

Aus der Universitätsklinik und Poliklinik für Kinder- und Jugendmedizin  
der Medizinischen Fakultät der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

(komm. Direktor: PD Dr. med. Roland Haase)

# **Charakterisierung von *ALMS1* (*Alstrom syndrome 1*)-Transkripten in Hodgkin-Lymphom-Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin (Dr. med.)

vorgelegt

der Medizinischen Fakultät

der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg

von Katarina Braune

geboren am 10.05.1989 in Halle (Saale)

Betreuer: apl. Prof. Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger

Gutachter: 1. apl. Prof. Dr. rer. nat., rer. medic. habil. Martin S. Staeger

2. apl. Prof. Dr. med. Carl Friedrich Classen, Universitätsmedizin Rostock

3. Prof. Dr. med. Carsten Müller-Tidow

14.06.2016

17.02.2017

## Referat

Mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von über 90 % weist das Hodgkin-Lymphom eine der besten Prognosen aller kindlichen Malignome auf. In einigen Fällen ist die Behandlung jedoch aufgrund von Resistenzen gegenüber den eingesetzten Zytostatika erfolglos. Weiterhin ist die konventionelle Krebstherapie mit zahlreichen Nebenwirkungen verbunden. Krebserkrankungen liegen oft spezifische genetische Veränderungen zu Grunde liegen. Um Kandidatengene für neue, gezielte Therapieverfahren zu identifizieren, müssen die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und -progression sowie die Entstehung von Resistenzmechanismen näher untersucht werden.

Das *ALMS1* (*Alstrom syndrome 1*)-Gen, ein außerordentlich großes, krankheitsassoziierten Gen des menschlichen Genoms mit bislang noch nicht hinreichend bekannter Funktion, könnte ein mögliches Kandidatengen für die Therapie von Hodgkin-Lymphomen darstellen. Es wird vermutet, dass *ALMS1* als Bestandteil des Zentrosoms an intrazellulären Transportvorgängen, der Ziliogenese sowie an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist. Aufbauend auf DNA-Microarray-Daten zur differentiellen Expression von Genen in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien wurde in dieser Arbeit die Expression von *ALMS1* mittels konventioneller Polymerasekettenreaktion (PCR) und quantitativer PCR (qRT-PCR) untersucht. Weiterhin wurden die *ALMS1*-Transkripte vollständig sequenziert und auf Polymorphismen und Spleißvarianten hin untersucht. Dabei konnten neue Transkriptvarianten identifiziert werden.

Sowohl die Ergebnisse der qRT-PCR, als auch die DNA-Microarray-Analysen zeigten, dass *ALMS1* in den in Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu gesundem testikulären Gewebe vermindert exprimiert wird. Insbesondere die chemoresistente Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-428 wies bei diesen Untersuchungen im Vergleich zu den chemosensitiven Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und gesunden Zellen des peripheren Blutes in der qRT-PCR geringere Expressionsraten auf. Daher könnte die verminderte Expression von *ALMS1* als möglicherweise proapoptotischem Gen nicht nur zur Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms in der Funktion eines Tumorsuppressorgens beitragen, sondern kommt auch als möglicher Faktor in der Entwicklung von Chemoresistenzen in Frage. Diese Ergebnisse können als Grundlage für weiterführende Untersuchungen und mögliche neue Therapieansätze in der Krebstherapie dienen.

Braune, Katarina: Charakterisierung von *ALMS1* (*Alstrom syndrome 1*)-Transkripten in Hodgkin-Lymphom-Zellen, Halle (Saale), Univ., Med. Fak., Diss., 80 Seiten, 2016

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IX</b>
<b>1. Einführung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Das Hodgkin-Lymphom .....	1
1.1.1 Häufigkeit.....	1
1.1.2 Ätiologie .....	1
1.1.3 Klinik.....	2
1.1.4 Diagnose.....	2
1.1.5 Therapie und Prognose .....	3
1.1.6 Gezielte Krebstherapie versus konventionelle Radio-chemotherapie .....	4
1.2 Bedeutung des <i>ALMS1 (Alstrom syndrome 1)</i> -Gens.....	6
1.3 Das Alström-Syndrom.....	10
1.3.1 Ätiologie .....	10
1.3.2 Häufigkeit.....	11
1.3.3 Klinik.....	11
1.3.4 Diagnose.....	12
1.3.5 Therapie und Prognose .....	13
<b>2. Zielstellung .....</b>	<b>14</b>
<b>3. Material und Methodik .....</b>	<b>15</b>
3.1 Material.....	15
3.1.1 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial.....	15
3.1.2 Verwendete Zelllinien und Gewebe .....	17
3.1.3 Primer.....	18
3.2 Methoden.....	20
3.2.1 Zellkultur .....	20
3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	21
3.2.3 Isolation von RNA.....	21
3.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	22
3.2.5 Synthese komplementärer DNA (cDNA).....	22
3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	22
3.2.7 SMART-RACE .....	23
3.2.8 Agarosegelelektrophorese .....	24
3.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen .....	25
3.2.10 Sequenzierung von cDNA.....	25

3.2.11	Quantitative real-time PCR.....	25
3.2.12	DNA-Microarray-Analyse .....	26
3.2.13	Datenbanken und Analysewerkzeuge .....	27
<b>4.</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>28</b>
4.1	Vollständige Sequenzierung der <i>ALMS1</i> -Transkripte in L-1236-Zellen .....	28
4.2	Identifizierung neuer <i>ALMS1</i> -Transkriptvarianten.....	31
4.2.1	Alternativer Transkriptionsstart .....	32
4.2.2	<i>Skipping</i> von Exon 13 .....	35
4.2.3	<i>Alternative 5'-splice sites</i> von Exon 23 .....	37
4.3	Analyse von Polymorphismen .....	39
4.4	<i>Microarray</i> -Daten zu <i>ALMS1</i> .....	42
4.5	Untersuchung der differentiellen Genexpression mittels qRT-PCR.....	49
<b>5.</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>52</b>
5.1	<i>ALMS1</i> – ein möglicher Tumorsuppressor?.....	52
5.2	<i>Microarray</i> -Daten.....	53
5.3	Konnten neue Transkriptvarianten von <i>ALMS1</i> gefunden werden? .....	53
5.4	Epigenetische Regulation von Tumorsuppressorgenen als möglicher therapeutischer Ansatz .....	55
<b>6.</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>56</b>
<b>7.</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>58</b>
<b>8.</b>	<b>Anhang .....</b>	<b>65</b>
8.1	<i>ALMS1</i> -Transkripte mit Bindungsstellen der verwendeten Primer und Polymorphismen .....	65
8.2	<i>ALMS1</i> -Protein.....	68
8.3	DNA-Microarray-Daten .....	69
8.4	DNA-Microarray-Target-Sequenzen mit Bindungsstellen der verwendeten Primer .....	73
8.5	PCR-Amplifikate .....	74

**Lebenslauf**

**Selbstständigkeitserklärung**

**Erklärung über frühere Promotionsversuche**

**Danksagung**

## Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Chromosomale Lokalisation von <i>ALMS1</i> und dessen Exon-Intron-Struktur. ....	7
Abbildung 2: Schematische Darstellung des menschlichen <i>ALMS1</i> -Proteins.....	8
Abbildung 3: Mögliche Funktion des <i>ALMS1</i> -Proteins. ....	9
Abbildung 4: Symptomatik des Alström-Syndroms.....	12
Abbildung 5: PCR-Produkte verschiedener Transkriptabschnitte aus <i>ALMS1</i> .....	29
Abbildung 6: PCR-Produkte verschiedener Transkriptabschnitte aus <i>ALMS1</i> .....	30
Abbildung 7: Im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Transkriptvarianten von <i>ALMS1</i> - Transkripten in L-1236-Zellen. ....	31
Abbildung 8: PCR-Produkt der Spleißvariante ohne Exon 2. ....	32
Abbildung 9: Sequenzergebnis der Spleißvariante 1 ohne Exon 2. ....	33
Abbildung 10: PCR-Produkt der Spleißvariante mit Exon 2.....	33
Abbildung 11: Sequenzergebnis der Spleißvariante mit Exon 2. ....	33
Abbildung 12: Promoteranalyse des Bereichs vor Exon 1.....	34
Abbildung 13: Promoteranalyse des Bereichs vor Exon 2.....	34
Abbildung 14: PCR-Produkte der Spleißvarianten mit und ohne Exon 13.....	35
Abbildung 15: Sequenzergebnis der Spleißvariante mit Exon 13. ....	35
Abbildung 16: Sequenzergebnis der Spleißvariante ohne Exon 13. ....	36
Abbildung 17: PCR-Produkte der Spleißvarianten mit und ohne Exon 13 in verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und gesunden Geweben. ....	36
Abbildung 18: PCR-Produkt der Spleißvarianten mit alternativen 5'- <i>splice sites</i> von Exon 23. ....	37
Abbildung 19: Sequenzergebnis Spleißvariante mit vollem Exon 23 und Intron 23.....	37
Abbildung 20: Sequenzergebnis Spleißvariante mit verkürztem Exon 23. ....	38

Abbildung 21: PCR-Produkte der Spleißvarianten mit alternativen 5'- <i>splice sites</i> von Exon 23 in verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und gesunden Geweben.....	38
Abbildung 22: Histogramm des SNP rs191091347. ....	39
Abbildung 23: Histogramm des SNP rs377283762. ....	40
Abbildung 24: Histogramm des SNP rs2037814. ....	40
Abbildung 25: Histogramm des SNP rs7598901. ....	41
Abbildung 26: Histogramm des SNP rs2056486. ....	41
Abbildung 27: Histogramm des SNP rs1052161. ....	42
Abbildung 28: Histogramm des SNP rs6546856. ....	42
Abbildung 29: Lokalisation der Target-Sequenzen der zur DNA- <i>Microarray</i> -Analyse verwendeten SONDENSÄTZE in <i>ALMS1</i> .....	43
Abbildung 30: PCR-Produkte der Exons 20 bis 23. ....	44
Abbildung 31: Signalstärken verschiedener Gewebe im DNA- <i>Microarray</i> , SONDENSÄTZ 214707_x_at.....	45
Abbildung 32: Signalstärken verschiedener Gewebe im DNA- <i>Microarray</i> , SONDENSÄTZ 1556911_at.....	46
Abbildung 33: Signalstärken verschiedener Gewebe im DNA- <i>Microarray</i> , SONDENSÄTZ 214220_s_at.....	47
Abbildung 34: Signalstärken verschiedener Gewebe im DNA- <i>Microarray</i> , SONDENSÄTZ 214221_at.....	48
Abbildung 35: Quantitative Analyse von <i>ALMS1</i> mittels qRT-PCR.....	50
Abbildung 36: Quantitative Analyse mittels qRT-PCR.....	50
Abbildung 37: Quantitative Analyse von <i>ALMS1-IT</i> mittels qRT-PCR.....	51
Abbildung 38: Gesamt-mRNA-Sequenz von <i>ALMS1</i> aus der Zelllinie L-1236. ....	68
Abbildung 39: Gesamtproteinsequenz von <i>ALMS1</i> aus der Zelllinie L-1236. ....	69
Abbildung 40: PCR-Produkte der Positivkontrolle mit für <i>ACTB</i> spezifischen Primern unter Verwendung von cDNA aus verschiedenen Geweben. ....	79

Abbildung 41: PCR-Produkte der Positivkontrolle mit für *ACTB* spezifischen Primern unter Verwendung von cDNA aus verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, PBMC und anderen Geweben..... 79

## Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer. ....	18
Tabelle 2: Überblick über die in L-1236-Zellen vorliegenden <i>ALMS1</i> -Exons anhand von Sequenzierungsergebnissen.....	30
Tabelle 3: <i>Splice site prediction scores</i> der Bereiche mit Spleißvarianten in <i>ALMS1</i> . ....	32
Tabelle 4: Microarraydaten zur Analyse der Genexpression. ....	69



## Abkürzungsverzeichnis

Allgemeine Abkürzungen, Chemikalien und Maßeinheiten	
°C	Grad Celsius
%	Prozent
HTR6	5-Hydroxytryptamin-Rezeptor-6
aa	Aminosäuren
Abb.	Abbildung
<i>ACTB</i>	$\beta$ -Aktin
AG	Arbeitsgruppe
<i>ALMS1</i>	<i>Alstrom syndrome 1</i>
<i>ALMS1-IT</i>	<i>ALMS1 intronic transcript</i>
bp	Basenpaare
ca.	<i>circa</i>
CAGE	<i>cap analysis of gene expression</i>
cDNA	<i>complementary deoxyribonucleic acid</i>
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
C <sub>T</sub>	<i>threshold cycle</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>deoxyribonucleic acid</i>
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen
DTT	Dithiothreitol
EBV	Epstein-Barr-Virus
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
<i>et al.</i>	<i>et alii</i>
FATS	<i>fragile-site associated tumor suppressor</i>
FCS	<i>fetal calf serum</i>
g	Erdbeschleunigung
h	Stunde(n)
H <sub>2</sub> O	Wasser
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HPLC	<i>high performance liquid chromatography</i>
l	Liter
m	Milli

M	Molar
MCHR1	Melaninkonzentrierendes Hormon (MCH)-Rezeptor
MgCl <sub>2</sub>	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mRNA	<i>messenger-RNA</i>
mTOR	<i>mechanistic target of rapamycin</i>
n	Nano
NaCl	Natriumchlorid
NaOAc	Natriumacetat
NBA	<i>normal body atlas</i>
NCBI	National Center for Biotechnology Information
OD	optische Dichte
Oligo-dT	Oligo-Desoxythymidin
OMIM	<i>online mendelian inheritance in man</i>
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i> (negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Konzentration in wässriger Lösung)
qRT-PCR	quantitative <i>real time</i> -PCR
RFX	<i>regulatory factor X</i>
RNA	<i>ribonucleic acid</i>
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SSTR3	Somatostatinrezeptor 3
TAE	Tris-Acetat-EDTA
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TSS	<i>transcription start sites</i>
UV	Ultraviolett
V	Volt
v/v	<i>volume in volume</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
ZMG	Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung

Symbole der Aminosäuren		
A	Ala	Alanin
C	Cys	Cystein
D	Asp	Asparaginsäure
E	Glu	Glutaminsäure
F	Phe	Phenylalanin
G	Gly	Glycin
H	His	Histidin
I	Ile	Isoleucin
K	Lys	Lysin
L	Leu	Leucin
M	Met	Methionin
N	Asn	Asparagin
P	Pro	Prolin
Q	Gln	Glutamin
R	Arg	Arginin
S	Ser	Serin
T	Thr	Threonin
V	Val	Valin
W	Trp	Tryptophan
Y	Tyr	Tyrosin

Symbole der Nukleinbasen	
A	Adenin
C	Cytosin
G	Guanin
T	Thymin
U	Uracil

# 1. Einführung

## 1.1 Das Hodgkin-Lymphom

1832 erfolgte die Erstbeschreibung der Lymphogranulomatose durch den britischen Arzt und Pathologen Sir Thomas Hodgkin, die ihm zu Ehren heutzutage als Hodgkin-Lymphom oder Morbus Hodgkin bezeichnet wird (Hodgkin, 1832). Das Hodgkin-Lymphom zählt zu den in Lymphknoten entstehenden Krebserkrankungen, die vorwiegend auf einer B-Zell-Neoplasie basieren (Küppers *et al.*, 1994), jedoch in seltenen Fällen auch aus T-Lymphozyten hervorgehen können (Müschen *et al.*, 2000). Zu den neoplastischen monoklonalen B-Lymphozyten im betroffenen lymphatischen Gewebe zählen neben den Hodgkin-Zellen sogenannte Reed-Sternberg-Zellen, welche das Hodgkin-Lymphom gegenüber dem Non-Hodgkin-Lymphom abgrenzen (Kanzler *et al.*, 1996). Die malignen Zellen sind im betroffenen lymphatischen Gewebe mit einem Anteil von 0,1 bis 1 % in der Zellpopulation nur in geringer Zahl vertreten. Es können sämtliche Lymphknotenstationen betroffen sein, von denen aus sich die Erkrankung dann über das lymphatische System ausbreitet. Nach den Bestimmungen der *World Health Organization* (WHO) wird zwischen dem klassischen (ca. 95 %) und dem nodulären Lymphozyten-prädominanten Hodgkin-Lymphom unterschieden, welches sich klinisch, morphologisch und immunphänotypisch von den klassischen Hodgkin-Lymphomen unterscheidet und eine eigenständige Entität darstellt.

### 1.1.1 Häufigkeit

Das Hodgkin-Lymphom ist eine seltene Erkrankung, von der in Deutschland etwa 2 bis 3 pro 100.000 Einwohner betroffen sind (Zentrum für Krebsregisterdaten, 2013). Es sind in Deutschland etwa 0,6 von 100.000 Kindern unter 15 Jahren erkrankt, wobei Jungen etwa 1,5 mal häufiger erkranken als Mädchen (Deutsches Kinderkrebsregister, 2014). Während die Inzidenz des Non-Hodgkin-Lymphoms mit steigendem Alter kontinuierlich zunimmt, bestehen beim Hodgkin-Lymphom zwei Häufigkeitsgipfel, die sich jedoch beide jenseits des Kindesalters befinden: Zwischen dem 20. und 30. sowie nach dem 65. Lebensjahr (MacMahon, 1966; Punnett *et al.*, 2010).

