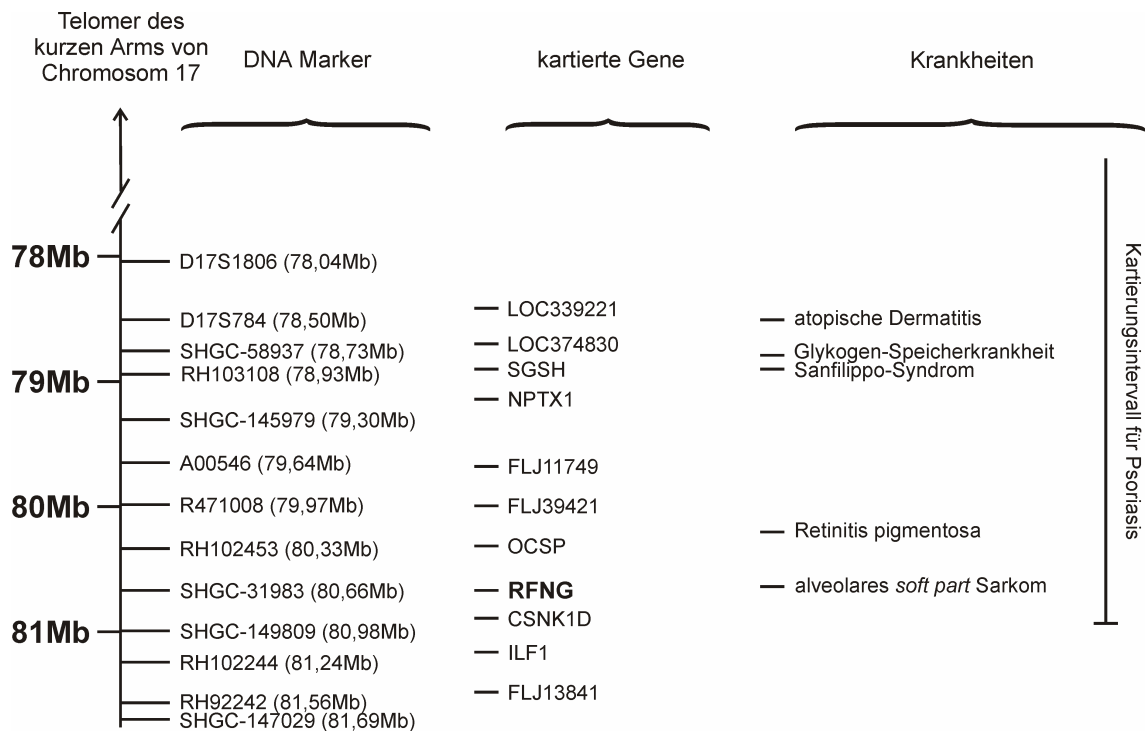


Abb.30. Darstellung der Umgebung des *Radical-Fringe*-Gens (*RFNG*) auf Chromosom 17q25.3. Die Daten wurden den Seiten *OMIM Gene Map*, *Omim Morbid Map* sowie *Map viewer* des *National Center for Biotechnology Information (NCBI)* unter <http://www.ncbi.nih.gov/> entnommen.

Sowohl die Psoriasis als auch die atopische Dermatitis sind mit dem Marker D17S784 gekoppelt (Cookson et al. 2001). In beiden Fällen sind keine Gene bekannt, die mit den Erkrankungen assoziiert sind. Die Co-Lokalisation dieser beiden Krankheiten spricht laut Cookson et al. (2001) dafür, dass die Psoriasis und die atopische Dermatitis von den gleichen Genen, unabhängig von dem atopischen Mechanismus, beeinflusst werden. Literaturrecherchen ergaben, dass die *Fringe*-Gene in der adulten Haut von Mäusen durch Retinsäurebehandlung reaktiviert werden (Thelu et al., 1998). Retinsäure gilt als Verstärker der Basalzellproliferation (Schweizer und Marks, 1977). Die Basalzellproliferation ist bei verschiedenen Hauterkrankungen, unter anderem bei Psoriasis stark erhöht. Somit wäre es interessant, einen möglichen Zusammenhang zwischen dem *Radical-Fringe*-Gen und Hauterkrankungen zu untersuchen.

4.4 Ausblick

Es ist auch nach Abschluss vorliegender Arbeit nicht klar, weshalb bei 30-35% der Patienten mit *Alagille*-Syndrom keine Mutationen im krankheitsverursachenden *JAG1*-Gen nachweisbar sind. Nun stellt sich die Frage, ob Patienten der Gruppe, bei welchen bisher keine Mutationen zu finden waren, dennoch Mutationen im *JAG1*-Gen aufweisen. Um diese Frage sicher beantworten zu können, wird es notwendig sein, weitere Untersuchungen durchzuführen. So wären komplette Durchsequenzierungen aller Exons, Heteroduplex-Analysen, Protein-*Truncation*-Tests auf *cDNA*-Ebene sowie Studien auf RNA-Ebene möglich, um bisher nicht nachweisbare Mutationen zu detektieren. Sollte auch nach Durchführung dieser Tests eine größere Gruppe an Patienten verbleiben, bei denen keine Mutationen im *JAG1*-Gen nachgewiesen wurden, so stellt sich weiterhin die Frage nach genetischer Heterogenität.

Wie oben beschrieben kommen als Kandidatengene eine Reihe an Genen, welche Bestandteile der *Notch*-Signalkaskade sind (vgl. Abb.24), in Betracht. Besonders hervorzuheben ist hier das *Notch2*-Gen, welches von McCright et al. (2002) als Modifikator des *Alagille*-Syndroms identifiziert wurde.

Somit werden noch weitere Untersuchungen nötig sein, um die Pathogenese des *Alagille*-Syndroms vollständig aufklären zu können.