### 1.1.2 Ätiologie

Die Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms ist zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend geklärt. Als mögliche Ursachen werden neben genetischen Faktoren und Umwelteinflüssen auch eine Suppression des Immunsystems, sowie onkogene Viren wie das Epstein-Barr-Virus (EBV) diskutiert (Weiss, 2000; Kapatai und Murray, 2007; Maggioncalda *et al.*, 2011). Ein signifikanter Anteil von Hodgkin-Lymphom-Zellen ist mit dem EBV infiziert (Weiss *et al.*, 1991), wobei regionale Häufigkeitsunterschiede bestehen. Während in Industrieländern in 20

bis 50 % der getesteten Hodgkin-Lymphom-Zellen DNA des Epstein-Barr-Virus nachgewiesen werden konnte, war dies in Entwicklungsländern sogar in bis zu 100 % der Fall (Weinreb *et al.*, 1996). Weiterhin begünstigt eine Immunsuppression, z. B. als Folge einer Infektion mit dem Humanen Immundefizienz-Virus (HIV) (Franceschi *et al.*, 1999) oder im Rahmen einer immunsuppressiven Therapie nach Transplantation von Organen, Stammzellen oder Knochenmark, das Auftreten von Hodgkin-Lymphomen (Clarke *et al.*, 2013).

### 1.1.3 Klinik

Häufiges Erstsymptom eines Hodgkin-Lymphoms ist eine schmerzlose, derbe Lymphknotenschwellung, die am häufigsten im zervikalen Bereich in Erscheinung tritt. Mediastinale, axilläre, abdominale oder inguinale Lymphknoten können ebenfalls betroffen sein (Roth *et al.*, 1998). Allgemeinsymptome sind zum Zeitpunkt der Erstdiagnose selten. Nur bei einem Viertel der Patienten bestehen, entsprechend der Ann-Arbor-Klassifikation für maligne Lymphome, sogenannte „B-Symptome“, wobei ältere Patienten und Patienten in einem fortgeschrittenen Erkrankungsstadium mit einem ausgedehnten Befall häufiger betroffen sind. Die B-Symptomatik ist charakterisiert durch Fieber über 38 °C ohne erkennbare Ursache mit wechselndem Verlauf, ein Gewichtsverlust von mehr als 10 % in weniger als 6 Monaten, sowie das Auftreten von Nachtschweiß (Carbone *et al.*, 1971). Durch ihr verdrängendes Wachstum können Hodgkin-Lymphome zu Kompressionserscheinungen an benachbarten Organen führen. So kann beispielsweise ein mediastinales Lymphom zu Beschwerden wie Husten und Dyspnoe führen, während intraabdominale Lymphome Harnleiterobstruktionen verursachen können. Aufgrund der unkontrollierten und ungehinderten Vermehrung von Tumorzellen im lymphatischen System wird das Immunsystem im Krankheitsverlauf stark beeinträchtigt, wodurch bakterielle, virale durch Pilze hervorgerufene Infektionen vermehrt auftreten können. Bei disseminiertem Befall und dem Befall extralymphatischer Organe kann es außerdem zu Knochenschmerzen und -frakturen, sowie einer Hepatomegalie mit daraus resultierendem Oberbauchschmerz kommen. Die klinische Stadieneinteilung des Hodgkin-Lymphoms erfolgt nach der Ann-Arbor-Klassifikation nach der Lokalisation und Anzahl der befallenen Lymphknoten (Carbone *et al.*, 1971).

### 1.1.4 Diagnose

Die Diagnose wird nach ausführlicher Anamnese und klinischer sowie labordiagnostischer Untersuchung durch eine Lymphknotenexstirpation und anschließende histologische Aufbereitung gesichert. Da Verteilung und Ausdehnung des Lymphknotenbefalls einen wesentlichen prognostischen Faktor darstellen, kommt dem sogenannten *staging* besondere

Bedeutung zu: Durch eine ausführliche Anamnese und körperliche Untersuchung, bildgebende Verfahren sowie Knochenmarks- und Liquoruntersuchungen wird die Frage geklärt, welche Lymphknotenstationen bzw. Organe betroffen sind (Ansell, 2014). Differenzialdiagnostisch sind andere Malignome, vor allem Non-Hodgkin-Lymphome und Leukämien sowie Infektionserkrankungen zu erwägen. Hierbei lassen sich bereits palpatorisch Unterschiede feststellen: Infektionsbedingt vergrößerte Lymphknoten sind weich, druckdolent und gut verschieblich, während die Lymphknotenschwellung bei Morbus Hodgkin eher von derber Konsistenz ist, bei der Palpation schmerzlos bleibt und sich nur teilweise von der Umgebung abgrenzen lässt (Karnath, 2005).

### 1.1.5 Therapie und Prognose

Die 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit für Hodgkin-Lymphome im Kindesalter beträgt über 90 %. Damit weist das Hodgkin-Lymphom eine der besten Prognose aller kindlichen Malignome auf (Körholz *et al.*, 2004; Zentrum für Krebsregisterdaten, 2013). Vor diesem Hintergrund ist erklärlich, dass bei allen Patienten primär eine kurative Zielsetzung verfolgt werden sollte.

Die Therapie richtet sich dabei nach dem Stadium der Erkrankung. Es wird in der Regel eine kombinierte Chemo- und Radiotherapie angewandt. Hodgkin-Lymphome reagieren meist sehr sensibel auf beide dieser Verfahren. Chirurgische Maßnahmen zeigen keinen kurativen Effekt und werden daher nur im Rahmen der Diagnostik durchgeführt. Im Rahmen einer Chemotherapie werden mehrere Zytostatika mit zytotoxischem oder wachstumshemmendem Effekt miteinander kombiniert. Die Therapie wird unmittelbar nach Diagnosestellung begonnen. Die weitere zeitliche Abfolge und Dosierung richtet sich nach internationalen Therapieprotokollen. Ein wichtiger Prognosefaktor ist dabei das Ansprechen auf die initiale Chemotherapie. Die Radiotherapie stellt heutzutage nur noch eine Ergänzung zur Chemotherapie dar und beinhaltet die lokal begrenzte Bestrahlung betroffener Lymphknoten (Ansell, 2014). Unter einer ergänzenden Supportivtherapie versteht man die Prophylaxe und gegebenenfalls Therapie infektiöser Komplikationen wie beispielsweise eine Pneumokokkenimpfung vor Laparotomie, eine Penicillinprophylaxe nach Bestrahlung oder Entfernung der Milz, sowie die Bestrahlung von Transfusionsprodukten, um eine *Graft-versus-Host*-Reaktion durch Zerstörung immunkompetenter Zellen zu vermeiden (Ansell, 2014). Kommt es innerhalb der ersten drei Monate nach Therapiebeginn zu einer weiteren Ausbreitung der Erkrankung, wird dies als Progress bezeichnet und ist mit einer schlechten Prognose assoziiert (Bonfante *et al.*, 1997). Wird nach mehr als drei Monaten in Remission die Diagnose erneut gestellt, liegt ein Rezidiv vor, wobei zwischen einem innerhalb von 3 bis 12 Monaten auftretenden Frührezidiv und einem nach mehr als 12 Monaten auftretenden Spätrezidiv unterschieden wird. Nach aktuellen Standards wird bei Auftreten eines Rezidivs

---

eine Hochdosis-Chemotherapie mit anschließender autologer Stammzelltransplantation durchgeführt (Ansell, 2014). Nach wiederholten Rezidiven oder bei Nichtansprechen auf die Polychemo- und Radiotherapie kann eine allogene Stammzelltransplantation über eine Stammzellspende erwogen werden, was in der Therapie des Hodgkin-Lymphoms jedoch noch zu den experimentellen Verfahren zählt. Weitere experimentelle Ansätze für die Therapie von wiederholten Rezidiven stellt der Einsatz des CD30-Antikörpers Brentuximab dar (Younes *et al.*, 2010). Zielmolekül ist das auf den malignen Reed-Sternberg-Zellen exprimierte Oberflächenmolekül CD30. Zu den weiteren in Erprobung befindlichen Medikamenten zählen Histon-Deacetylase-Inhibitoren (Younes *et al.*, 2011; 2012), mTOR (*mechanistic target of rapamycin*)-Inhibitoren (Johnston *et al.*, 2010) und immunmodulatorische Substanzen (Fehninger *et al.*, 2011). Führt dies ebenfalls zu keiner Verbesserung, kann eine milde Chemotherapie als palliative Therapie angewendet werden, um ein Fortschreiten der Erkrankung einzudämmen (Ansell, 2014).

### **1.1.6 Gezielte Krebstherapie versus konventionelle Radiochemotherapie**

Die Entwicklung der Chemotherapie stellt einen bedeutenden Meilenstein in der Geschichte der Medizin dar und führte zu einer erheblichen Verbesserung der Prognose sämtlicher maligner Erkrankungen, da eine Vielzahl der malignen Tumoren und Systemerkrankungen auf eine Therapie mit Zytostatika anspricht (Creutzig *et al.*, 2003). Jedoch ist die konventionelle Radiochemotherapie mit vielen Nebenwirkungen verbunden. Zu den akuten Nebenwirkungen zählen unter anderem Übelkeit und Erbrechen, Haarausfall und Blutbildveränderungen. Diese können direkt nach der Behandlung, aber auch erst Jahre später in Erscheinung treten (Planderleith, 1990). Durch die Toxizität der Chemotherapie kann es darüber hinaus zu schwerwiegenden Folgeschäden, sowie Zweitmalignomen, wie Leukämien, Non-Hodgkin-Lymphomen und Bronchialkarzinomen, kommen (van Leeuwen *et al.*, 1994). Durch neue Forschungsansätze wird daher vor allem versucht, Nebenwirkungen zu reduzieren, die Prognose der Langzeitschäden zu verbessern sowie durch neue Therapieansätze dem Patientenkollektiv zu helfen, welches durch bisherige Methoden nicht geheilt werden kann. In einigen Fällen bleibt die Behandlung jedoch erfolglos, da Resistenzen gegenüber den angewendeten Chemotherapeutika vorliegen, die den Therapieerfolg verhindern oder die Therapie von Rezidiven erschweren. Daher wird in der klinischen Forschung intensiv nach möglichen Resistenzfaktoren gesucht, die mögliche Ansätze für neue, gezieltere Therapieverfahren darstellen. Zu den Angriffspunkten dieser Therapieverfahren zählen Signalmoleküle zur Regulation der Zellproliferation und Apoptose, Wachstumsfaktoren sowie die Angiogenese fördernde Moleküle (Chabner und Roberts, 2005). Da viele dieser Signaltransduktionswege in Krebszellen gestört sind, versucht man,

Methoden zu entwickeln, welche diese molekularen Defekte beheben. Zu diesem Zweck können auf genetischer oder chemischer Grundlage Proteine in Abhängigkeit ihrer gestörten Aktivität entweder inhibiert oder verstärkt werden. Das Verfahren richtet sich dabei nach der Lokalisation des Zielproteins. Beispielsweise können Proteine, welche an der Zelloberfläche exprimiert oder in den interzellulären Raum sezerniert werden, durch Antikörper blockiert und damit in ihrer Wirkung inhibiert werden. Ein Beispiel stellt der gegen das Oberflächenantigen CD20 gerichtete Antikörper Rituximab® in der Therapie von Non-Hodgkin-Lymphomen dar (Davis *et al.*, 2000). Ein zusätzlicher Ansatzpunkt in der Immunotherapie ist die Entwicklung von Vakzinen gegen tumorspezifische Antigene (Kirkwood *et al.*, 2012). Zu weiteren therapeutischen Strategien zählen der gezielte Transport von Wirkstoffen zu Tumorzellen, wie sie beispielsweise bei Toxin-gekoppelten Antikörpern und chimären Proteinen Anwendung findet (Eaviri *et al.*, 2004), sowie *small molecule inhibitors*, wie zum Beispiel der Tyrosinkinase-Inhibitor Imatinib® in der Therapie der chronisch-myeloischen Leukämie (Moen *et al.*, 2007). Weiterhin kann auf Transkriptionsebene die Expression bestimmter Gene gezielt verhindert werden. Dabei werden z. B. durch *antisense oligonucleotides*, welche komplementäre Sequenzen zur mRNA des jeweiligen Zielproteins enthalten, RNA-Doppelstränge gebildet, welche anschließend abgebaut und die Expression des jeweiligen Gens somit verhindert wird (Wacheck und Zangemeister-Wittke, 2006).

Um krebsspezifische Expressionsprofile und somit mögliche Kandidatengene für neue Therapiemethoden zu identifizieren, werden unter anderem DNA-*Microarray*-Analysen genutzt. Zur Identifikation Hodgkin-Lymphom-assoziiierter Veränderungen der Genexpression wurden vorausgegangenen Arbeiten mittels einer solchen DNA-*Microarray*-Analyse (Affymetrix HG-U133A-Arrays) Genexpressionsprofile von Hodgkin-Lymphom-Zelllinien mit normalen Gewebeproben unterschiedlicher Herkunft (*normal body atlas* [NBA]) verglichen. Dabei wurden bestimmte Gene in Hodgkin-Lymphom-Zellen in signifikant höherem bzw. niedrigerem Maß exprimiert als in Zellen normalen Gewebes. Einige dieser Gene mit auffälliger differentieller Expression sind an der Regulation des Zellzyklus beteiligt (z.B. *CCND2*, *CDC45L*), andere sind Marker für hämatopoetische Zellen (z.B. *ENO1*, *IL21R*). Innerhalb der vier untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (L-1236, L-540, HDLM-2, KM-H2) war das Genexpressionsprofil mit Blick auf die veränderte Expression bestimmter Gene ähnlich, woraufhin ein möglicher Zusammenhang in Hinblick auf die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms vermutet wurde (Staege *et al.*, 2008). *ALMS1* wurde als ein in Hodgkin-Lymphom-Zellen im Vergleich zu normalem Gewebe vermindert exprimiertes Gen identifiziert. Weiterhin wurde von der Arbeitsgruppe (AG) Staege beobachtet, dass in Hodgkin-Lymphom-Zellen mindestens zwei verschiedene *ALMS1*-Transkriptvarianten



vorliegen, welche durch alternatives Spleißen entstehen. Des Weiteren wurde die Empfindlichkeit der unterschiedlichen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien gegenüber verschiedener Zytostatika untersucht, die in der Therapie des Hodgkin-Lymphoms eingesetzt werden (Cisplatin, Etoposid, Melphalan). Dabei zeigten L-540-Zellen die höchste und L-1236-Zellen die niedrigste Empfindlichkeit. Die Zelllinien KM-H2 und HDLM-2 wiesen eine mittlere Empfindlichkeit auf (Staege *et al.*, 2008). Weiterhin ist bekannt, dass die Zelllinie L-428 eine Resistenz gegenüber Cisplatin aufweist (Ritz 2010). Da die Zelllinie L-1236 Resistenzen gegenüber allen drei getesteten Chemotherapeutika aufzeigte, liegt nahe, dass Resistenzen nicht spezifisch gegenüber einzelnen Agenzien, sondern das Resultat genereller antiapoptotischer Mechanismen darstellen. Dies wird durch den Verdacht untermauert, dass Gene mit möglicher Beteiligung an antiapoptotischen Mechanismen (*IL13RA1*, *IL5RA*) nur in L-1236-Zellen exprimiert werden. Das Tumorentigen *PRAME*, welches ein ähnliches Expressionsprofil aufwies, wurde bereits in anderen Tumormodellen in Zusammenhang mit einer Zytostatikaresistenz gebracht (Foell *et al.*, 2008; Kewitz und Staege 2013). Bestimmte Gene (*MARCKS*, *CD40*) wiesen ein dem Profil professioneller antigenpräsentierender Zellen ähnliches Genexpressionsprofil auf, werden in chemoresistenten Zellen stark exprimiert und könnten daher eventuell als prognostischer Marker herangezogen werden (Staege *et al.*, 2008).

## 1.2 Bedeutung des *ALMS1* (*Alstrom syndrome 1*)-Gens

Das *Alstrom syndrome 1*-Gen (*ALMS1*) (Gene ID: 7840, *online mendelian inheritance in man* (OMIM)-Nummer: 606844) codiert ein ubiquitäres Protein mit bislang unbekannter Funktion. Vermutet wird, dass es für den Hörvorgang, die Gewichtsregulation, für die Herz-, Lungen-, Nieren- und Leberfunktion sowie für die Regulation der Insulinsekretion von Bedeutung ist (Li *et al.*, 2007). Das *ALMS1*-Gen befindet sich an Position 2p13 auf dem kurzen (p)-Arm von Chromosom 2 (siehe Abbildung 1). Es beginnt an Position 73.385.758 und endet an Position 73.609.919 des aktuellen Referenzgenoms<sup>1</sup>. Die Referenz-mRNA<sup>2</sup> besitzt eine Länge von 12.928 bp und kodiert für ein 4169 Aminosäuren (aa) langes Protein<sup>3</sup>. In der Literatur werden *ALMS1*-Transkripte aus 23 Exons bestehend beschrieben, wobei die genaue Exon-Struktur der individuellen cDNAs noch nicht vollständig identifiziert wurde (Collin *et al.*, 2002; Hearn *et al.*, 2002).

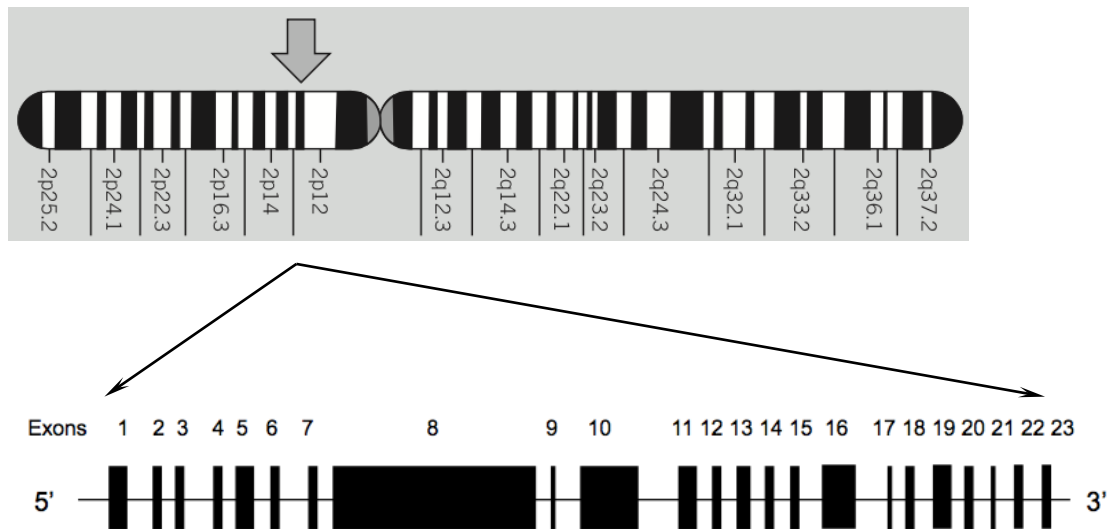
---

<sup>1</sup> NC\_000002.12: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC\\_000002.12](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NC_000002.12)

<sup>2</sup> NM\_015120.4: [http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM\\_015120.4](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/NM_015120.4)

<sup>3</sup> NP\_055935.4: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/110349786>

Stand: 01.04.2015

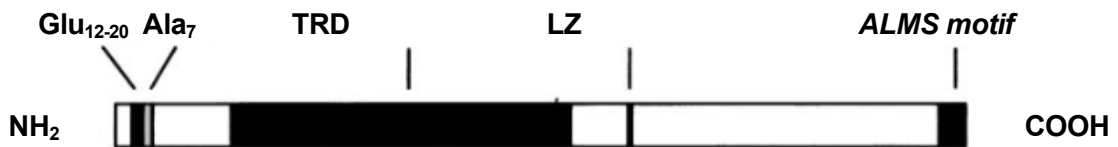


**Abbildung 1: Chromosomale Lokalisation von ALMS1 und dessen Exon-Intron-Struktur (nicht maßstabsgetreu).**

Das ALMS1-Gen befindet sich an Position 2p13 und enthält 23 Exons (nach Hearn *et al.*, 2002; Mendioroz *et al.*, 2008).

In unmittelbarer Nachbarschaft auf Chromosom 2 (2p13.1) liegt ein Pseudogen von ALMS1 (ALMS1P, Gene ID: 200420). Pseudogene weisen große Ähnlichkeit zu den jeweiligen paralogen Genen auf und bewahren oft ihre Intron-Exon-Struktur, können jedoch ihre ursprüngliche Funktion nicht mehr erfüllen, da die Transkription oder Translation durch verschiedene Mutationen, beispielsweise durch vorzeitige Stopp-Codons und Leserahmenmutationen, gestört sein kann (Mighell *et al.*, 2000).

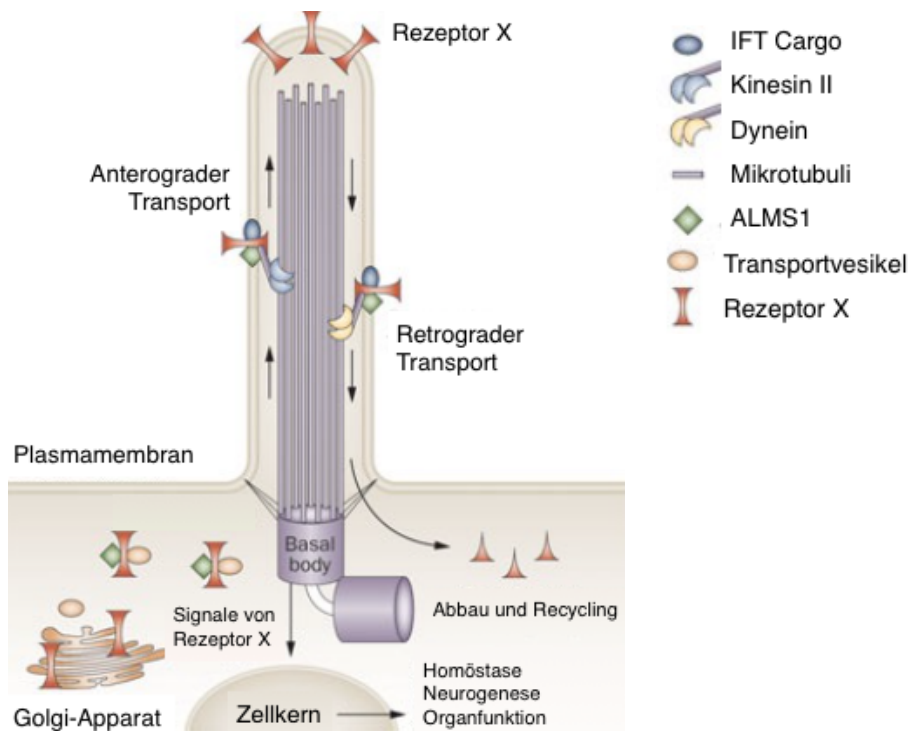
Das ALMS1-Protein hat eine molare Masse von 461 kDa und beinhaltet eine große *tandem repeat domain* (TRD), welche aus 34 unvollständigen Wiederholungen von 45 bis 50 aa besteht (Hearn *et al.*, 2002), einen Leucin-Zipper sowie einen polymorphen Abschnitt mit 12 bis 20 Glutaminsäure-Resten gefolgt von 7 Alanin-Resten nahe des N-Terminus (Hearn *et al.*, 2005) (siehe Abbildung 2). Der C-Terminus von ALMS1 zeigt Ähnlichkeit mit den zentrosomalen Proteinen C10orf90 und KIAA173, deren Funktion ebenfalls noch nicht vollständig geklärt ist (Knorz *et al.*, 2010). Diese Region wird als *ALMS motif* bezeichnet (Collin *et al.*, 2002). C10orf90, auch als *fragile-site associated tumor suppressor* (FATS) bezeichnet, ist ein durch das Tumorsuppressorgen TP53 reguliertes DNA-Reperaturgen (Zhang *et al.*, 2010). FATS wird in Brustkrebszellen im Vergleich zu gesundem Referenzgewebe vermindert exprimiert. Eine niedrige Expression von FATS in Brustkrebszellen ist mit einer schlechten Prognose assoziiert und kann daher als prognostischer Marker herangezogen werden (Zhang *et al.*, 2011).



**Abbildung 2: Schematische Darstellung des menschlichen ALMS1-Proteins (nicht maßstabsgetreu).**

*Glu<sub>12-20</sub>* = variable Anzahl von Glutaminsäure-Resten, *Ala<sub>7</sub>* = Alanin-Reste am N-terminalen Ende, *TRD* = tandem repeat domain, *LZ* = Leucin-Zipper (nach Hearn *et al.*, 2005).

*ALMS1* wird in menschlichem Gewebe ubiquitär und normalerweise gering exprimiert. Im Herzen, der Plazenta, im Skelettmuskel, im Pankreas, sowie im Hoden sind im Vergleich zu anderen Geweben höhere Expressionswerte zu beobachten (Hearn *et al.*, 2002). Aufgrund der intrazellulären Lokalisierung wird vermutet, dass das *ALMS1*-Protein für die Organisation der Mikrotubuli, intrazelluläre Transportvorgänge sowie für die normale Funktion von Zilien verantwortlich ist (Collin *et al.*, 2005; Hearn *et al.*, 2005; Graser *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2007). Weiterhin ist *ALMS1* Bestandteil des Zentrosoms (Andersen *et al.*, 2003; Hearn *et al.*, 2005), dem Organisationszentrum für die Polymerisation der Mikrotubuli (*microtubule organizing center*, MTOC) während der Zellteilung (Doxsey *et al.*, 2005). Mikrotubuli sind lange, röhrenförmige Proteine, welche am Zentrosom verankert sind und die gesamte Zelle durchspannen. Sie dienen als Schienensystem für intrazelluläre Transportvorgänge und sorgen für Struktur und Formerhaltung der Zelle (Hauser, 2006). Weiterhin befindet sich das *ALMS1*-Protein am Kinetosom von Zilien, fingerförmigen zytoplasmahaltigen Ausstülpungen der Zelloberfläche, die beinahe alle Zellarten in einem Stadium ihres Zellzyklus aufweisen und die sich durch ein Skelett aus Mikrotubuli auszeichnen. Zilien sind beteiligt an der Bewegung von Zellen und der Signaltransduktion (Hearn *et al.*, 2005). Durch einen *knockdown* von *ALMS1* durch RNA-Interferenz kommt es zu einer gestörten Ziliogenese (Li *et al.*, 2007). Nach Purvis *et al.* (2010) wird die Transkription des *ALMS1*-Gens durch den ubiquitären Faktor Sp1 und *regulatory factor X* (RFX)-Proteine reguliert, welche bereits bekannte regulatorische Gene der Ziliogenese darstellen. Von über 120 verschiedenen Mutationen des *ALMS1*-Gens ist inzwischen bekannt, dass sie ursächlich für die Entstehung des Alström-Syndroms sind, einer seltenen Multisystemkrankheit, welche autosomal rezessiv vererbt wird (Ozantürk *et al.*, 2015). Die meisten dieser Veränderungen sind *nonsense*- oder *frameshift*-Mutationen (Insertionen und Deletionen) in den Exons 8, 10 und 16 und führen zur Produktion einer verkürzten Versionen des *ALMS1*-Proteins mit wahrscheinlich eingeschränkter Funktion. Weiterhin ist eine Vielzahl von *single nucleotide*-Polymorphismen (SNPs) bekannt, deren funktioneller Einfluss noch nicht hinreichend geklärt ist (Marshall *et al.*, 2007a).



**Abbildung 3: Mögliche Funktion des ALMS1-Proteins.**

Das ALMS1-Protein ist möglicherweise an intraflagellären Transportvorgängen beteiligt und interagiert mit noch unbekanntem Rezeptoren, hier als „Rezeptor X“ bezeichnet. Zu möglichen Interaktionspartnern in neuronalen Zellen zählen der Somatostatinrezeptor 3 (SSTR3), der Serotoninrezeptor 5-Hydroxytryptamin-Rezeptor-6 (HTR6) oder der Melaninkonzentrierendes Hormon (MCH)-Rezeptor (MCHR1), welche regulatorisch am zellulären Energiestoffwechsel beteiligt sind. ALMS1 könnte am Vesikeltransport vom Golgi-Apparat in das Zilium und/oder an intraflagellären Transportvorgängen beteiligt sein und damit zur Regulation der zellulären Homöostase, Neurogenese und Organfunktion beitragen (nach Girard und Petrovsky, 2011).

Beobachtet wurde, dass ein Mangel an funktionstüchtigem ALMS1-Protein zu einer gestörten Regulation der Nahrungsaufnahme, sowie zur Entwicklung einer Insulinresistenz führt. Daraus kann sich eine gestörte Glukosetoleranz ergeben, wie sie bei vielen Patienten mit Alström-Syndrom vorliegt. Inwieweit auch andere Symptome des Alström-Syndroms durch Mutationen des ALMS1-Gens verursacht werden, konnte dagegen noch nicht hinreichend geklärt werden. Eine gestörte Funktion der Zilien in verschiedenen Geweben und Organen ist jedoch als mögliche Erklärung für die Genese weiterer Defizite im Rahmen des Alström-Syndroms denkbar (Collin *et al.*, 2002; Li *et al.*, 2007). Aufgrund der Assoziation von Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2 mit verschiedenen Ziliopathien, wird eine Beteiligung der primären Zilien an der Regulation des Appetits, des Fettstoffwechsels, der  $\beta$ -Zell-Funktion und des Insulinstoffwechsels vermutet (Girard und Petrovsky, 2011). Im zentralen Nervensystem sind primäre Zilien vor allem an sensorischen Prozessen beteiligt. Signalmoleküle und Rezeptoren werden per intraflagellärem Transport vom Golgi-Apparat bis zur Spitze des Ziliums befördert, dort in die Plasmamembran integriert bzw. aus dieser

entfernt. Dort können sie Signalmoleküle aus dem extrazellulären Raum binden und gegebenenfalls abbauen (Zaghloul und Katsanis, 2009). Des Weiteren tritt intraflagellärer Transport bei immunologischen Synapsen von T-Lymphozyten auf (Finetti *et al.*, 2009). Das *ALMS1*-Protein ist in primären Zilien vermutlich am intraflagellären Transport von Cargo-Proteinen (in Abbildung (Abb.) 3 als „IFT Cargo“ bezeichnet) zur Plasmamembran beteiligt (Girard und Petrovsky, 2011).

### 1.3 Das Alström-Syndrom

Das Alström-Syndrom (#OMIM: 203800) ist eine seltene Erbkrankheit, die über einen autosomal-rezessiven Erbgang vermittelt wird. Die Erstbeschreibung erfolgte 1959 durch den schwedischen Psychiater Carl-Henry Alström als eine dem Bardet-Biedl-Syndrom (#OMIM: 209900) ähnelnde Erkrankung mit retinaler Dystrophie, Adipositas, Diabetes mellitus und zentraler Taubheit (Alström *et al.*, 1959).

#### 1.3.1 Ätiologie

Das Alström-Syndrom wird durch Mutationen im *ALMS1*-Gen hervorgerufen und autosomal-rezessiv vererbt (Hearn *et al.*, 2002). Inzwischen sind bereits 120 verschiedene für das Alström-Syndrom ursächliche Mutationen in *ALMS1* bekannt (Ozantürk *et al.*, 2015). Heterozygote Träger eines mutierten Allels weisen hingegen keinerlei für das Alström-Syndrom phänotypische Charakteristika auf (Marshall *et al.*, 2011). Die ubiquitäre Expression von *ALMS1* ist eine mögliche Erklärung für die Beeinträchtigung mehrerer Organsysteme und die unterschiedliche Ausprägung der Phänotypen bei Betroffenen (Collin *et al.*, 2002). Sowohl Adipositas als auch Diabetes sind in der Bevölkerung weit verbreitete Probleme und mit einer erhöhten Morbidität und Mortalität assoziiert (Kopelmann 2000). Ursächlich ist neben Umwelt- bzw. „lifestyle“-Faktoren auch eine starke genetische Komponente (Naggert *et al.*, 1997; Froguel und Velho 2001). Viele der als ursächlich identifizierten Gene stehen im Zusammenhang mit genetischen Syndromen, wie zum Beispiel dem Bardet-Biedl-Syndrom (Slavotinek *et al.*, 2000). Auch beim Alström-Syndrom liegen Veränderungen auf genetischer Ebene in Korrelation mit einer *early-onset*-Adipositas, von der alle Kinder in einem frühen Krankheitsstadium betroffen sind, und einer Störung des Glukosestoffwechsels vor (Collin *et al.*, 2002). Als Ursache für die *early-onset*-Adipositas, welche beim Alström-Syndrom in Kombination mit gesteigertem Appetit und sensorischen Defiziten auftritt, wird eine Dysfunktion auf neuronaler Ebene angenommen (Collin *et al.*, 2002). Von über mehr als 20 weitere neurodegenerative Erkrankungen ist bekannt, dass sie mit einem erhöhten Risiko für einen gestörten Insulinstoffwechsel, und damit einhergehender Insulinresistenz, Diabetes mellitus und Adipositas assoziiert sind. Zu diesen Syndromen zählen unter anderem die Alzheimer-Krankheit, das Down-Syndrom, die Chorea Huntington,

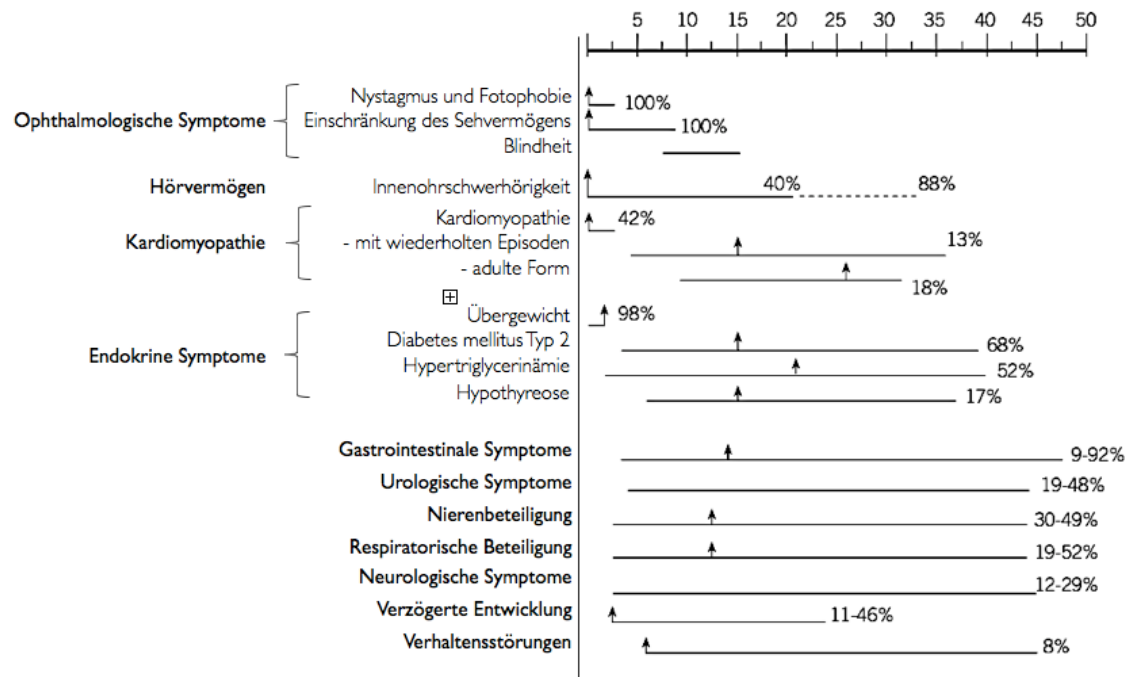
sowie verschiedene Störungen des Mitochondrienstoffwechsels (Ristow, 2004). Da sowohl die Sekretionsleistung der Insulin produzierenden  $\beta$ -Zelle als auch die Regulation der Insulinsensitivität in der Peripherie von einer ausreichenden ATP-Synthese und damit ausreichender Energiebereitstellung abhängt, ist die Mitochondrienfunktion bei der Regulation der Glukosehomöostase von zentraler Bedeutung. Eine gestörte Mitochondrienfunktion kann daher zur Pathogenese eines Diabetes mellitus beitragen. Zahlreiche klinische Syndrome, die auf eine gestörte Mitochondrienfunktion zurückzuführen sind, sind mit einem Diabetes assoziiert. Daher nimmt man bei vielen dieser diabetischen neurodegenerativen Erkrankungen wie dem Alström-Syndrom und dem Wolfram-Syndrom (#OMIM: 222300), auch DIDMOAD-Syndrom (Diabetes insipidus, Diabetes mellitus, Optikusatrophie, *deafness*) genannt, an, dass sie auf Veränderungen des mitochondrialen Stoffwechsels basieren (Jackson *et al.*, 1994).