5. Zusammenfassung

Das *Alagille*-Syndrom ist eine der häufigsten Ursachen für angeborene chronische Lebererkrankungen. Die Patienten weisen neben Fehlbildungen des Gallengangsystems hauptsächlich Defekte im kardiovaskulären System, im Skelettsystem, im Auge und im Gesicht auf. *JAG1* wurde als krankheitsverursachendes Gen identifiziert. Bei einer Gruppe von 30-35% der Patienten mit *Alagille*-Syndrom konnten jedoch mit den gängigen Suchmethoden keine Veränderungen im *JAG1*-Gen gefunden werden. Aufgrund dieser Tatsache wird genetische Heterogenität bei der Entstehung des AGS diskutiert. Da das *JAG1*-Gen ein Bestandteil des sehr komplexen *Notch*-Signalsystems ist, wurde vermutet, dass auch andere Bestandteile dieses Systems Einfluss auf den Pathomechanismus des *Alagille*-Syndroms nehmen können. Die Produkte der drei humanen *Fringe*-Gene [*Lunatic*-, *Radical*- und *Manic-Fringe*-Gen (*LFNG*, *RFNG*, *MFNG*)] regulieren direkt die Wirkung des *JAG1*-Proteins innerhalb der *Notch*-Signalkaskade und wurden als potentielle Kandidatengene betrachtet.

Im Verlauf dieser Arbeit sollten mittels *in silico* Analysen sowie experimenteller Arbeiten (*BAC-Bank-Screening*, Sequenzierungen) die Sequenzen der *Fringe*-Gene komplettiert sowie die genomische Struktur des *LFNGs* etabliert werden. Anschließend sollte bei einer Gruppe von 38 Patienten mit *Alagille*-Syndrom, bei welchen keine Mutationen im *JAG1*-Gen nachweisbar waren, ein Mutationsscreening im Bereich aller drei *Fringe*-Gene durchgeführt werden. Hierfür wurden Primer zur Amplifikation sämtlicher Exons generiert und die entsprechenden *PCRs* optimiert. Es gelang, vermutlich auf Grund des hohen CG-Gehalts dieser Sequenzen, nicht, die jeweiligen Exons 1 des *Lunatic*- sowie des *Radical-Fringe*-Gens zu amplifizieren. Somit konnten diese Exons im Folgenden nicht auf Mutationen untersucht werden. Wie sich nach Abschluss der experimentellen Arbeit zeigte, war das Exon 8 des *Lunatic-Fringe*-Gens mittels *in silico* Analyse falsch definiert worden, sodass in Folge nicht Exon 8 untersucht wurde. Das Mutationsscreening in den verbleibenden Exons der drei Gene wurde mittels *SSCP* durchgeführt. Traten Auffälligkeiten im *SSCP*-Lauf auf, folgte eine Sequenzierung. Eine krankheitsverursachende Mutation konnte bei keinem Patienten nachgewiesen werden. Es wurden allerdings eine Reihe von Polymorphismen im Bereich der *Fringe*-Gene identifiziert. Diese wurden durch Berechnung des *Hardy-Weinberg*-Gleichgewichts überprüft und waren mit diesem vereinbar. Im *Lunatic-Fringe*-Gen wurden die Polymorphismen c:433-106C→T, c:433-78C→T, c:733-51C→A, c:733-36C→T, c:969G→A, c:985-53G→A, c:985-37G→A nachgewiesen, im *Radical-Fringe*-Gen c:460A→C, c:574-5C→T, c:993+102G→A und im *Manic-Fringe*-

Gen c:648-56C→T. *In silico* Analysen ergaben, dass die Polymorphismen innerhalb der nicht kodierenden Bereiche zu keinen Veränderungen auf Proteinebene führten und somit sehr wahrscheinlich ohne Krankheitsbedeutung sind. In den beiden Fällen, in denen die Sequenzvarianten innerhalb von Exons lagen, waren die *wobble bases* betroffen, sodass auch hier keine Veränderungen auf Proteinebene zu erwarten sind. Abschließend lässt sich feststellen, dass Mutationen in einem der drei *Fringe*-Gene zumindest keine signifikante Rolle bei der Entstehung des *Alagille*-Syndroms spielen.

6. Literaturverzeichnis:

Alagille D, Habib EC, Thorassim:

L'atresie des vortres biliaires intrahepatiques avec voies biliaires extrahepatiques permeables chez l'enfant.

J Par Pediatr Editions Mediales Flammarion (1969) 301-318

Alagille D, Odievre M, Gatier M, Dommergues JP:

Hepatic ductular hypoplasia associated with characterisic facies, vertebral malformations, retarded physical, mental and sexual development and cardiac murmur.

J Pediatr 86 (1975) 63-71

Alagille D, Estrada A, Hadchouel M, Gautier M, Odievre M, Dommergues JP:

Syndromic paucity of interlobular bile ducts (Alagille syndrome or arteriohepatic dysplasia): Review of 80 cases.

J Pediatr 110 (1987) 195-200

Anad F, Burn J, Matthews D, Cross I, Davidson BCC, Mueller R, Sands M, Lillington DM, Eastham E:

Alagille syndrome and deletion of 20p.

Med Genet 27 (1990) 729-737

Anderson WF, Friedniann T:

Gene Therapy: Strategies for Gene Therapy.

Encyklopedia of Bioethics (1994) 907-914

Artavanis-Tsakonas S, Simpson P:

Choosing a cell fate: a view from the *Notch* locus.

TIG 7 (1991) 403-408

Artavanis-Tsakonas S, Matsuno K, Fortini ME:

Notch signaling

Science 268 (1995) 225-232

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ:

Notch signaling: cell fate control and signal integration in development.

Science 284 (1999) 770-776

Baas F, Bikker H, van Ommen GJB, de Vijlder JJM:

Unusual scarcity of restriction site polymorphism in the human thyroglobulin gene. A linkage study suggesting autosomal dominance of a defective thyroglobulin allele.

Human Genet 67 (1984) 301-305

Banfi S, Borsani G, Rossi F, Bernard L, Guffanti A:

Identification and mapping of human cDNAs homologous to *Drosophila* mutant genes through EST database searching.

Nat genet 13 (1996) 167-174

Bettenhausen B, Hrabe de Angelis M, Simon D, Guenet JL, Gossler A:

Transient and restricted expression during mouse embryogenesis of *Dll1*, a murine gene closely related to *Drosophila* *Delta*.

Development 121 (1995) 2407-2418

Bielecki B, Mycko MP, Tronczynska E, Bieniek M, Sawcer S, Setakis E, Benediktsson K, Compston A, Selmaj KW:

A whole genome screen for association in Polish multiple sclerosis patients.

J Neuroimmunol 143 (2003) 107-111

Bird, AP:

CpG islands as gene markers in the vertebrate nucleus.

Trends Genet 3 (1987) 342-347

Birnboim HC, Doly J:

A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA.

Nucleic Acids Res 7 (1979) 1513-1523

Blaumueller CM, Qi H, Zagouras P, Artavanis-Tsakonas S:

Intracellular Cleavage of notch leads to a heterodimeric receptor of the plasma membrane.

Cell 90 (1997) 281-291

Bowles NE, Bowles KR, Towbin JA:

The "final common pathway" hypothesis and inherited cardiovascular disease. The role of cytoskeletal proteins in dilated cardiomyopathy.

Herz 25 (2000) 168-175

Brou C, Logeat F, Gupta N, Bessia C, LeBail O, Doedens JR, Cumano A, Roux P, Black RA, Israel A:

A novel proteolytic cleavage involved in Notch signaling: the role of the disintegrin-metalloprotease TACE.

Mol Cell 5 (2000) 207-216

Brückner K, Perez L, Clausen H, Cohen S:

Glycosyltransferase activity of Fringe modulates Notch-Delta interactions.

Nature 406 (2000) 411-415

Bulman MP, Kusumi K, Frayling TM, McKeown C, Garrett C, Lander ES, Krumlauf R,

Hattersley AT, Ellard S, Turnpenny PD:

Mutations in the human delta homologue, DLL3, cause axial skeletal defects in spondylocostal dysostosis.

Nat Genet 24 (2000) 438-441

Byrne JLB, Harrod MJE, Friedmann JM, Howard-Peebles PN:

Del(20p) with manifestations of arteriohepatic dysplasia.

Am J Med Genet 24 (1986) 673-678

Chan YM, Jan YN:

Roles for proteolysis and trafficking in notch maturation and signal transduction.

Cell 94 (1998) 423-426

Chan YM, Jan YN:

Presenilins, processing of beta-amyloid precursor protein, and notch signaling.

Neuron 23 (1999) 201-204

Christensen S, Kodoyianni V, Bosenberg M, Friedman L, Kimble J:

lag-1, a gene required for lin-12 and glp-1 signaling in *Caenorhabditis elegans*, is homologous to human CBF1 and *Drosophila* Su(H).

Development 122 (1996) 1373-1383

Cookson WO, Ubhi B, Lawrence R, Abecasis GR, Walley AJ, Cox HE, Coleman R, Leaves NI, Trembath RC, Moffatt MF, Harper JI:

Genetic linkage of childhood atopic dermatitis to psoriasis susceptibility loci.

Nat Genet 27 (2001) 372-373

Crosnier C, Driancourt C, Raynaud N, Dhorne-Pollet S, Pollet N, Bernard O, Hadchouel M, Meunier-Rotival M:

Mutations in JAGGED1 gene are predominantly sporadic in Alagille syndrome.

Gastroenterology 116 (1999) 1141-1148

D'Andrea A:
Fanconi anemia.
Curr Biol 13 (2003) 546

Danks DM, Campbell PE, Jack I, Rogers J, Smith AL:
Studies of the aetiology of neonatal hepatitis and biliary atresia.
Arch Dis Child 52 (1977) 360-367

De Strooper B, Annaert W, Cupers P, Saftig P, Craessaerts K, Mumm JS, Schroeter EH, Schrijvers V, Wolfe MS, Ray WJ, Goate A, Kopan R:
A presenilin-1-dependent gamma-secretase-like protease mediates release of Notch intracellular domain.
Nature 398 (1999) 518-522

Dhorne-Pollet S, Deleuze JF, Hadchouel M:
Segregation analysis of Alagille syndrome.
J Med Genet 31 (1994) 453-457

Donoviel DB, Hadjantonakis AK, Ikeda M, Zheng H, Hyslop PS, Bernstein A:
Mice lacking both presenilin genes exhibit early embryonic patterning defects.
Genes Dev 13 (1999) 2801-2810

Dunwoodie SL, Henrique D, Harrison SM, Beddington RS:
Mouse Dll3: a novel divergent Delta gene which may complement the function of other Delta homologues during early pattern formation in the mouse embryo.
Development 124 (1997) 3065-3076

Dunwoodie SL, Clements M, Sparrow DB, Sa X, Conlon RA, Beddington RS:
Axial skeletal defects caused by mutation in the spondylocostal dysplasia/pudgy gene Dll3 are associated with disruption of the segmentation clock within the presomitic mesoderm.
Development 129 (2002) 1795-1806

Egan S, Herbrick JA, Cohen B, Flock G et al.:
Mapping of the human Lunatic Fringe (LFNG) Gene to 7p22 and Manic Fringe (MFNG) to 22q12.
Genomics 54 (1998) 576-577