### 1.3.2 Häufigkeit

Das Alström-Syndrom ist mit weniger als einem Betroffenen auf 1.000.000 Einwohner eine sehr seltene Erkrankung (Marshall *et al.*, 2011). Die richtige Diagnose stellt eine besondere Herausforderung dar, da es einerseits selten vorkommt und somit den meisten Ärzten unbekannt ist, und andererseits sehr komplexe und variable Symptome aufweist, die sich erst im Laufe der Zeit entwickeln. Bei vielen Patienten wird die Diagnose daher erst im Jugendlichen- oder jungen Erwachsenenalter gestellt. Das Alström-Syndrom tritt in einer Vielzahl ethnischer Gruppen auf, wobei Bevölkerungsgruppen mit höherer Konsanguinitätsrate aufgrund des autosomal rezessiven Erbgangs ein höheres Risiko aufweisen (Marshall *et al.*, 2007a). Während es in den 1990er Jahren zunächst nur 20 und später 60 dokumentierte Fälle gab, ist die Krankheit heute bei etwa 950 Menschen diagnostiziert worden (Encyclopédie Orphanet Grand Public, 2014). Dennoch gibt es vermutlich noch weitaus mehr Betroffene, bei denen aufgrund des breiten Spektrums an klinischen Manifestationen die entsprechende Diagnose noch nicht gestellt wurde.

### 1.3.3 Klinik

Das Alström-Syndrom ist eine multisystemische Erkrankung, die im Kindesalter mit Nystagmus und Photophobie als Erstanzeichen beginnt. Diese Augensymptomatik betrifft alle Alström-Patienten und entwickelt sich fortschreitend im Sinne einer progredienten Retinopathie, die im weiteren Verlauf zur vollständigen Erblindung führt (Marshall *et al.*, 2005; 2007a). Bei vielen Betroffenen entwickelt sich ebenfalls sehr früh eine dilatative Kardiomyopathie, die in der Folge ein obstruktives Herzversagen hervorruft. Diese Herzschwäche kann bereits vor der Entwicklung der Augensymptomatik einsetzen.



**Abbildung 4: Symptomatik des Alström-Syndroms.**

Schematische Darstellung des Alters der Patienten, in dem Symptome des Alström-Syndroms typischerweise auftreten. Durch den Pfeil gekennzeichnet ist der jeweilige Häufigkeitsgipfel des Auftretens der Beschwerden. Weiterhin ist die Altersspanne des erstmaligen Auftretens der Symptome dargestellt, sowie der prozentuale Anteil der Betroffenen (nach Mendioroz et al., 2008).

Zu weiteren Symptomen des Alström-Syndroms zählen endokrinologische und metabolische Störungen sowie eine langsam fortschreitende Leber- und Nierenfunktionsstörung im zweiten bis vierten Lebensjahrzehnt (Marshall et al., 2005; 2007a). Weiterhin kann sich bereits frühzeitig eine Hörschwäche entwickeln (Marshall et al., 2005). Differenzialdiagnostisch sollte das Bardet-Biedl-Syndrom, als dessen Unterform das Alström-Syndrom bis in die 1980er Jahre angesehen worden ist, in Erwägung gezogen werden. Im Gegensatz zu Alström-Patienten weisen Menschen mit Bardet-Biedl-Syndrom jedoch eine deutliche geistige Retardierung sowie eine Poly- oder Syndaktylie auf (Forsythe et al., 2013).

### 1.3.4 Diagnose

Die Diagnose erfolgt vornehmlich anhand der Symptomkonstellation und auf Basis eines genetischen Tests. Ein negatives Testergebnis des Gentests schließt jedoch ein Vorliegen der Erkrankung nicht aus, wenn die klinischen Diagnosekriterien erfüllt werden. Aufgrund der allelischen Heterogenität der Erkrankung und des hochgradigen Polymorphismus des *ALMS1*-Gens kann die der Erkrankung zu Grunde liegende Mutation mit den derzeitigen technischen Möglichkeiten nicht in jedem Erkrankungsfall identifiziert werden (Marshall et al., 2013).

### 1.3.5 Therapie und Prognose

Da derzeit weder eine kausale Therapie des Alström-Syndroms existiert, noch dessen Komplikationen gänzlich verhindert oder beseitigt werden können, ist eine symptomatische Therapie sowie lebenslange multidisziplinäre Betreuung mit engmaschigen Kontrolluntersuchungen für Alström-Patienten von großer Bedeutung. Dabei können eine frühzeitige Diagnosestellung und sukzessive Intervention die Prognose günstig beeinflussen (Marshall *et al.*, 2007a; Paisey *et al.*, 2014). Besonders wichtig ist das Management der sensorischen Defizite. Besonders bei jüngeren Kindern können der Nystagmus und die Photophobie zu Problemen in der sensomotorischen Entwicklung führen. Durch getönte Brillengläser wird blendendes Licht in seiner Intensität abgeschwächt, so dass der Photophobie wenigstens teilweise begegnet werden kann. Da es langfristig zum absoluten Visusverlust kommen kann, ist ein frühzeitiges Sprachtraining bedeutend für die Kommunikationsfähigkeit der Patienten. Das Hörvermögen kann durch Hörgeräte unterstützt werden und sollte regelmäßig audiologisch überprüft werden (Marshall *et al.*, 2007a). Zu den regelmäßig durchzuführenden Untersuchungen zählen aufgrund der erwähnten kardialen Begleiterscheinungen Echokardiographien, Blutkontrollen sowie Blutdruckmessungen. Im Falle einer Kardiomyopathie werden ACE-Hemmer als medikamentöse Therapie eingesetzt, welche gleichzeitig einen nephroprotektiven Effekt aufweisen. Eine Kombination mit weiteren Herz-Kreislauf-Medikamenten (Diuretika,  $\beta$ -Blocker, Digitalis, Spironolacton) ist möglich. Je nach Funktionalität der anderen Organsysteme (Lunge, Niere, endokrines System) kann eine Herz-Lungen-Transplantation erwogen werden. Darüber hinaus sind Maßnahmen zur Gewichtsreduktion und körperliche Aktivität entscheidend (Paisey *et al.*, 2014), wobei diese oft in der Durchführung durch das eingeschränkte Sehvermögen der Patienten erschwert werden. Schilddrüsen- und Blutzuckerwerte sollten regelmäßig überprüft werden. Im Falle eines Diabetes mellitus wird mit einer Insulintherapie begonnen (Marshall *et al.*, 2007a). Eine engmaschige Überwachung der Lungen-, Leber- und Nierenfunktion ist ebenfalls von prognostischer Bedeutung, da die fortschreitende Herz-, Lungen-, Leber- und Nierenbeteiligung ein Multiorganversagen bewirken kann, welches die häufigste Todesursache bei Alström-Patienten darstellt (Marshall *et al.*, 2005). Ein weiterer zentraler Aspekt ist die Aufklärung und psychosoziale Unterstützung der Betroffenen und ihrer Familien zur Gewährleistung ihrer Integration. Obwohl das Alström-Syndrom eine sehr seltene Erkrankung ist, gibt es inzwischen umfassendes Informationsmaterial in mehreren Sprachen, sowie zahlreiche Selbsthilfeinitiativen, welche über die Initiative Alström Syndrome International ([www.alstrom.org](http://www.alstrom.org)) koordiniert werden. Die Lebenserwartung von Alström-Patienten ist sehr variabel und beträgt derzeit maximal ca. 50 Jahre (Marshall *et al.*, 2011).



---

## 2. Zielstellung

Um mögliche Kandidatengene als Ansatzpunkte einer gezielten Krebstherapie zu identifizieren, müssen die molekularen Mechanismen der Tumorentstehung und -progression sowie die Entstehung von Resistenzmechanismen näher untersucht werden. Durch das Verständnis dieser Mechanismen versucht man aufzuklären, an welchen Stellen ein Tumor am ehesten „verwundbar“ und somit therapeutisch beeinflussbar ist (Krebs, 2008).

Das aus den Voruntersuchungen vermutete differentielle Expressionsmuster von *ALMS1* könnte einen Hinweis auf die Beteiligung von *ALMS1* an der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms liefern. Das Ziel dieser Arbeit bestand daher darin, das Expressionsmuster von *ALMS1* mittels PCR und qRT-PCR näher zu untersuchen, *ALMS1*-Transkripte in Hodgkin-Lymphom-Zellen vollständig zu sequenzieren und auf Polymorphismen und auf mögliche Spleißvarianten hin zu untersuchen und Zelllinien- und gewebsspezifische Unterschiede zu charakterisieren. Hierdurch sollte geprüft werden, ob es einen möglichen Einfluss von *ALMS1* auf die Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms geben könnte, wodurch *ALMS1* als zukünftiger Therapieansatz in der gezielten Krebstherapie in Betracht gezogen werden könnte.

### 3. Material und Methodik

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterial

Folgende Geräte, Reagenzien und Verbrauchsmaterialien wurden für die experimentelle Arbeit genutzt.

Geräte	Hersteller
-80 °C Kühltruhe	Heraeus (Hanau, Deutschland)
-80 °C Kühlschrank	Sanyo (München, Deutschland)
Einfriercontainer Mr. Frosty™	Nalgene (Rochester, USA)
Elektrophoresekammer	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Gelkämme	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Gelschlitten	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Kühlkombination	Liebherr (Bulle, Schweiz)
Lichtmikroskop (invers) Axiovert 25	Carl Zeiss (Jena, Deutschland)
Mastercycler® personal und gradient	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Megafuge™ 1.0	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Mikrowelle	Bosch (Stuttgart, Deutschland)
Multifuge™ 1 S-R	Heraeus (Hanau, Deutschland)
pH-Meter pH 526	WTW (Weilheim, Deutschland)
Photometer	Beckmann Instruments (Brea, USA)
Pipetten	Eppendorf (Hamburg, Deutschland)
Rotor Gene® RG-3000	Corbett Research (Mortlake, Australien)
Schüttler mit Inkubationshaube	Edmund Bühler (Tübingen, Deutschland)
Spannungsgerät Power Pac 200	Bio-Rad Laboratories (München, Deutschland)
Sterile Arbeitsbank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Tischzentrifuge Biofuge fresco™	Heraeus (Hanau, Deutschland)
UV-Illuminator	Syngene (Frederick, USA)
UV-Tisch	Biotec-Fischer (Reiskirchen, Deutschland)
Vortex Genie® 2	Scientific Industries (Bohemia, USA)
Waage BP 2215	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Waage CP 2201	Sartorius (Göttingen, Deutschland)
Wärmeschrank	Heraeus (Hanau, Deutschland)
Verbrauchsmaterialien	Hersteller
Einmal-Spritzen	Terumo (Leuven, Belgien)
Einmal-Injektions-Kanülen Microlance 3	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Handschuhe Peha-soft nitrile	Hartmann (Heidenheim, Deutschland)

Kryo-Röhrchen	Nalgen Nunc International (Rochester, USA)
Pasteurpipetten	Hirschmann (Eberstadt, Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Greiner (Nürtingen, Deutschland)
PCR-Reaktionsgefäße, 0,2 ml	Kisker-Biotech (Steinfurt, Deutschland)
Pipettenspitzen	Schubert (Leipzig, Deutschland)
Pipettenspitzen	Brand (Wertheim, Deutschland)
Pipettenspitzen mit Filter	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Pipettenspitzen mit Filter	Greiner Bio-One (Frickenhausen, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Schubert (Leipzig, Deutschland)
Reaktionsgefäße	Brand (Wertheim, Deutschland)
Skalpell	Braun (Tuttlingen, Deutschland)
Zellkulturflaschen	TPP (Trasadingen, Schweiz)
Zentrifugenröhrchen	Greiner (Nürtingen, Deutschland)

<b>Chemikalien</b>	<b>Hersteller</b>
Agarose	PEQ Lab (Erlangen, Deutschland)
Aqua B. Braun	B. Braun AG (Melsungen, Deutschland)
Chloroform	Sigma-Aldrich (Steinheim, Deutschland)
DEPC-H <sub>2</sub> O	Ambion (Austin, USA)
DEPC-Reagenz	Sigma-Aldrich (Heidelberg, Deutschland)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Deutschland)
EDTA	Ambion (Austin, USA)
Ethanol	Sigma-Aldrich (Heidelberg, Deutschland)
Ethidiumbromid	Sigma-Aldrich (Heidelberg, Deutschland)
HPLC-Wasser	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Isopropanol	Sigma-Aldrich (Heidelberg, Deutschland)
Magnesiumchlorid (MgCl <sub>2</sub> )	Promega (Mannheim, Deutschland)
Natriumacetat (NaOAc)	Merck (Darmstadt, Deutschland)
Natriumchlorid (NaCl)	Ambion (Austin, USA)
Penicillin/Streptomycin	PAA (Pasching, Österreich)
Tris Acetat	Sigma-Aldrich (Heidelberg, Deutschland)
TRIzol™	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Zellkulturmedium RPMI	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)

<b>Enzyme, fertige Lösungen und Reaktionskits</b>	<b>Hersteller</b>
5x First Strand Buffer	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
5x Green GoTaq® Reaction Buffer	Promega (Mannheim, Deutschland)
10x PCR Gold Buffer	Roche (Mannheim, Deutschland)
aTaq-Polymerase	Promega (Mannheim, Deutschland)
Ampli Taq Gold™	Roche (Mannheim, Deutschland)

BigDye <sup>®</sup> Terminator Cycle Sequencing Kit	PE Applied Biosystems (Weiterstadt, Deutschland)
Desoxyribonucleinsäuren (dNTP), 10 mM	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
Dithiothreitol (DTT)	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Fetales Kälberserum (FCS)	Biochrom AG (Berlin, Deutschland)
GeneJet <sup>™</sup> Extraction Kit	Thermo Scientific (Waltham, USA)
GoTaq <sup>®</sup>	Promega (Mannheim, Deutschland)
H-Minus RT	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
H-Minus Puffer	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
Human Total RNA Master Panel II	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
Ladepuffer für Agarosegele (6x)	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
Maxima <sup>™</sup> SYBR Green/ROX qPCR	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
MinElute Gel Extraction Kit	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Oligo-dT-Primer	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
PBS-Puffer	PAA (Pasching, Österreich)
PCR-Puffer	Promega (Mannheim, Deutschland)
RNase Zap	Ambion (Austin, USA)
RT-Puffer	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
Superscript <sup>™</sup> II RNase	Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland)
T7 (dT) 24 Primer	Invitrogen (Karlsruhe, Deutschland)
Größenstandards	Hersteller
GeneRuler <sup>™</sup> 50 bp DNA Leiter	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)
GeneRuler <sup>™</sup> 100 bp Plus DNA Leiter	Fermentas (St. Leon Roth, Deutschland)

### 3.1.2 Verwendete Zelllinien und Gewebe

Die im Folgenden aufgeführten Zelllinien wurden von der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen (DSMZ) bezogen. RNA aus *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC), welche aus Spenderblut extrahiert wurden, sowie RNA aus humanen Gewebeproben (Lymphknoten, Milz, Hoden, Ovar, Gehirn, Cerebellum, Niere, Mamma, Thymus, Skelettmuskel, Plazenta, Schilddrüse, Pankreas, Lunge), welche aus der RNA-Sammlung Human Total RNA Master Panel II von Becton Dickinson (Heidelberg, Deutschland) stammen, wurde mir freundlicherweise von der AG Staeger zur Verfügung gestellt.