Ellisen LW, Bird J, West DC, Soreng AL, Reynolds TC, Smith SD, Sklar J :
TAN-1, the human homolog of the *Drosophila Notch* gene, is broken by chromosomal translocations in T lymphoblastic neoplasms.
Cell 66 (1991) 649-661

Elmslie FV, Vivian AJ, Gardiner H, Hall C, Mowat AP, Winter RM :
Alagille syndrome : family studies.
J Med Genet 32 (1995) 264-268

Englefield P, Foulkes WD, Campbell IG:
Loss of heterozygosity on chromosome 22 in ovarian carcinoma is distal to and is not accompanied by mutations in NF2 at 22q12.
Br J Cancer 70 (1994) 905-907

Estivill X, Farrall M, Scambler PJ, Bell GM, Hawley KM, Lench NJ, Bates GP, Kruyer HC, Frederick PA, Stanier P, et al:
A candidate for the cystic fibrosis locus isolated by selection for methylation-free islands.
Nature 326 (1987) 840-845

Evrard YA, Lun Y, Aulehla A, Gan L, Johnson RL :
Lunatic fringe is an essential mediator of somite segmentation and patterning.
Nature 394 (1998) 377-381

- Fleming RJ, Gu Y, Hukriede Na:
Serrate-mediated activation of Notch is specifically blocked by the product of the gene fringe in the dorsal compartment of the Drosophila wing imaginal disc.
Development 125 (1997) 2973-2981
- Franco del Amo F, Gendron-Maguire M, Swiatek PJ, Jenkins NA, Copeland NG, Gridley T:
Cloning, analysis, and chromosomal localization of Notch-1, a mouse homolog of Drosophila Notch.
Genomics 15 (1993) 259-264
- Franke Y:
Physikalisch Kartierung der Alagille Syndrom Chromosomenregion 20p11.23-p12.1 und Suche nach transkriptionell aktiven Sequenzen.
Dissertation, Universität Göttingen 1996
- Fujita Y, Mochizuki D, Mori Y, Nakamoto N, Kobayashi M, Omi K, Kodama H, Yanagawa Y, Abe T, Tsuzuka T, Yamanouchi Y, Tagano T:
Girl with accelerated growth, hearing loss, inner ear anomalies, delayed myelination of the brain, and del(22)(q13.1q13.2).
Am J Med Genet 92 (2000) 195-199
- Giannakudis J, Ropke A, Kujat A, Krajewska-Walasek M, Hughes H, Fryns JP, Bankier A, Amor D, Schlicker M, Hansmann I:
Parental mosaicism of JAG1 mutations in families with Alagille syndrome.
Eur J Hum Genet 9 (2001) 209-216
- Gray GE, Mann RS, Mitsiadis E, Henrique D; Carcangiu ML, Banks A, Leiman J, Ward D, Ish-Horowitz D, Artavanis-Tsakonas S :
Human ligands of the Notch receptor.
Am J Path 154 (1999) 785-794
- Haddon C, Smithers L, Schneider-Maunoury S, Coche T, Henrique D, Lewis J:
Multiple delta genes and lateral inhibition in zebrafish primary neurogenesis.
Development 125 (1998) 359-370
- Henderson ST, Gao D, Lambie EJ, Kimble J:
lag-2 may encode a signaling ligand for the GLP-1 and LIN-12 receptors of *C. elegans*.
Development 120 (1994) 2913-2924
- Hennen L, Petermann T, Schmitt JJ:
Genetische Diagnostik – Chancen und Risiken genetischer Diagnostik.
edition sigma, Berlin 1996, ISBN 3 89404 406 3
- Heritage ML, MacMillan JC, Colliton RP, Genin A, Spinner NB, Anderson GJ:
Jagged1 (JAG1) Mutation Detection in an Australian Alagille Syndrome Population.
Hum Mutat 16 (2000) 408-416
- Hoehe MR, Kopke K, Wendel B, Rohde K, Flachmeier C, Kidd KK, Berettini WH, Church GM:
Sequence variability and candidate gene analysis in complex disease: association of mu opioid receptor gene variation with substance dependence.
Hum Mol Genet 9 (2000) 2895-2908
- Hsieh JJ, Henkel T, Salmon P, Robey E, Peterson MG, Hayward SD:
Truncated mammalian Notch1 activates CBF1/RBPJk-repressed genes by a mechanism resembling that of Epstein-Barr virus EBNA2.
Mol Cell Biol 16 (1996) 952-952
- Ino Y, Silver JS, Blazejewski L, Nishikawa R, Matsutani M, von Deimling A, Louis DN:
Common regions of deletion on chromosome 22q12.3-q13.1 and 22q13.2 in human astrocytomas appear related to malignancy grade.
J Neuropathol Exp Neurol 58 (1999) 881-885

- Irvine KD, Vogt TF:
Dorsal-ventral signaling in limb development.
Curr Opin Cell Biol 9 (1997) 867-876
- Irvine KD, Wieschaus E:
Fringe, a boundary-specific signaling molecule, mediates interactions between dorsal and ventral cells during *Drosophila* wing development
Cell 79 (1994) 595-606
- Jen WC, Wettstein D, Turner D, Chitnis A, Kintner C:
The Notch ligand, X-Delta-2, mediates segmentation of the paraxial mesoderm in *Xenopus* embryos.
Development 124 (1997) 1169-1178
- Joutel A, Corpechot C, Ducros A, Vahedi K, Chabriat H, Mouton P, Alamowitch S, Domenga V, Cecillion M, Marechal E, Maciazek J, et al.:
Notch3 mutations in cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (CADASIL), a mendelian condition causing stroke and vascular dementia.
Ann N Y Acad Sci 826 (1997) 213-217
- Kidd S, Lieber T, Young MW:
Ligand-induced cleavage and regulation of nuclear entry of Notch in *Drosophila melanogaster* embryos.
Genes Dev 12 (1998) 3728-3740
- Kopan R, Weintraub H:
Mouse notch: expression in hair follicles correlates with cell fate determination.
J Cell Biol 121 (1993) 631-641
- Kopan R, Schroeter EH, Weintraub H, Nye JS:
Signal transduction by activated mNotch: importance of proteolytic processing and its regulation by the extracellular domain.
Proc Natl Acad Sci U S A 93 (1996) 1683-1688
- Krantz ID, Piccoli DA, Spinner NB:
Alagille Syndrom.
J Med Genet 34 (1997) 152-157
- Krantz ID, Colliton RP, Genin A, Rand EB, Li L, Piccoli DA, Spinner NB:
Spectrum and frequency of *Jagged1* (*JAG1*) Mutations in Alagille syndrome patients and their families.
Am J Hum Genet 62 (1998) 1361-1369
- Kurooka H, Honjo T:
Functional interaction between the mouse notch1 intracellular region and histone acetyltransferases PCAF and GCN5.
J Biol Chem 275 (2000) 17211-17220
- LaBrecque DR, Mitros FA, Nathan RJ, Romanchuk KG, Judisch GF, El-Khoury GH :
Four generations of arteriohepatic dysplasia.
Hepatology 2 (1982) 467-474
- Lafferty AR, Torpy DJ, Stowasser M, Taymans SE, Lin JP, Huggard P, Gordon RD, Stratakis CA:
A novel genetic locus for low renin hypertension: familial hyperaldosteronism type II maps to chromosome 7 (7p22).
J Med Genet 37 (2000) 831-835
- Lander ES, Linton LM, Birren B, Nusbaum C, Zody MC, Baldwin J, Devon K, Dewar K, Doyle M, FitzHugh W, Funke R, Gage D, Harris K, Heaford A, Howland J, Kann L, Lehoczky J et al:
Initial sequencing and analysis of the human genome.
Nature 409 (2001) 860-921

Lardelli M, Lendahl U:

Motch A and motch B—two mouse Notch homologues coexpressed in a wide variety of tissues.
Exp Cell Res 204 (1993) 364-372

Lardelli M, Dahlstrand J, Lendahl U:

The novel Notch homologue mouse Notch 3 lacks specific epidermal growth factor-repeats and is expressed in proliferating neuroepithelium.
Mech Dev 4 (1994) 123-136

Legius E, Fryns JP, Eyskens B, Eggermont E, Desmet V, de Bethune G, Van den Berghe H:

Alagille syndrome (arteriohepatic dysplasia) and del(20)(p11.2)
Am J Med Genet 35 (1990) 532-535

Levitus M, Roimans MA, Steltenpool J, Cool NF, Oostra AB, Mathew CG, Hoatlin ME, Waisfisz Q, Arwert F, De Winter JP, Joenje H:

Heterogeneity in Fanconi anemia: evidence for two new genetic subtypes.
Blood 2003

Li L, Kranz ID, Deng Y, Genin A, Banta AB, Collins CC, Qi M, Trask BJ, Kuo WL, Cochran J, Costa T, Pierpont MEM, Rand EB, Piccoli DA, Hood L, Spinner NB:

Alagille syndrome is caused by mutations in human Jagged1, which encodes a ligand for Notch1.

Nat Genet 16 (1997) 243-251

Li L, Huang GM, Banta AB, Deng Y, Smith T, Dong P, Friedman C, Chen L, Trask BJ, Spies T, Rowen L, Hood L:

Cloning, characterization, and the complete 56.8-kilobase DNA sequence of the human NOTCH4 gene.

Genomics 51 (1998) 45-58

Lieber T, Wesley CS, Alcamo E, Hassel B, Krane JF, Campos-Ortega JA, Young MW:

Single amino acid substitutions in EGF-like elements of Notch and Delta modify *Drosophila* development and affect cell adhesion in vitro.

Neuron 9 (1992) 847-859

Lindsell CE, Shawber CJ, Boulter J, Weinmaster G:

Jagged: a mammalian ligand that activates *Notch1*.

Cell 80 (1995) 909-917

Liu JM, Buchwald M, Walsh CE, Young NS:

Fanconi anemia and novel strategies for therapy.

Blood 84 (1994) 3995-4007

Logeat F, Bessia C, Brou C, LeBail O, Jarriault S, Seidah NG, Israel A:

The Notch1 receptor is cleaved constitutively by a furin-like convertase.

Proc Natl Acad Sci U S A 95 (1998) 8108-8112

Lu F, Morrissette JJ, Spinner NB:

Conditional JAG1 mutation shows the developing heart is more sensitive than developing liver to JAG1 dosage.

Am J Hum Genet 72 (2003) 1065-1070

Luo B, Aster JC, Hasserjian RP, Kuo F, Sklar J:

Isolation and functional analysis of a cDNA for human Jagged2, a gene encoding a ligand for the Notch1 receptor.

Mol Cell Biol 17 (1997) 6057-6067

Ma HW, Lajeunie E, de Parseval N, Munnich A, Renier D, Le Merrer M:

Possible genetic heterogeneity in the Saethre-Chotzen syndrome.