L-1236 (DSMZ-Nummer: ACC-530): Die Zelllinie L-1236 wurde 1994 aus dem peripheren Blut eines 34-jährigen Patienten, der an Morbus Hodgkin in fortgeschrittenem Stadium erkrankt war, isoliert. Die Zellen sind von variabler Morphologie. Reed-Sternberg-Zellen sind zahlreich vorhanden. Die L-1236-Zellen wachsen semi-adhären, vereinzelt oder als Haufen in Multi- oder Monolayern (Wolf *et al.*, 1996).

HDLM-2 (DMSZ-Nummer: ACC-17): Die Zelllinie HDLM-2 wurde 1982 aus dem Pleuraerguss eines 74-jährigen Mannes gewonnen, der an einem Hodgkin-Lymphom vom nodulär-sklerosierenden Typ in Stadium IV erkrankt war. Die HDLM-2-Zellen wachsen einzeln als Suspensionszellen (Drexler *et al.*, 1986).

KM-H2 (DMSZ-Nummer: ACC-8): Die 1974 etablierte Zelllinie KM-H2 stammt aus dem Pleuraerguss eines 37-jährigen Mannes. Der Patient befand sich im Stadium IV eines Rezidivs des Hodgkin-Lymphoms vom Mischtyp. Die runden bis polygonalen KM-H2-Zellen wachsen einzeln in Suspension (Kamesaki *et al.*, 1986).

L-428 (DMSZ-Nummer: ACC-197): Die Zelllinie L-428 wurde 1978 aus einem Pleuraerguss einer 37-jährigen Frau mit refraktärem Hodgkin-Lymphom in Stadium IVB vom nodulär-sklerosierenden Typ gewonnen. Die Zellen wachsen einzeln oder in Trauben als Suspensionszellen, können polymorph sein und Stacheln aufweisen (Schaadt *et al.*, 1979).

L-540 (DMSZ-Nummer: ACC-72): Die Zelllinie L-540 stammt aus dem Knochenmark einer 20-jährigen Frau, welche an einem Hodgkin-Lymphom vom nodulär-sklerosierenden Typ in Stadium IVB erkrankt war. Die Zellen wachsen einzeln als Suspensionszellen (Diehl *et al.*, 1981).

### 3.1.3 Primer

**Tabelle 1: Übersicht über die verwendeten Primer.**

Primer-Name	Zielsequenz	Primer-Sequenz in 5' → 3'-Richtung	Produkt-
ACTB	β-Aktin	GGCATCGTGATGGACTCCG	613 bp
		GCTGGAAGGTGGACAGCGA	
T7 Extensionsprimer	Transkriptionsstart	GCTCTAATACGACTCACTATAGG	-
BD SMART™ T7	Transkriptionsstart	ACTCTAATACGACTCACTATAGGGAG	-
B5	Exon 11 - 14	ACGCAAAGCTCCTGTCAAGT	412 bp
A3		GAGGTTCTCATCCCCAGTGA	
1L	Exon 1	AGCGAGACACCAACATGGA	235 bp
1R		TCGTCTCCTCGTCTCTAT	
2L	Exon 2	TGACCTGTCATGTATGGCAAC	104 bp
2R		AGAACCCCGCTGAGCTGT	
3L	Exon 3	TCTTGGCATTGTCTTCCTCA	162 bp
3R		TCTGTTGGGTTCTTTACTTGA	
1neu_A_L	Exon 1 bis 4	ATAGACGACGAGGAGGACGA	562 bp
4neu_B_R		TCAGAGGTGCAAACTTAGT	
1L_B	Exon 1 bis 3	TAGACGACGAGGAGGACGAG	251 bp
2/3R_B		TTCTGATCATCCCCAGAACC	
1/2L_A	Exon 1 bis 3	GGACCTCCCTGGAGAAGATT	197 bp
3R_A		CAAGGTTTGGGAAGAGTCCA	

4L	Exon 4	GCTTCTCCTGATTTGCCTTT	100 bp
4R		TCAGAGGTGCAAACTTAGTTCA	
4R_A	Exon 1 bis 3 (mit 1L)	AGGCAAATCAGGAGAAGCAA	695 bp
5L	Exon 5	TGTATCTCAGCACCCGCTTA	198 bp
5R		TTGTTTTCAGGCCACTGTGT	
8L	Exon 8	CCTGCTCGTGGGACAGTAAT	174 bp
8R		CATGTGCAGCCAGTGAATCT	
8.0L		TGTCCCTTGAGGACCTGTCT	200 bp
8.0R		CCCCCTATGTGAGTGGGAAC	
8.1L		CTGGCCTACCAACAGTACCC	187 bp
8.1R		AGTGAAGAGGACGCAGAGGA	
8.2L		GGGACACCAACTCCAACC	743 bp
8.2R		GAGCTGGAAGGGGAGGTTAC	
8.3L		GGACCTTTAGGTTCCAGTGC	182 bp
8.3R		ATGACAGGCTTCCCCCTATT	
8.4L		GCCGCATTTTACTGAAGCAG	180 bp
8.4R		CCAGGAACCCCTATTGCTTT	
8.5L		CTGAAGAAATCCAGGATGCAG	191 bp
8.5R		CGTGGAAGAGGGTTCTTTGA	
8.6A_L		CCTTGCCCGTTTCAGAGATA	481 bp
8.6A_R		AACATCAGAACTGATTCCA	
8.6B_R		GGAAAGAAGTTTAGAAGAACA	498 bp
8neu_A_L		TGACCAGACAACCTGGCATGT	428 bp
8neu_A_R		CAGCTGGTCCAGGAGTGG	
8neu_B_R		CTAGGCTTCTCCCTCTGTG	937 bp
8neu_C_R		ACACTAGGCTTCTCCCTCTG	940 bp
8neu_D_R		TGTTGGTGTGGGACAGTCT	758 bp
9L	Exon 9	TTCAATTTAGCACATGATTGTGG	118 bp
9R		TGGACAAGTCAGTTGTTCTTCC	
10L	Exon 10	GTGCAGATGACCATGTGAGG	212 bp
10R		AGAAATGGGAGACGGAAGGT	
11L	Exon 11	TGAAGACCCCACTTTCTGCT	223 bp
11R		GTGCCGCGAGAAAAAGTAAC	
12L	Exon 12	TTGCCATATAAGCCTTCTGGT	112 bp
12R		CTGAATGGGAGCTTTCAACG	
13L	Exon 13	CTCCAGACTTCCCAGCTCAG	152 bp
13R		TGCATTTTCATTCTGCAAGG	
15L	Exon 15	ATTCCAGTGCTGCTGCTG	159 bp
15R		TCTGTAGGGATTCTTTATTGTTTGG	
16L	Exon 16	TCCACAAAGGGATCAGAAGG	159 bp
16R		AAACGATCAAGTCGGTCCAC	
17L	Exon 17	GCAAACCATGTGATTTCTTCTG	118 bp
17R		CTGCTTGTATGCCCTTGTTT	

18L	Exon 18	ATTGTGAACGGTGCCAAAA	151 bp
18R		CAGGATAACCGGTAAAGAGCA	
19L	Exon 19	TGTTCTGTGGAAAATGTGG	225 bp
19R		AGGGTTGCTCTCACAAATGG	
20L	Exon 20	TCGCTTCAGTTTCACAGACC	165 bp
20R		GCACATGCGATTCTGGTG	
21L	Exon 21	GGTGTGCAGATCACATGAGG	203 bp
21R		TGGAGTACAGTGGCACCATC	
23L	Exon 23	CCCTGGGACTGACACAAGTT	222 bp
23R		ATTGGACAAGGCCACTATGC	
23L_A	Exon 23	CCAATCAACTTCTGGGGAGA	250 bp
23R_A		ATTGGACAAGGCCACTATGC	
23L_B	Exon 23	CCCTGGGACTGACACAAGTT	222 bp
23R_B		CCATTGGACAAGGCCACTAT	
23L_C	Exon 23	CCAATCAACTTCTGGGGAGA	252 bp
23R_C		CCATTGGACAAGGCCACTAT	
3UTR_L	3'-UTR	AGGCCCAAAGTAATGGAGGA	211 bp
3UTR_R		TGGGTTCTTTTCCCAGTGTC	
Down_L	Target-Sequenz 214707_x_at <sup>4</sup>	GGTGTGCAGATCACATGAGG	164 bp
Down_R		GCCTCCCAGGTTCAAGAGAT	
Up_L	Target-Sequenz 1556911_at <sup>5</sup>	TGTCCCTTGTACATACAGCTT	191 bp
Up_R		CAATTTGAGGGAAATCTGCAA	

Zur Sequenzierung wurden in der PCR unterschiedliche Kombinationen von *sense* und *antisense* Primer verwendet, um größere Genabschnitte zu umfassen. Aufgrund der enormen Größe von Exon 8 (6108 bp) wurden hier besonders viele Primer-Paare entworfen.

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Zellkultur

Die Hodgkin-Lymphom-Zellen wurden in Zellkulturflaschen in einem Wärmeschrank bei einer Temperatur von 37 °C, einem CO<sub>2</sub>-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchtigkeit von 95 % kultiviert. Im Zellkulturmedium RPMI 1640 waren 10 % fetales Kälberserum (FCS) und 1 % Penicillin/Streptomycin enthalten. Die Zellkulturarbeiten wurden stets aseptisch in sterilen Werkbänken durchgeführt. Alle 2 bis 3 Tage erfolgte die Versorgung der Zellkulturen mit frischem Medium. Suspensionszellen wurden entsprechend ihres Wachstumsverhaltens

<sup>4</sup> Die Zielsequenz befindet sich nicht in der *ALMS1*-RefSeq (NM\_015120.4) und liegt in der genomischen DNA in Exon 21. Siehe Anhang bzw. [https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133\\_PLUS\\_2:214707\\_X\\_AT](https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133_PLUS_2:214707_X_AT), Stand: 16.04.2015

<sup>5</sup> Die Zielsequenz liegt in der genomischen DNA zwischen Exon 9 und 10. Siehe Anhang bzw. [https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133\\_PLUS\\_2:1556911\\_AT](https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133_PLUS_2:1556911_AT), Stand: 16.04.2015

ein- bis zweimal wöchentlich in einem Verhältnis von 1:2 bis 1:4 gesplittet. Dazu wurde die Hälfte des Volumens aus der alten Zellkulturflasche entnommen und in eine neue Zellkulturflasche überführt. Das fehlende Volumen wurde mit Zellkulturmedium aufgefüllt.

### **3.2.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen**

Um Zellen langfristig zu konservieren, wurden sie bei 200 g für 10 min zentrifugiert. Anschließend wurden  $5 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Einfriermedium (komplettes Medium mit 10 % (v/v) DMSO) resuspendiert und in ein Kryo-Röhrchen überführt, welches in einem isopropanolhaltigen Gefriercontainer langsam auf  $-80\text{ °C}$  gefroren und anschließend in Flüssigstickstoff gelagert wurde. Um gefrorene Zellproben wieder aufzutauen, wurden diese bei  $37\text{ °C}$  aufgetaut in ein Röhrchen mit RPMI-Medium überführt und für 10 min bei 200 g zentrifugiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Medium resuspendiert und anschließend in eine neue Zellkulturflasche überführt.

### **3.2.3 Isolation von RNA**

Um eine Kontamination mit RNasen zu vermeiden, wurden alle Arbeitsgeräte, sowie der Arbeitsplatz mit RNase Zap vorbehandelt. Zur Isolierung der RNA wurden 10 ml je Zelllinie in ein Falcon-Röhrchen überführt und für 10 min bei 200 g zentrifugiert. Das Zellpellet wurde anschließend in 1 ml Denaturierungslösung (TRIzol™) aufgenommen und nach einer Inkubationszeit von 5 min auf Eis durch mehrmaliges Auf- und Abziehen in einer Kanüle homogenisiert. Danach wurde die Suspension für 10 min bei 12.000 g und  $4\text{ °C}$  zentrifugiert, wodurch unerwünschte Bestandteile wie extrazelluläre Membranen, DNA und Polysaccharide entfernt wurden. Der Überstand, welcher die RNA enthielt, wurde anschließend in ein neues Röhrchen überführt und mit 200  $\mu\text{l}$  Chloroform versetzt, für 15 s kräftig geschüttelt und nach einer Inkubationszeit von 5 min bei Raumtemperatur erneut für 15 min bei 12.000 g und  $4\text{ °C}$  zentrifugiert. Durch Zugabe von Chloroform konnte eine Trennung der Lösung in drei Schichten erreicht werden, wobei die RNA in der oberen wässrigen Phase enthalten war und daher leicht abgetrennt werden konnte. In den anderen Schichten befanden sich jeweils Proteine (organische Phase) und DNA (organische und Interphase). Diese wässrige Phase mit der RNA wurde vorsichtig in ein neues Röhrchen überführt, mit 1 ml eiskaltem 80%-igem Ethanol versetzt und schließlich mit Hilfe eines Vortexers mit diesem vermischt. Nach einer Inkubation von 10 min bei Raumtemperatur schloss sich ein weiterer Zentrifugationsschritt von 5 min bei 7.500 g und  $4\text{ °C}$  an. Daraufhin wurde das nun vorliegende RNA-Pellet mit 80%-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und schlussendlich in 30  $\mu\text{l}$  DEPC- $\text{H}_2\text{O}$  gelöst. Um Sekundärstrukturen der RNA aufzuschmelzen, wurde für 10 min bei  $65\text{ °C}$  inkubiert und anschließend die RNA-Konzentration bestimmt und die Reinheit der Probe beurteilt.



### 3.2.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration der gewonnenen RNA- und DNA-Lösungen wurde photometrisch über eine Messung der optischen Dichte (OD) bei einer Wellenlänge von 260 nm (OD<sub>260</sub>-Messung) und 280 nm bestimmt. Dazu wurde die Probe in einem Verhältnis von 1:100 in einem Volumen von 100 µl verdünnt. Eine Extinktion von 1 bei 260 nm entsprach dabei 40 µg/ml RNA. Aus dem Verhältnis der Absorptionen bei 260 zu 280 nm ließ sich die Reinheit der Proben beurteilen. Der Quotient sollte sich idealerweise zwischen 1,6 und 2,0 befinden.

### 3.2.5 Synthese komplementärer DNA (cDNA)

Mittels reverser Transkription kann aus RNA komplementäre DNA (*complementary DNA*, cDNA) synthetisiert werden, welche als Einzelstrang vorliegt, sich zur Sequenz des RNA-Moleküls komplementär verhält und somit nur die transkribierten Bereiche eines Gens enthält. Das Enzym Reverse Transkriptase ist eine RNA-abhängige DNA-Polymerase, welche die RNA als Matrize für die Synthese des cDNA-Stranges verwendet. Der Reaktionsansatz wurde für 1 h bei 37 °C inkubiert und die Reverse Transkriptase anschließend für 5 min bei 90 °C hitzeinaktiviert. Zur cDNA-Synthese wurde in der Regel ein Oligo-dT-Primer verwendet, welcher an das 3'-Ende der mRNA bindet. Aufgrund der erheblichen Länge der mRNA-Sequenz wurde für bestimmte cDNA-Synthesen gezielt ein alternativer Primer an Stelle des Oligo-dT-Primers für die cDNA-Synthese genutzt, welcher als *antisense* Primer an Exon 9 bindet (9R). So konnten die Abschnitte am 5'-Ende der RNA besser erreicht und in cDNA umgesetzt werden. Der Reaktionsansatz für ein Gesamtvolumen von 20 µl enthielt:

5x RT Puffer	4 µl
10 mM dNTP-Mix	1 µl
Oligo dT <sub>12-18</sub> -Primer oder 9R	1 µl
H-Minus RT (Reverse Transkriptase)	1 µl
RNA	x µl (2 µg)
DEPC-H <sub>2</sub> O	13 – x µl

### 3.2.6 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) ist ein *in-vitro*-Verfahren zur selektiven Anreicherung von Nukleinsäuresequenzen, in der Regel unter Nutzung spezifischer Primersequenzen zur Amplifikation definierter Nukleinsäurebereiche. Sie besteht aus einem Denaturierungsschritt, einem Annealingschritt und einem Elongationsschritt. Zu Beginn steht ein Denaturierungsschritt von 5 min. Durch Erhitzen der cDNA auf 94 °C wurde der cDNA-Doppelstrang in zwei Einzelstränge aufgeschmolzen. Es

folgten n Zyklen, bestehend aus jeweils 30 s bei 94 °C, 30 s bei 60 °C und 45 s bei 72 °C. Durch Senkung der Temperatur auf 60 °C kommt es zur Hybridisierung der Oligonukleotidprimer an die einzelsträngige Template-DNA (*annealing*). Die folgende Einstellung der Temperatur auf 72 °C, dem Temperaturoptimum der Taq-Polymerase, erlaubt die optimale Verlängerung der Primer in 5' zu 3'-Richtung, so dass erneut eine doppelsträngige cDNA vorliegt, die der ursprünglichen Template-DNA exakt gleicht (*elongation*). Bei besonders langen Produkten wurde dieser Schritt von 45 s auf 1 min verlängert. Die Anzahl der Zyklen variierte zwischen 35 und 40 Zyklen. Mit einer finalen Elongation von 5 min bei 72 °C wurde die PCR nach Durchlaufen der 35 Zyklen beendet und die Temperatur auf 4 °C gesenkt. Im Verlauf der Studie erfolgte aus praktischen Gründen eine Umstellung des Protokolls auf den GoTaq-Puffer, welcher bereits MgCl<sub>2</sub> und Ladepuffer enthält. Es ergaben sich durch die unterschiedliche Zusammensetzung der PCR-Ansätze jedoch keinerlei Unterschiede in den Messergebnissen. Die Reaktionsansätze für ein Gesamtvolumen von jeweils 25 µl enthielten:

10x PCR-Puffer	2,5 µl	GoTaq-Puffer	5 µl
MgCl <sub>2</sub> (25 mM)	1,5 µl	dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl
dNTP-Mix (10 mM)	0,5 µl	<i>sense</i> Primer (25 µM)	0,25 µl
<i>sense</i> Primer (25 µM)	0,25 µl	<i>antisense</i> Primer (25 µM)	0,25 µl
<i>antisense</i> Primer (25 µM)	0,25 µl	Taq-Polymerase	0,2 µl
Taq-Polymerase	0,2 µl	H <sub>2</sub> O	16,8 µl
H <sub>2</sub> O	17,8 µl	cDNA	2 µl
cDNA	2 µl		

Wenn erforderlich, wurden 10 % des H<sub>2</sub>O-Volumens durch Dimethylsulfoxid (DMSO) ersetzt. DMSO erleichtert das Aufbrechen von Sekundärstrukturen der Template-DNA und kann daher hilfreich bei der Amplifikation von GC-reichen Sequenzen sein.