Hum Genet 98 (1996) 228-232

- MacDonald ME, Novelletto A, Lin C, Tagle D, Barnes G, Bates G, Taylor S, Allitto B, Altherr M, Myers R, et al:
The Huntington's disease candidate region exhibits many different haplotypes.
Nat Genet 1 (1992) 99-103
- May WA, Arvand A, Thompson AD, Braun BS, Wright M, Denny CT:
EWS/FLI1-induced manic fringe renders NIH 3T3 cells tumorigenic.
Nat Genet 17 (1997) 495-497
- McCright B, Lozier J, Gridley T:
A mouse model of Alagille syndrome: Notch2 as a genetic modifier of Jag1 haploinsufficiency.
Development 129 (2002) 1075-1082
- Medhurst AL, Huber PAJ, Waisfisz Q, de Winter JP, Mathew CG:
Direct interactions of the five known Fanconi anaemia proteins suggest a common functional pathway.
Hum Mol Genet 10 (2001) 423-429
- Miele L, Osborne B:
Arbiter of differentiation and death: Notch signaling meets apoptosis.
J Cell Physiol 181 (1999) 393-409
- Miller SA, Dykes DD, Polesky HF :
A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells.
Nucleic Acids Res 16 (1988) 1215
- Moloney DJ, Panin VM, Johnston C, Shao L, Wilson R, Wang Y, Stanley P, Irvine KD, Haltiwanger RS, Vogt TF :
Fringe is a glycosyltransferase that modifies Notch.
Nature 406 (2000) 369-374
- Moran JL, Johnston SH, Rauscolb C, Bhalerao J, Bowcock AM, Vogt TF:
Genomic structure, mapping, and expression analysis of the mammalian Lunatic, Manic and Radical fringe Genes.
Mamm Genom 10 (1999) 535-541
- Moustacchi E, Diatloff-Zito C:
DNA semi-conservative synthesis in normal and Fanconi anemia fibroblasts following treatment with 8-methoxypsoralen and near ultraviolet light or with x-rays.
Hum Genet 70 (1985) 236-242
- Mueller RF, Pagon RA, Pepin MG:
Arteriohepatic dysplasia: phenotypic features and family studies.
Clin Genet 25 (1984) 323-331
- Mumm JS, Kopan R:
Notch signaling: from the outside in.
Dev Biol 228 (2000) 151-165
- Mumm JS, Schroeter EH, Saxena MT, Griesemer A, Tian X, Pan DJ, Ray WJ, Kopan R:
A ligand-induced extracellular cleavage regulates gamma-secretase-like proteolytic activation of Notch1.
Mol Cell 5 (2000) 197-206
- Muskavitch MA:
Delta-notch signaling and Drosophila cell fate choice.
Dev Biol 166 (1994) 415-430
- Oda T, Elkahloun AG, Pike BL, Okjama K, Krantz ID, Genin A, Piccoli DA, Meltzer PS, Spinner NB, Collins FS, Chandrasekharappa SC:
Mutations in the human *Jagged1* gene are responsible for Alagille syndrom.
Nat Genet 16 (1997) 235-242

- Okajima T, Irvine KD:
Regulation of notch signaling by o-linked fucose.
Cell 111 (2002) 893-904
- Orita M, Suzuki Y, Sekiya T, Hayashi K, Sekiya T:
Rapid and sensitive detection of point mutations and genetic polymorphisms using polymerase chain reaction.
Genomics 5 (1989) 874-879
- Orita M, Iwahana H, Kanzawa H, Hayashi K, Sekiya T:
Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms.
Proc Natl Acad Sci USA 86 (1989) 2766-2770
- Pajunen L, Jones TA, Goddard A, Sheer D, Solomon E, Pihlajaniemi T, Kivirikko KI:
Regional assignment of the human gene coding for a multifunctional polypeptide (P4HB) acting as the beta-subunit of prolyl 4-hydroxylase and the enzyme protein disulfide isomerase to 17q25.
Cytogenet Cell Genet 56 (1991) 165-168
- Panin VM, Papayannopoulos V, Wilson R, Irvine KD:
Fringe modulates Notch-ligand interactions.
Nature 387 (1997) 908-912
- Paznekas WA, Cunningham ML, Howard TD, Korf BR, Lipson MH, Grix AW, Feingold M, Goldberg R, Borochowitz Z, Aleck K, Mulliken J, Yin M, Jabs EW:
Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome, due to TWIST and FGFR mutations.
Am J Hum Genet 62 (1998) 1370-1380
- Pei Y:
Molecular genetics of autosomal dominant polycystic kidney disease.
Clin Invest Med 26 (2003) 252-258
- Pilia G, Uda M, Macis D, Frau F, Crisponi L, Balli F, Barbera C, Colombo C, Frediani T, Gatti R, Iorio R, Marazzi MG, Marcellini M, Musumeci S, Nebbia G, Vajro P, Ruffa G, Zancan L, Cao A, DeVirgili S:
Jagged-1 mutation analysis in Italian Alagille syndrome patients.
Hum Mutat 14 (1999) 394-400
- Raymond WR, Kearney JJ, Parmley VC:
Ocular findings in arteriohepatic dysplasia (Alagille's syndrome).
Arch Ophthalmol 107 (1989) 1077
- Reaume AG, Conlon RA, Zirngibl R, Yamaguchi TP, Rossant J:
Expression analysis of a Notch homologue in the mouse embryo.
Dev Biol 154 (1992) 377-387
- Rebay I, Fleming RJ, Fehon RG, Cherbas L, Cherbas P, Artavanis-Tsakonas S:
Specific EGF repeats of Notch mediate interactions with Delta and Serrate: implications for Notch as a multifunctional receptor.
Cell 67 (1991) 687-699
- Röpke A:
Molekulare Charakterisierung von Mutationen beim Alagille Syndrom.
Diplomarbeit 1998; Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, MLU Halle
- Röpke A, Kujat A, Gräber M, Giannakudis J, Hansmann I:
Identification of 36 novel Jagged1 (JAG1) mutations in patients with Alagille syndrome.
Hum Mutat 21 (2003) 100

- Rosenfield NS, Kelley MJ, Jensen PS, Cotlier E, Rosenfield AT, Riely CA:
Arteriohepatic dysplasia: radiologic features of a new syndrome.
AJR Am J Roentgenol 135 (1980) 1217-1223
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA:
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase.
Science 239 (1988) 487-491
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T:
Molecular cloning. A laboratory manual.
Second edition (1989), Cold Spring Harbor Press, New York.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR:
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.
Proc Natl Acad Sci U S A 74 (1977) 5463-5467
- Schnittger S, Hoefers C, Heidemann P, Beermann F, Hansmann I:
Molecular and cytogenetic analysis of an interstitial 20p deletion associated with syndromic
intrahepatic ductular hypoplasia (Alagille syndrome).
Hum Genet 83 (1989) 239-244
- Schroeter EH, Kisslinger JA, Kopan R:
Notch-1 signalling requires ligand-induced proteolytic release of intracellular domain.
Nature 393 (1998) 382-386
- Schweizer J, Marks F:
A developmental study of the distribution and frequency of Langerhans cells in relation to
formation of patterning in mouse tail epidermis.
J Invest Dermatol 69 (1977) 198-204
- Shi S, Stanley P:
Protein O-fucosyltransferase 1 is an essential component of Notch signaling pathways.
Proc Natl Acad Sci U S A 100 (2003) 5234-5239
- Shulman SA, Hyams JS, Gunta R, Greenstein RM, Cassidy SB:
Arteriohepatic dysplasia (Alagille syndrome): extreme variability among affected family
members.
Am J Med Genet 19 (1984) 325-332
- Strachan T, Read AP:
Molekulare Humangenetik.
Spektrum Akad. Verlag, Heidelberg, Berlin, Oxford (1996) 154-157
- Struhl G, Adachi A:
Nuclear access and action of notch in vivo.
Cell 93 (1998) 649-660
- Struhl G, Greenwald I:
Presenilin is required for activity and nuclear access of Notch in *Drosophila*.
Nature 398 (1999) 522-525
- Suggs SV, Wallace RB, Hirose T, Kawashima EH, Itakura K:
Use of synthetic oligonucleotides as hybridization probes: isolation of cloned cDNA sequences
for human beta 2-microglobulin.
Proc Natl Acad Sci U S A 78 (1981) 6613-6617
- Tamura K, Taniguchi Y, Minoguchi S, Sakai T, Tun T, Furukawa T, Honjo T:
Physical interaction between a novel domain of the receptor Notch and the transcription factor
RBP-J kappa/Su(H).
Curr Biol 5 (1995) 1416-1423

- Tax FE, Yeager JJ, Thomas JH:
Sequence of *C. elegans* lag-2 reveals a cell-signalling domain shared with Delta and Serrate of *Drosophila*.
Nature 368 (1994) 150-154
- Teebi AS, Murthy DS, Ismail EA, Redha AA:
Alagille syndrome with de novo del(20) (p11.2).
Am J Med Genet 42 (1992) 35-38
- Thelu J, Viallet JP, Dhouailly D:
Differential expression pattern of the three Fringe genes is associated with epidermal differentiation.
J Invest Dermatol 111 (1998) 903-906
- Turnpenny PD, Whittock N, Duncan J, Dunwoodie S, Kusumi K, Ellard S:
Novel mutations in DLL3, a somitogenesis gene encoding a ligand for the Notch signalling pathway, cause a consistent pattern of abnormal vertebral segmentation in spondylocostal dysostosis.
J Med Genet 40 (2003) 333-339
- Uyttendaele H, Marazzi G, Wu G, Yan Q, Sassoon D, Kitajewski J:
Notch4/int-3, a mammary proto-oncogene, is an endothelial cell-specific mammalian Notch gene.
Development 122 (1996) 2251-2259
- Van Tine BA, Knops J, Shaw GM, May WA:
Assignment of human MFNG, manic fringe *Drosophila* homolog, to 22q13.1 using tyramide fluorescence in situ hybridization (T-FISH).
Cytogenet Cell Genet 87 (1999) 132-133
- Venter JC, Adams MD, Myers EW, Li PW, Mural RJ, Sutton GG, Smith HO, Yandell M, Evans CA, Holt RA, Gokayne JD, Amanatides P et al:
The Sequence of the Human Genome.
Science 291 (2001) 1304-1351
- Watson GH, Miller V:
Arteriohepatic dysplasia. Familial pulmonary arterial stenosis with neonatal liver disease.
Arch Dis Child 48 (1973) 459-466
- Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G:
A homolog of *Drosophila* Notch expressed during mammalian development.
Development 113 (1991) 199-205
- Weinmaster G, Roberts VJ, Lemke G:
Notch2: a second mammalian Notch gene.
Development 116 (1992) 931-941
- Weinmaster G:
Notch signal transduction: a real rip and more.
Curr Opin Genet Dev 10 (2000) 363-369
- Wettstein DA, Turner DL, Kintner C:
The *Xenopus* homolog of *Drosophila* Suppressor of Hairless mediates Notch signaling during primary neurogenesis.
Development 124 (1997) 693-702
- Ye Y, Lukinova N, Fortini ME:
Neurogenic phenotypes and altered Notch processing in *Drosophila* Presenilin mutants.
Nature 398 (1999) 525-529

Yuan YP, Schultz J, Mlodzik M, Bork P:

Secreted Fringe-like signaling molecules may be glycosyltransferases.

Cell 88 (1997) 9-11

Yuan ZR, Okaniwa M, Nagata I, Tazawa Y, Ito M, Kawarazaki H, Inomata Y, Okano S, Yoshida T, Kobayashi N, Kohsaka T.