### 3.2.7 SMART-RACE

Die *rapid amplification of cDNA ends* (RACE) ist eine Methode zur Bestimmung der untranslatierten 5'- und 3'-Enden eines Transkriptes. Bei der *switching mechanism at 5' end of RNA transcript* (SMART)-RACE wird dabei die gesamte mRNA von einem Oligo-dT-Primer bzw. entsprechendem *antisense* Primer aus in cDNA umgeschrieben. Die erhaltene cDNA enthält sowohl die codierende Sequenz, als auch die untranslatierten Abschnitte. An das 3'-Ende der cDNA werden hierbei durch die reverse Transkriptase mehrere dC-Reste angehängt. Die aus dem jeweiligen Verfahren synthetisierte cDNA kann nun mittels PCR mit einem passenden Ankerprimer (T7 Extension Primer) weiter amplifiziert werden. Für die Erststrangsynthese wurden 2 µg RNA aus L-1236-Zellen in 10 µl H<sub>2</sub>O verdünnt und den Ansätzen jeweils entweder 1 µl Oligo-dT-Primer oder 9R-Primer hinzugefügt. Analog zur

cDNA-Synthese wurde in der Regel der Oligo-dT-Primer verwendet, aufgrund der erheblichen Länge der mRNA-Sequenz wurde auch bei der SMART-PCR 9R als *antisense* genutzt, um die Abschnitte am 5'-Ende der RNA besser zu erreichen. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten bei 70 °C erfolgte eine Abkühlung mit Eiswasser für 2 Minuten. Der Ansatz zur Erststrangsynthese für ein Gesamtvolumen von 20 µl enthielt:

Superscript™ II RNase H-Reverse Transkriptase (10 U/µl)	1 µl
5x First Strand Buffer	4 µl
DTT (100 mM)	2 µl
dNTP-Mix	1 µl
BD SMART™ T7 Oligonucleotide (10 µM)	1 µl

Es erfolgte eine Inkubation der Ansätze bei 42 °C für 90 Minuten und im Anschluss eine Inaktivierung bei 68 °C für 10 Minuten. Zur anschließenden SMART-PCR wurden jeweils die Enzyme Ampli Taq Gold oder GoTaq verwendet. Als *antisense* Primer wurden die Primer 1R, 3R, 4R und 8.0R verwendet. Zunächst erfolgte ein Denaturierungsschritt von 1 min bei 95 °C. Es folgten 35 Zyklen, bestehend aus jeweils 15 s bei 95 °C, 30 s bei 65 °C und 3 min bei 68 °C. Die Reaktionsansätze für ein Gesamtvolumen von 25 µl enthielten:

#### Ansatz mit Ampli Taq Gold:

Ampli Taq Gold™	0,2 µl
Braun-H <sub>2</sub> O	17,1 µl
10x PCR Gold Buffer	2,5 µl
T7 Extension Primer	1,0 µl
<i>antisense</i> Primer	0,2 µl
MgCl <sub>2</sub>	1,5 µl
dNTP-Mix	0,5 µl
cDNA	2,0 µl

#### Ansatz mit GoTaq:

GoTaq	0,2 µl
Braun-H <sub>2</sub> O	16,1 µl
5x Green GoTaq Reaction Buffer	5,0 µl
T7 Extension Primer	0,5 µl
<i>antisense</i> Primer	0,2 µl
dNTP-Mix	0,5 µl
cDNA	2,0 µl

### 3.2.8 Agarosegelelektrophorese

Mittels der Agarosegelelektrophorese lassen sich Nukleinsäuren durch unterschiedliche Laufgeschwindigkeiten nach ihrem Molekulargewicht auftrennen. Für Nukleinsäure-Moleküle im Größenbereich von 200 bis 1500 bp wurde dazu ein 1,5 %-iges Agarosegel hergestellt. Dazu wurde Agarose in 1x Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE-Puffer) aufgenommen, mit einem Mikrowellengerät aufgeköcht bis die Agarose gelöst war und anschließend zum Gießen des Gels verwendet. Um DNA im Agarosegel sichtbar zu machen, wurden 4 bis 5 µl Ethidiumbromid zugegeben. Dabei interkalieren Ethidiumbromid-Moleküle mit den Basen der Nukleinsäuren, wodurch sich das Anregungsspektrum von Ethidiumbromid verändert und dessen Fluoreszenz unter Anregung mit ultraviolettem (UV) Licht stark erhöht wird (Waring, 1965). Nach vollständiger Polymerisierung wurde das Gel in eine Elektro-

phoresekammer gesetzt und mit TAE-Puffer bedeckt. Nach Zugabe der DNA-Lösungen in die Taschen wurde eine Spannung von 80 Volt angelegt und nach wenigen Minuten, wenn anhand des farbigen Ladepuffers zu erkennen war, dass die Proben ihre jeweiligen Taschen verlassen hatte, auf 100 bis 110 Volt erhöht. Zur Größenbestimmung der Produkte wurde ein Größenstandard mitgeführt. Die Visualisierung der Gelbanden erfolgte im Anschluss durch Bestrahlung des Gels mit UV-Licht.

### 3.2.9 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen

Nach der Elektrophorese konnten die gewünschten Gelbanden unter UV-Licht-Betrachtung mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten werden. Zur Isolierung der darin enthaltenen DNA-Fragmente wurde das MinElute Gel Extraction Kit sowie das GeneJet Extraction Kit verwendet.

### 3.2.10 Sequenzierung von cDNA

Um die exakte Abfolge der Nukleinsäuren ermitteln zu können, wurde mit der aus dem Agarosegel isolierten cDNA eine Sequenzierungs-PCR durchgeführt. Dies erfolgte unter Verwendung des BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit der Firma Applied Biosystems™. Der Ansatz zur Sequenzierungs-PCR für ein Gesamtvolumen von 10 µl enthielt:

cDNA (nach Gelextraktion)	1 µl
Primer	0,5 µl
BigDye® Terminator Cycle Sequencing Kit	4 µl
HPLC-H <sub>2</sub> O	4,5 µl

Das Programm der Sequenzierungs-PCR bestand aus 30 Zyklen mit je einem 96 °C-Schritt für 10 s und einem 60 °C-Schritt für 4 min. Nach der Vervielfältigung wurde die DNA mit Natriumacetat (NaOAc) gefällt. Dazu wurde das PCR-Produkt mit 1 µl 3M NaOAc pH 4,6 und 25 µl 100 % Ethanol versetzt und für 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach weiteren 15 min Zentrifugation bei 12.000 g wurde das Pellet mit 70 %-igem Ethanol für 5 min bei 12.000 g gewaschen, anschließend der Überstand weitere 5 min bei 12.000 g abzentrifugiert und das Pellet für 30 bis 60 min getrocknet. Die Sequenzierung erfolgte mit dem ABI Prism™ 3100 Genetic Analyser C im Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung (ZMG) der Martin-Luther-Universität Halle (Saale). Die Ergebnisse wurden unter Zuhilfenahme des *Basic Local Alignment Search Tools* (BLAST) ausgewertet.

### 3.2.11 Quantitative real-time PCR

Die quantitative *real-time* PCR (qRT-PCR) ist eine Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren. Das Prinzip der Real-time PCR beruht darauf, die Menge des amplifizierten

DNA-Fragments nach jedem PCR-Zyklus zu bestimmen. Dies wird durch Fluoreszenzfarbstoffmoleküle ermöglicht. An doppelsträngige DNA gebunden fluoresziert der Farbstoff. Mit zunehmender Menge der amplifizierten DNA nimmt die Fluoreszenz zu. Dem PCR-Ansatz wurde dazu SYBR Green hinzugefügt, welches mit der doppelsträngigen DNA interkaliert und die Fluoreszenz damit erhöht. Der Fluoreszenzfarbstoff wird mit Licht einer bestimmten Wellenlänge angeregt und strahlt anschließend die aufgenommene Energie in einer anderen Wellenlänge ab. Als Positivkontrolle diente das *housekeeping gene*  $\beta$ -Aktin (*ACTB*). Als Negativkontrolle diente  $H_2O$ .

Ansatz:		Programm:	
SYBR Green qPCR Master Mix (2x)	10 $\mu$ l	95°C	15 min
sense Primer (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	94°C	45 sec
antisense Primer (25 $\mu$ M)	1 $\mu$ l	60°C	45 sec
cDNA	2 $\mu$ l	72°C	1 min
nukleasefreies $H_2O$	6 $\mu$ l		
Taq-Polymerase	0,2 $\mu$ l		

} 40 Zyklen

Die Auswertung erfolgte nach der  $2^{-\Delta\Delta CT}$ -Methode (Livak und Schmittgen, 2001). Bei dieser Methode wird ein *threshold* festgelegt, an dem die Fluoreszenz erstmals die Hintergrund-Fluoreszenz übersteigt. Der  $C_T$  (*threshold cycle*)-Wert bezeichnet den PCR-Zyklus, bei dem die Fluoreszenzkurve diesen *threshold* erreicht. Anschließend wurden von den erhaltenen  $C_T$ -Werten die entsprechenden  $C_T$ -Werte von *ACTB* subtrahiert. Das Ergebnis wurde als  $\Delta C_T$ -Wert bezeichnet. Dieser Wert wurde wiederum mit einem  $\Delta C_T$ -Wert einer festgelegten Probe normalisiert, woraus sich der  $\Delta\Delta C_T$ -Wert ergab. In die folgende Formel eingefügt erhielt man den *fold change*-Wert, anhand dessen die Genexpression der verschiedenen Proben miteinander verglichen werden konnten:  $fold\ change = 2^{-\Delta\Delta CT}$

### 3.2.12 DNA-Microarray-Analyse

Die DNA-Microarray-Technologie erlaubt die Identifikation und den Vergleich von Genexpressionsprofilen im genomischen Maßstab. Sie basiert auf der Hybridisierung von markierten, an Biotin gekoppelten Oligonukleotiden mit immobilisierten DNA-Sequenzen (Sonden bzw. *probes*), die an definierten Positionen (*spots*) eines Rasters (*array*) auf der festen Oberfläche eines Trägers gebunden sind. Zur Analyse der differentiellen Expression von *ALMS1* wurden Daten verschiedener DNA-Microarrays des Typ GeneChip® *Human Genome U133 Plus 2.0 Array* (Affymetrix) herangezogen: GSE2109 (*Expression Project for Oncology, expO*), GSE3526, GSE7307 (Roth *et al.*, 2006), GSE12427 (Lin *et al.*, 2010), GSE12453 (Brune *et al.*, 2008), GSE14879 (Eckerle *et al.*, 2009), GSE20011 (Köchert *et al.*, 2011), GSE25986 (Steidl *et al.*, 2011) und GSE26325 (Staege *et al.*, 2008). Zur Analyse des Expressionsmusters von *ALMS1* wurden die Expressionsdaten humaner Gewebe ohne

pathologische Veränderungen sowie von Hodgkin-Lymphom-Proben und Hodgkin-Lymphom-Zelllinien herangezogen. Dazu wurden die Expressionsdaten der Sondensätze 214707\_x\_at, 214220\_s\_at und 214221\_at für *ALMS1* sowie der Sondensatz 1556911\_at für *ALMS1-IT* analysiert. Die entsprechenden Daten sind im Anhang auf S. 70-74 aufgelistet. Die Rohdaten wurden dankenswerterweise von Herrn Prof. Staeger mithilfe der Affymetrix Expression Console in eine Texttabelle mit Signalintensitäten umgewandelt. Die Auswertung dieser Tabelle sowie die Berechnung der p-Werte mittels T-Test erfolgte mit Microsoft Excel.

### 3.2.13 Datenbanken und Analysewerkzeuge

Zur Erstellung dieser Arbeit wurden die folgenden Datenbanken und Analyseprogramme genutzt:

4Peaks 1.7.1	A. Griekspoor und Tom Groothuis, Amsterdam, Niederlande
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org">http://www.ensembl.org</a>
ExPASy Translate Tool	<a href="http://web.expasy.org/translate/">http://web.expasy.org/translate/</a>
GeneSnap 7.12	SynGene, Cambridge, Vereinigtes Königreich
GIMP 2.8.4	The GIMP Developing Team, Kalifornien, USA
Microsoft Excel 2011	Microsoft, Redmond, Washington, USA
Microsoft PowerPoint 2011	Microsoft, Redmond, Washington, USA
NCBI	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a>
NCBI BLAST	<a href="http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi">http://www.blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi</a>
NCBI Gene	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene</a>
NCBI PubMed	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed</a>
NetAffx Query	<a href="http://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/xmlquery.affx?netaffx=netaffx4_annot">http://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/xmlquery.affx?netaffx=netaffx4_annot</a>
Neural Network Promoter Prediction Tool	<a href="http://fruitfly.org/seq_tools/promoter.html">http://fruitfly.org/seq_tools/promoter.html</a>
Neural Network Splice Site Prediction Tool	<a href="http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html">http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html</a>
Pages 5.5.2	Apple, Cupertino, Kalifornien, USA
Primer3Plus	<a href="http://www.primer3plus.com">http://www.primer3plus.com</a>
Reverse Complement	<a href="http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html">http://www.bioinformatics.org/sms/rev_comp.html</a>

## 4. Ergebnisse

### 4.1 Vollständige Sequenzierung der *ALMS1*-Transkripte in L-1236-Zellen

Im Rahmen dieser Arbeit wurden *ALMS1*-Transkripte in Hodgkin-Lymphom-Zellen der chemoresistenten Zelllinie L-1236 untersucht und charakterisiert. Dazu wurde die *ALMS1*-cDNA vollständig sequenziert und auf die Exon-Struktur sowie das Vorliegen von Spleißvarianten hin untersucht. Zu diesem Zweck wurden mit Hilfe des Tools Primer3Plus spezifische Primer für die jeweiligen Exons entworfen. Durch die Kombination verschiedener *sense* und *antisense* Primer-Paare konnten die gewünschten Abschnitte des *ALMS1*-Transkriptes per PCR amplifiziert und anschließend sequenziert werden. Als Referenzsequenz diente die Sequenz des NCBI<sup>6</sup>. Als Qualitätskontrolle wurde an allen cDNA-Proben eine PCR des *housekeeping* Gens *ACTB* durchgeführt.

Wie ursprünglich von Collin *et al.* (2002) und Hearn *et al.* (2002) beschrieben, besteht *ALMS1* aus 23 Exons. Das Vorliegen alternativ gespleißter Transkripte wird vermutet, hingegen konnte die Exon-Struktur der individuellen cDNAs noch nicht schlüssig identifiziert werden (Collin *et al.*, 2002). Mittels PCR und Sequenzanalysen konnten alle in der Literatur beschriebenen Exons auch in den L-1236-Zellen nachgewiesen werden (siehe Abbildungen 5 und 6, Tabelle 2 und Sequenzen im Anhang S. 75-80).

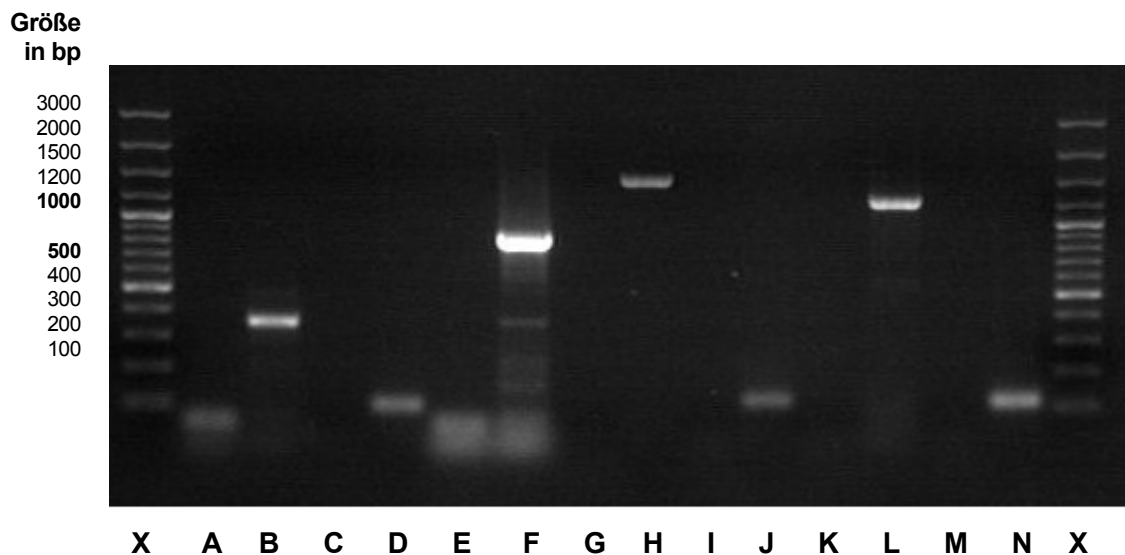
*ALMS1* verfügt über 2 Repeatregionen jeweils in den Exons 1 und 8 (Hearn *et al.*, 2002). In dem im Exon 1 gelegenen Abschnitt, welcher nach Hearn *et al.* (2002) 12 bis 20 variable Glutaminsäure-Repeats enthält, konnten in den L-1236-Zellen 13 Glutaminsäurereste in Form von (GAG)NGAA(GAG)<sub>3</sub>-Repeats nachgewiesen werden, gefolgt von 7 Alaninresten als GCG-Repeats (siehe Anhang S. 66-69, 69-70, 75-80). In der in Exon 8 gelegenen Repeatregion konnte in den L-1236-Zellen eine *tandem repeat domain* nachgewiesen werden, welche mit einer Größe von 6 kb insgesamt 40 % des Proteins ausmacht (siehe Anhang S. 66-69, 69-70, 75-80). Diese Domäne besteht aus 34 unvollständigen Wiederholungen, welche in ihrer Länge variieren und jeweils aus 45 bis 50 aa bestehen. Exon 16 (1166 bp) und Exon 21 (65 bp) lagen in den L-1236-Zellen entsprechend der NCBI-Referenzsequenz NM\_015120.4 vor, während sie in der Referenzsequenz der genomischen DNA des Ensembl Genome Browser<sup>7</sup> mit einer Länge von 1319 bp (Exon 16) bzw. 619 bp (Exon 21) angegeben sind (siehe Anhang S. 66-69, 75-80). Weiterhin konnte mit der

<sup>6</sup> NM\_015120.4, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucore/110349785>, Stand: 10.04.2016

<sup>7</sup> ENSG00000116127: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000116127;r=2:7338575873610793;t=ENST00000613296](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000116127;r=2:7338575873610793;t=ENST00000613296)  
Stand: 10.04.2016

Primerkombination 23L und 3UTR\_R ein nach Exon 23 gelegenes Exon des 3' untranslatierten Bereich (3'-UTR), welches sich an die codierende Region anschließt und demnach nicht translatiert wird, nachgewiesen werden (siehe Anhang S. 66-69, 75-80). Auf diese Weise konnte auch gezeigt werden, dass Exon 23 alternative 5'-splice sites besitzt (siehe 4.2.3 Alternative 5'-splice sites von Exon 23). Dieses zusätzliche Exon ist in der genomischen DNA-Sequenz bei Ensembl als solches gekennzeichnet, jedoch in der Literatur bisher nicht beschrieben worden und auch in keinem der bisher auf NCBI und Ensembl dokumentierten Transkripte enthalten.

Die Abbildungen 5 und 6 sowie Tabelle 2 geben eine Übersicht über die nachgewiesenen Exons. Für die lückenlose Sequenzierung von *ALMS1* wurden die in den Abbildungen 5 und 6 abgebildeten Primerpaare durch weitere Kombinationen von *sense* und *antisense*-Primern untereinander ergänzt (siehe Anhang S. 75-80).



**Abbildung 5: PCR-Produkte verschiedener Transkriptabschnitte aus *ALMS1*.**

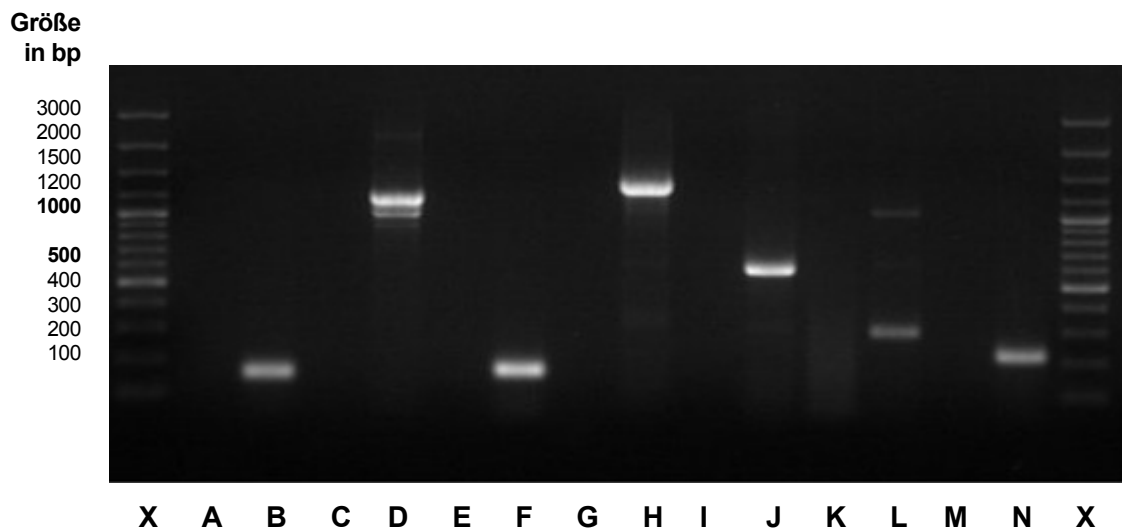
Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 bzw. H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle und verschiedenen für *ALMS1* spezifischen Primerkombination (siehe unten). Dargestellt sind die Exons 1-12.

**X** = DNA-Größenmaßstab (GeneRuler™ 100 bp Plus)

**A** = H<sub>2</sub>O, Primer: 1L + 4R\_A  
**B** = cDNA (L-1236), Primer: 1L + 4R\_A  
**C** = H<sub>2</sub>O, Primer: 4L + 4R  
**D** = cDNA (L-1236), Primer: 4L + 4R  
**E** = H<sub>2</sub>O, Primer: 5L + 8.0R  
**F** = cDNA (L-1236), Primer: 5L + 8.0R  
**G** = H<sub>2</sub>O, Primer: 8.4L + 8.5R

**H** = cDNA (L-1236), Primer: 8.4L + 8.5R  
**I** = H<sub>2</sub>O, Primer: 9L + 9R  
**J** = cDNA (L-1236), Primer: 9L + 9R  
**K** = H<sub>2</sub>O, Primer: 10L + 12R  
**L** = cDNA (L-1236), Primer: 10L + 12R  
**M** = H<sub>2</sub>O, Primer: 12L + 12R  
**N** = cDNA (L-1236), Primer: 12L + 12R





**Abbildung 6: PCR-Produkte verschiedener Transkriptabschnitte aus ALMS1.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 bzw. H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle und verschiedenen für ALMS1 spezifischen Primerkombination (siehe unten). Mit (X) gekennzeichnet ist der DNA-Größenmaßstab (GeneRuler™ 100 bp Plus). Dargestellt sind die Exons 13 bis 23. Spleißvarianten bei der Primer-Kombination aus B5 und 16R (Exon Skipping Exon 13), sowie der Primer-Kombination aus 23L und 3UTR\_R (alternative 5'-splice site von Exon 23) durch die zwei Banden deutlich erkennbar.

**X** = DNA-Größenmaßstab (GeneRuler™ 100 bp Plus)

**A** = H<sub>2</sub>O, Primer: 13L + 13R

**B** = cDNA (L-1236), Primer: 13L + 13R

**C** = H<sub>2</sub>O, Primer: B5 + 16R

**D** = cDNA (L-1236), Primer: B5 + 16R

**E** = H<sub>2</sub>O, Primer: 16L + 16R

**F** = cDNA (L-1236), Primer: 16L + 16R

**G** = H<sub>2</sub>O, Primer: 16L + 19R

**H** = cDNA (L-1236), Primer: 16L + 19R

**I** = H<sub>2</sub>O, Primer: 20L + 23R\_A

**J** = cDNA (L-1236), Primer: 20L + 23R\_A

**K** = H<sub>2</sub>O, Primer: 23L + 3UTR\_R

**L** = cDNA (L-1236), Primer: 23L + 3UTR\_R

**M** = H<sub>2</sub>O, Primer: 3UTR\_L + 3UTR\_R

**N** = cDNA (L-1236), Primer: 3UTR\_L + 3UTR\_R

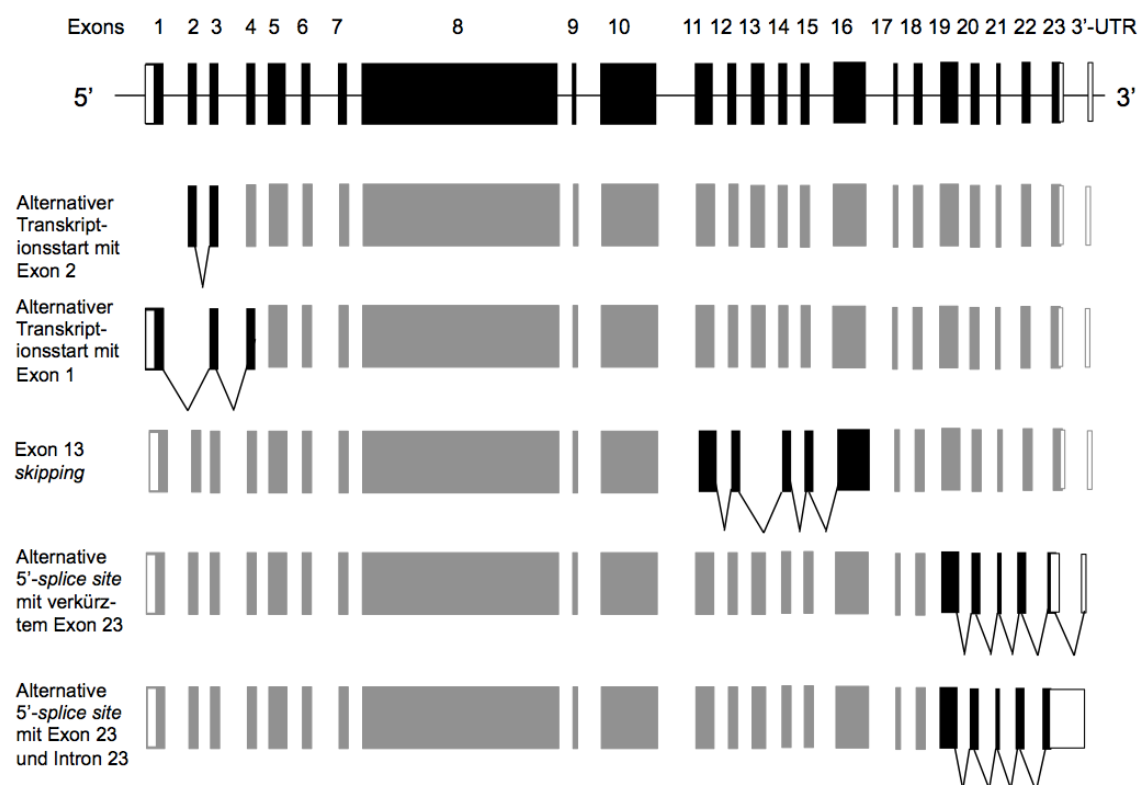
**Tabelle 2: Überblick über die in L-1236-Zellen vorliegenden ALMS1-Exons anhand von Sequenzierungsergebnissen.**

Die Sequenzierung erfolgte von der cDNA aus L-1236-Zellen nach PCR mit spezifischen Primer-Paaren für die jeweiligen Exons. Dargestellt sind sämtliche in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Exons, wobei nicht in jeder Transkriptvariante alle Exons konsekutiv hintereinander vorkommen (siehe 4.2 Identifizierung neuer ALMS1-Transkriptvarianten).

<b>Exon</b>	1	2	3	4	5	6	7	8
<b>Größe</b>	435 bp	126 bp	196 bp	118 bp	473 bp	101 bp	94 bp	6108 bp
<b>Exon</b>	9	10	11	12	13	14	15	16
<b>Größe</b>	134 bp	1865 bp	242 bp	126 bp	171 bp	135 bp	171 bp	1166 bp
<b>Exon</b>	17	18	19	20	21	22	23	3'-UTR
<b>Größe</b>	121 bp	204 bp	242 bp	184 bp	65 bp	100 bp	352 bp	357 bp

## 4.2 Identifizierung neuer *ALMS1*-Transkriptvarianten

Bisher sind 8 Transkriptvarianten von *ALMS1* bekannt und im Ensembl Genome Browser gelistet<sup>8</sup>, von denen 3 Varianten für Proteine codieren (*ALMS1-001*, *ALMS1-002* und *ALMS1-008*). Die Exon-Struktur der identifizierten Spleißvarianten ist in Abb. 7 dargestellt. Die Transkriptvariante *ALMS1-001* entspricht dabei der Referenzsequenz NM\_015120.4. In der Transkriptvariante *ALMS1-002* fehlt Exon 2. Die Transkriptvariante *ALMS1-008* bricht nach Exon 16 ab. Zusätzlich zu der bereits dokumentierten Transkriptvariante *ALMS-002* konnte in der vorliegenden Arbeit eine neue Transkriptvariante von *ALMS1* ohne Exon 1, dafür aber mit Exon 2 identifiziert werden (siehe unten, 4.2.1 Alternativer Transkriptionsstart, Abbildungen 10 und 11). Weiterhin existiert eine Transkriptvariante, in der Exon 13 fehlt (siehe 4.2.2 *Skipping* von Exon 13 und Abbildungen 14 bis 17). In weiteren Transkriptvarianten wird Exon 23 alternativ gespleißt und liegt zum Einen verkürzt vor, zum Anderen ist das Intron zwischen Exon 23 und dem 3'-UTR mit enthalten (siehe 4.2.3 Alternative 5'-*splice sites* von Exon 23 und Abbildungen 18 bis 21).



**Abbildung 7: Im Rahmen dieser Arbeit identifizierte Transkriptvarianten von *ALMS1*-Transkripten in L-1236-Zellen (nicht maßstabsgetreu).**

Alternativer Transkriptionsstart mit jeweils fehlendem Exon 1 bzw. 2 (entspricht *ALMS1-002*), skipping von Exon 13 und alternative 5'-*splice sites* von Exon 23 mit verkürztem Exon 23 bzw. vollständigem Exon 23 und Intron 23. Schwarz = Exons, weiß = untranslatierte Regionen (UTR), grau = als Referenzsequenz dargestellte Bereiche.

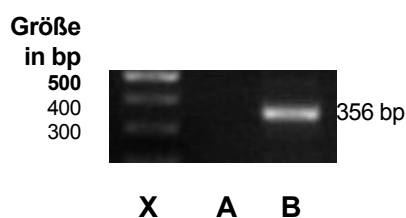
<sup>8</sup> [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Splice?db=core;g=ENSG00000116127;r=2:73385758-73610793](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Splice?db=core;g=ENSG00000116127;r=2:73385758-73610793), Stand: 10.04.2016

Mittels PCR wurde die Expression der Spleißvarianten in allen getesteten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, in PBMC-Proben, sowie in gesunden Geweben und Organen nachgewiesen. In Tabelle 3 sind die mit dem *Neutral Network Splice Site Prediction-Tool* ermittelten *splice site prediction scores* der jeweiligen Donor- und Akzeptorstellen dargestellt. Für das in der Literatur beschriebene Exon 1 (Hearn *et al.*, 2002) wurde dabei eine Akzeptorstelle mit einem niedrigen Score (0,47) gefunden. Es fanden sich keine Spleißstellen am 5'-Ende des vollständigen Exon 23 sowie an der Akzeptor-Spleißstelle des 3'-UTR-Exons, jedoch ergab die verkürzte Variante einen Score von 0,67, woraus sich das Spleißmuster von Exon 23 erklärt.

**Tabelle 3: Splice site prediction scores der Bereiche mit Spleißvarianten in ALMS1.**

Exon	Splice site	Score	Intron	Exon
[Exon 1	Akzeptor	0,47	cggctctccggccccgccc	agggcggggcggcactgcgccctaa]
Exon 1	Donor	0,95	ggagaag	gtgaggcg
Exon 2	Akzeptor	0,85	aagcctgctttgatttc	agattgtccattgacctgtca
Exon 2	Donor	1,00	tgatcag	gtatgtct
Exon 3	Akzeptor	0,86	tttccttaacattttct	agaaaacagaatcttggcattg
Exon 12	Donor	0,84	cattcag	gtattatg
Exon 13	Akzeptor	0,88	tactccccgttttctg	taggatccaatgatgccattgct
Exon 13	Donor	0,91	aatgcag	gtaactgg
Exon 14	Akzeptor	0,37	caaatgatgtcgttattcc	agatgcctcagttcaagtgcta
Exon 23, verkürzt	Donor	0,67	tactttt	gtgagtct
Exon 23, voll	Donor	-	-	-
3'-UTR-Exon	Akzeptor	-	-	-

#### 4.2.1 Alternativer Transkriptionsstart



**Abbildung 8: PCR-Produkt der Spleißvariante ohne Exon 2.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 (B) bzw. H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle (A) und der Primerkombination 1L und 4R\_A. Nachgewiesen wurde die Spleißvariante 1, in welcher die Exons 1, 3 und 4 enthalten sind, Exon 2 jedoch fehlt. Mit (X) gekennzeichnet ist der DNA-Größenmaßstab (GeneRuler™ 100 bp Plus).