The DSL domain in mutant JAG1 ligand is essential for the severity of the liver defect in Alagille syndrome.

Clin Genet 59 (2001) 330-337

Yuan ZR, Kohsaka T, Ikegaya T, Suzuki T, Okano S, Abe J, Kobayashi N, Yamada M:

Mutational analysis of the Jagged 1 gene in Alagille syndrome families.

Hum Mol Genet 7 (1998) 1363-1369

Zhang F, Deeuze JF, Aurias A, Dutillaux AM, Hugon RN, Alagille D, Thomas G, Hadchouel M: Interstitial deletion of the short arm of chromosome 20 in arteriohepatic dysplasia (Alagille syndrome).

J Pediat 116 (1990) 73-77

Zhang N, Gridley T:

Defects in somite formation in lunatic fringe deficient mice.

Nature 394 (1998) 374-377

Zhang N, Norton CR, Gridley T:

Segmentation defects of Notch pathway mutants and absence of a synergistic phenotype in lunatic fringe/radical fringe double mutant mice.

Genesis 33 (2002) 21-28

7. Thesen

1. Das *Alagille*-Syndrom (AGS) geht mit Erkrankungen des Gallengangsystems, sowie Defekten im kardiovaskulären System, im Skelettsystem, im Auge und im Gesicht einher. Es betrifft etwa eines von 70.000 Lebendgeborenen und stellt somit eine der häufigsten Ursachen für angeborene chronische Lebererkrankungen dar.
2. *JAG1* wurde als Kandidatengen des *Alagille*-Syndroms identifiziert. Es befindet sich auf dem kurzen Arm von Chromosom 20 (20p12). Zahlreiche Mutationen innerhalb des *JAG1*-Gens wurden bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom beschrieben.
3. Nur bei 60-65% der Patienten mit *Alagille*-Syndrom lassen sich mit den gängigen Suchmethoden Mutationen im *JAG1*-Gen nachweisen.
4. Es wird genetische Heterogenität bei der Entstehung des *Alagille*-Syndrom diskutiert.
5. *JAG1* stellt einen Bestandteil der sehr komplexen *Notch*-Signalkaskade dar. Die Produkte der drei humanen *Fringe*-Gene (*Lunatic*-, *Radical*-, *Manic-Fringe*-Gen) regulieren direkt die Wirkung des *JAG1*-Proteins innerhalb der *Notch*-Signalkaskade und können als potentielle Kandidatengene des *Alagille*-Syndroms betrachtet werden.
6. Es lassen sich Polymorphismen ohne Krankheitswert im Bereich der drei humanen *Fringe*-Gene bei Patienten mit *Alagille*-Syndrom nachweisen.
7. Das *Alagille*-Syndrom ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht mit pathogenen Veränderungen im Bereich der drei *Fringe*-Gene assoziiert.

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name: Ursula Irmgard Böhm
Geburtsdatum, -ort: 12. November 1975 in Esslingen am Neckar
Familienstand: ledig, 2 Kinder

Schulbildung

1982 – 1986 Grundschohle Markt Einersheim
1986 – 1993 Armin-Knab-Gymnasium Kitzingen
1993 – 1994 Aufenthalt als Gastschülerin in Campina Grande, Brasilien
1994 – 1996 Armin-Knab-Gymnasium Kitzingen
1996 Abitur

Studium

Okt. 1996 Beginn des Studiums der Humanmedizin an der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg
Sep. 1998 Physikum
Sep. 1999 1. Staatsexamen
Nov. 1999 – Sep. 2000 Experimentelle Arbeiten zur Dissertation am Institut für Humangenetik und medizinische Biologie an der MLU in Halle
Okt. 2000 – Sep. 2001 Beurlaubung vom Studium, Elternzeit
Sep. 2002 2. Staatsexamen
Okt. 2002 – Aug. 2003 Praktisches Jahr
Innere Medizin: BG Kliniken Bergmannstrost Halle
Kinder- und Jugendpsychiatrie: St. Barbara-KH Halle
Chirurgie: Diakonie-Krankenhaus Halle
Nov. 2003 3. Staatsexamen
seit Feb. 2004 Elternzeit

Selbständigkeitserklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit eigenständig und nur unter Verwendung der angegebenen Quellen angefertigt habe.

Die Arbeit wurde bisher an keiner anderen Hochschule oder Universität vorgelegt.

Halle (Saale), den 1.4.2004

Danksagung:

Bei Herrn Prof. I. Hansmann möchte ich mich herzlich für die Überlassung des Themas und vor allem für sein Engagement bei der Fertigstellung dieser Arbeit bedanken.

Dr. Joannis Giannakudis danke ich für die Einarbeitung in die molekularbiologischen Methoden, für die Zeit, die er sich immer nahm, wenn ich seine Hilfe benötigte, sowie für das angenehme Arbeitsklima im Labor.

Mein Dank gilt außerdem Frau Mechthild Gräber, die mir Hilfestellungen im Laboralltag leistete.

Bei Frau Karin Strahl bedanke ich mich für ihre stete organisatorische Unterstützung.

Herrn Dr. Kaltenborn danke ich für die freundliche Zusammenarbeit bei den Sequenzanalysen.

Außerdem möchte ich mich bei allen hier nicht namentlich aufgeführten Mitarbeitern des Institutes für Humangenetik und medizinische Biologie bedanken, welche mir auf verschiedene Art und Weise bei der Durchführung dieser Arbeit behilflich waren.

Bei meinen Eltern möchte ich mich für ihre moralische und finanzielle Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten Johannes Eyer, welcher mir während der Fertigstellung dieser Arbeit den Rücken freigehalten hat.

Ganz herzlichen Dank auch meinem Sohn Joshua, der wegen dieser Arbeit oft auf mich verzichten musste.