Die Kombination des Primer-Paares 1\_neu\_A\_L, welcher sich in Exon 1 befindet, und 4R\_A, welcher sich in Exon 4 befindet, ergab, dass die vorliegende cDNA Exon 1 enthält, Exon 2

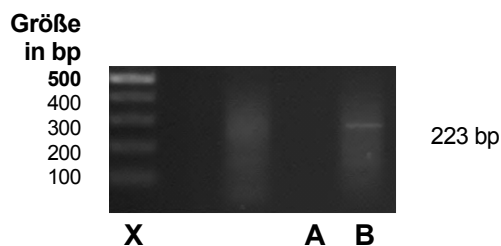
jedoch fehlt. Es schließt sich unmittelbar Exon 3 an (Variante 1). Das entsprechende PCR-Produkt ist in Abb. 8 und die dazugehörige Sequenz in Abb. 10 dargestellt.

1	ATAGACGACG	AGGAGGACGA	GGAGGCCAAG	GCCTGGCTGC	AGGCGCACCC	■ = Exon 1
51	CGGCAGGATT	TTGCCTCCGC	TGTCGCCCCC	GCAGCACCCG	TACTCGGAGG	
101	CCGAGCCGAC	CTCCCTGGAG	AAQAAAACAG	AATCTTGGCA	TTGTCTTCCT	■ = Exon 3
151	CAAGAAATGG	ACTCTTCCCA	AACCTTGGAT	ACATCCCAGA	CTAGGTTTAA	
201	TGTGAGAACG	GAAGATACTG	AAGTGACAGA	CTTCCCCTCT	CTGGAGGAGG	■ = Exon 4
251	GCATATTGAC	GCAATCAGAA	AATCAAGTAA	AGGAACCCAA	CAGAGATCTC	
301	TTCTGTTTCT	CACTGCTAGT	CATACAAGAT	AGCTTTGCTT	CTCCTGATTT	
351	GCCTTT					

**Abbildung 9: Sequenzergebnis der Spleißvariante 1 ohne Exon 2.**

Dargestellt ist das Sequenzergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 und der Primerkombination 1L und 4R\_A. Nachgewiesen wurde die Spleißvariante 1, in welcher die Exons 1, 3 und 4 enthalten sind, Exon 2 jedoch fehlt.

Kombiniert man jedoch den sense Primer 2L, der sich in Exon 2 befindet, welches wiederum in Variante 1 fehlt, mit dem antisense Primer 3R, welcher sich in Exon 3 befindet, erhält man ein sehr schwaches PCR-Produkt, dessen Sequenzierung ergab, dass sowohl Exon 2 als auch Exon 3 enthalten sind. Primer-Kombinationen, bei denen sich der sense Primer in Exon 1 (1L) oder am Übergang von Exon 1 und 2 (1,2L\_A), der antisense Primer in Exon 2 (2R) oder am Übergang von Exon 2 und 3 befindet (3R\_A), ergeben hingegen kein PCR-Produkt. Somit ist davon auszugehen, dass zudem eine Transkriptvariante vorliegt, in der Exon 2 den Anfang der cDNA von *ALMS1* darstellt. Weiterhin konnte keine Variante gefunden werden, die alle drei Exons hintereinander enthält. Das entsprechende PCR-Produkt ist in Abb. 10 und die dazugehörige Sequenz in Abb. 11 dargestellt.



**Abbildung 10: PCR-Produkt der Spleißvariante mit Exon 2.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 (B) bzw. H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle (A) und der Primerkombination 2L und 3R. Nachgewiesen wurde die Spleißvariante 2, in welcher die Exons 2 und 3 enthalten sind. Mit (X) gekennzeichnet ist der DNA-Größenmaßstab (GeneRuler™ 100 bp Plus).

1	AAGGCAATAG	TAGAACACAA	ATTCTGATA	CTAATGTGGT	CTGTTTGAA	■ = Exon 2
51	ACAACAGCTC	ACCGGGGTTT	TGGGGATGAT	CAGAAAACAG	AATCTTGGCA	
101	TTGTCTTCCT	CAAGAAATGG	ACTCTTCCCA	AACCTTGGAT	ACATCCCAGA	■ = Exon 3
151	CTAGGTTTAA	TGTGAGAACG	GAAGATACTG	AAGTGACAGA	CTTCCCCTCT	
201	CTGGAGGAGG	GCATATTGAC	GCA			

**Abbildung 11: Sequenzergebnis der Spleißvariante mit Exon 2.**

Dargestellt ist das Sequenzergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 und der Primerkombination 2L und 3R. Nachgewiesen wurde die Spleißvariante 2, in welcher die Exons 2 und 3 enthalten sind.

Um nähere Aussagen über den Transkriptionsstart treffen zu können, wurde eine Promoteranalyse mit dem *Neural Network Promoter Prediction Tool* durchgeführt. Für den Transkriptionsstart mit Exon 1 ergab die Promoteranalyse recht niedrige Scores von 0,51 bis 0,67 (siehe Abb. 12). Hingegen wird der Transkriptionsstart für Exon 2 mit einem höheren Score von 0,92 angegeben (siehe Abb. 13). Da die Promoteranalyse keinen eindeutigen Transkriptionsstart ergab, wurde versucht, den Transkriptionsstart von *ALMS1* mittels SMART-RACE zu überprüfen. Als *antisense* Primer wurden dazu 1R, 2R, 3R, 4R und 8.0R eingesetzt. Dies führte jedoch nicht zum Erfolg. Die Analyse der Sequenzen mit BLAST ergab keine Übereinstimmung mit dem aktuellen Referenzgenom. Die zugehörigen Sequenzen sind im Anhang auf S. 109-110 aufgeführt.

1	ACTTGTCTCA	CAGAACCGTG	AGCATCTAAT	GAGTTATTGT	ACAATAACCA	
51	ACCTATCACT	AAGTCCTTCA	CATTGATTAT	TTCCTTTAAT	TATCACACCC	
101	ATCCTATGCG	ATGGCCTATT	ATCATCGTTT	TATAAACACA	AAGTCACACC	
151	ACTTTAAGTG	GTGATGCCAG	GATTCAAACT	CCGATCTTTC	TGATGCCAGT	
201	GCCCAGTTCT	TAATCCCTCT	AACAACCCGT	GACACTTTTC	CACGGTTAGG	0,56
251	TTCAAGCGCC	CACCATACAG	CTTGACACTT	TAGGAGATAC	TCAACCTTTA	
301	AAACTTTATA	ATTGTCATGT	GTGATTATAA	CGGGTACGTC	CTAGAGTTTG	
351	ATCTCTTCTC	TGTGCAGGGG	CGAAACTCGA	CCCCAGCCGA	GAACCTACCT	0,51
401	GTCCTTGCGC	GGGGCCCTCT	GCGCCCCGGA	AGGCGCCCA	TCCCCGTTTA	
451	TTGTGAGCTT	ACAGTACAGT	TCGCAAGGTC	CCGGCCGGTG	ACGGCCGGCGA	
501	GGCCGCCAACG	TCGCCTGTAG	CAAACCTCCG	CCCTAAGGCG	TTCCCCGCCGG	0,55
551	GCCTCGCGCG	GCGTCCCTAG	CAACGCGCGC	GCGGTCTTCC	GGCCCCGCCCC	0,56
601	AGGCGGGCGG	CACTGCGCCT	AAGCTGGGCC	ACAACCGCCA	GTCAGGGCTC	0,56 – 0,67
651	TCCCCTTCCC	CTCCCTCCCC	CCCTCCTCCT	CCTCCTCTGC	CGCCAGAGC	
701	GAGACACCAA	CATGAGCCC				

**Abbildung 12: Promoteranalyse des Bereichs vor Exon 1.**

Die Promoteranalyse wurde mit dem *Neural Network Promoter Prediction Tool* erstellt. Die Promotersequenzen sind unter Angabe der Scores unterstrichen dargestellt. Das Startcodon ist grün markiert. Der vor dem Exon 1 gelegene genomische Bereich ist in grauer, Exon 1 in schwarzer Farbe dargestellt.

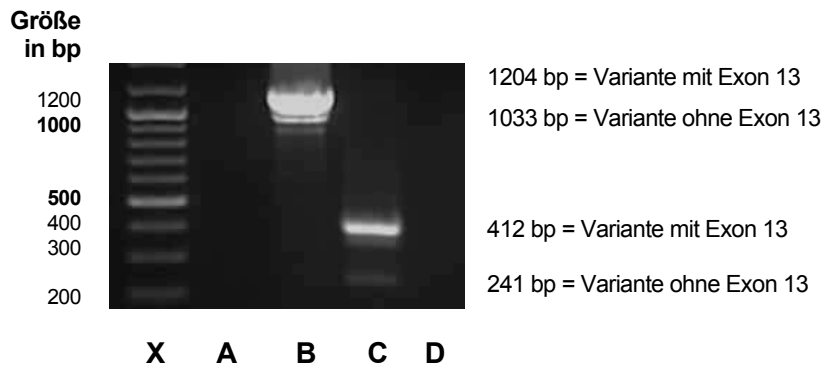
1	TATTGGGAAA	AATCTCAAGA	ACCAGTCCCT	GAACCAAGTG	GTGGCTTGAC	
51	CAGGTCATTT	TTGTTTTATT	GCCTGTAATC	TGTCCATTTG	TGTTCCCTTCA	
101	GCCTTTGGCT	ATGGTCACAA	CGTTTATTGC	CTTCTTTCAC	TAGTAGGAGA	
151	GCGCTGCTCC	AACCCCTTAC	TTCACAAAAT	GATTCTGACT	TTTGTTCCCA	
201	CTTCTTGTGC	TATGAGTTGA	TTTCAGTCCC	TATTATTGGG	GTTGATTTTT	
251	AACTGTCTCA	ACCAGTAAGA	TTTAAAAATA	GACAACCTGC	TTGTTTCTGT	0,57
301	TTGCTGCTTT	TACCTCTATG	GGTAAAGGAG	GTTAAGGAAC	TGCTGTGGTT	
351	TATGCAAAAAG	TATGCTGTGT	CCTAACTGAG	TAACCTTAAG	GATAAATAGCT	0,64
401	TGTATAATGG	TTGTGAAATC	AAAATGTGCT	ATAATGTAAA	GGGCTTTATA	0,92
451	AACTGGGAAG	TATGGTCTAA	ATATTAGTTT	ATTTTGTGTT	TATAATCATA	
501	GTGATTGTGT	TATTAECTTA	TTTAAGCCTG	CTTTTGATTT	TCAGATGTTT	0,56
551	CCATTGACCT	GTCATGTATG	GCAACAGATA	GTATATCAAG	GCAATAGTAG	

**Abbildung 13: Promoteranalyse des Bereichs vor Exon 2.**

Die Promoteranalyse wurde mit dem *Neural Network Promoter Prediction Tool* erstellt. Die Promotersequenzen sind unter Angabe der Scores unterstrichen dargestellt. Intron 1 ist in grauer, Exon 2 in schwarzer Farbe dargestellt.

### 4.2.2 Skipping von Exon 13

Diese neue Spleißvariante mit fehlendem Exon 13 ist von unserer Arbeitsgruppe bereits beobachtet worden. Ihr Vorliegen in der Zelllinie L-1236 konnte im Rahmen der vorliegenden Studie bestätigt werden. Die entsprechenden PCR-Produkte sind in Abb. 14 und die Sequenzerggebnisse in den Abb. 15 und 16 dargestellt.



**Abbildung 14: PCR-Produkte der Spleißvarianten mit und ohne Exon 13.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 (B, C) bzw. H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle (A, D) und der Primerkombination B5 und A3 (C, D) bzw. 16R (A, B). Nachgewiesen wurde die Spleißvariante ohne Exon 13. Die obere Bande (Produktgrößen 1204 bp bzw. 412 bp) entspricht jeweils der Variante mit Exon 13, die untere Bande (Produktgrößen 1033 bp bzw. 241 bp) entspricht der Spleißvariante ohne Exon 13. Mit (X) gekennzeichnet ist der DNA-Größenmaßstab (GeneRuler™ 100 bp Plus).

1	ACGCCAAAGCT	CCTGTCAAGT	TGCGCTCATC	ATCTTCAGTC	CAACAGGTTA	
51	CTTTTTCTCG	CGGCACAGAT	GGCCAGCCTT	TATTATTGCC	ATATAAGCCT	■ = Exon 12
101	TCTGGTAGTA	CCAAGATGTA	TTATGTTCCA	CAATTAAGAC	AAATTCCTCC	■ = Exon 13
151	ATCTCCGGAT	TCCAAATCAG	ATACCACCGT	TGAAAGCTCC	CATTCAGGAT	■ = Exon 14
201	CCAATGATGC	CATTGCTCCA	GACTTCCCAG	CTCAGGTGCT	AGGCACAAGA	
251	GATGATGACC	TCTCAGCCAC	TGTTAACATT	AAACATAAAG	AAGGAATCTA	
301	CAGTAAGAGG	GTAGTGACTA	AGGCATCCTT	GCCAGTGCGA	GAAAAACCCT	
351	TGCAGAATGA	AAATGCAGAT	GCCTCAGTTC	AAGTGCTAAT	CACTGGGGAT	
401	GAGAACCCTCT	CAGACAAAAA	ACAGCAAGAG	ATTCACAGTA	CAAGGGCAGT	
451	GACTGAGGCT	GCCCAGGCTA	AAGAAAAAGA	ATCTTTGCAG	AAAGATACTG	
501	CAGATTCCAG	TGCTGCTGCT	GCTGCAGAGC	ACTCAGCTCA	AGTAGGAGAC	
551	CCAGAAATGA	AGAACTTGCC	AGACACTAAA	GCCATTACAC	AGAAAGAGGA	
601	GATCCATAGG	AAGAAGACAG	TTCCCAGGGA	AGCCTGGCCA	AACAATAAAG	
651	AATCCCTACA	GATCAATATT	GAAGAGTCCG	AATGTCATTC	AGAATTTGAA	
701	AATACTACCC	GTTCTGTCTT	CAGGTCAGCA	AAGTTTACAC	TTCATCATCC	
751	CGTACACCTA	CCAAGTGATC	AAGATATTTG	CCATGAATCT	TTGGGAAAGA	
801	GTGTTTTTCAT	GAGACATTCT	TGGAAAGATT	TCTTTCAGCA	TCATCCAGAC	
851	AAACATAGAG	AACACATGTG	TCTTCTCTTT	CCTTATCAAA	ACATGGACAA	
901	GACTAAGACA	GATTATACCA	GAATAAAGAG	CCTCAGCATC	AATGTGAATT	
951	TGGGAAACAA	AGAAGTGATG	GATACTACTA	AAAGTCAAGT	TAGAGATTAT	
1001	CCAAAACATA	ATGGACAAAT	TAGTGATCCA	CAAAGGGATC	AGAAGGTCAC	
1051	CCCAGAGCAA	ACAATCAGC	ACACTGTGAG	TTTGAATGAA	CTGTGGAACA	
1101	AGTATCGGGA	GCGACAGAGG	CAACAGAGAC	AGCCTGAGTT	GGGTGACAGG	
1151	AAAGAAGTGT	CCTTGGTGGA	CCGACTTGAT	CGTTTGGCTA	AAATTCCTCA	
1201	GAAT					

**Abbildung 15: Sequenzerggebnis der Spleißvariante mit Exon 13.**

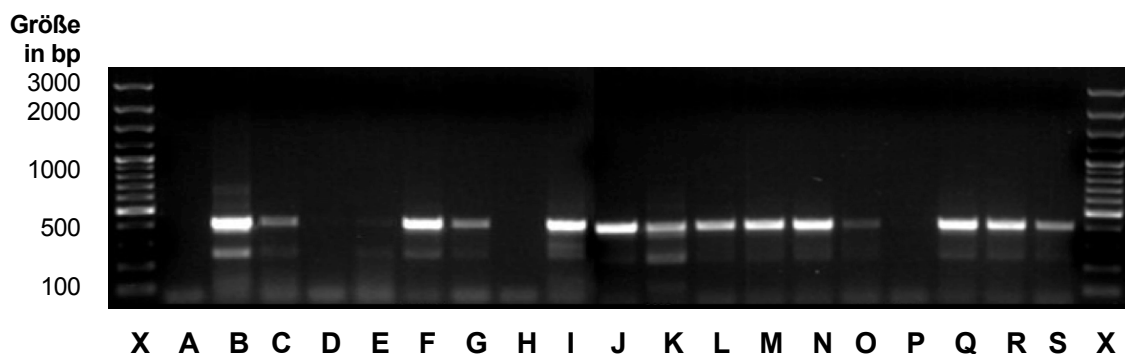
Dargestellt ist das Sequenzerggebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 und der Primerkombination B5 und 16R. Nachgewiesen wurde die Variante mit Exon 13, welche der oberen Bande in Abb. 14 entspricht und der Referenzsequenz entspricht.

1	ACGCAAAGCT	CCTGTCAAGT	TGCGCTCATC	ATCTTCAGTC	CAACAGGTTA	
51	CTTTTTCTCG	CGGCACAGAT	GGCCAGCCTT	TATTATTGCC	ATATAAGCCT	█ = Exon 12
101	TCTGGTAGTA	CCAAGATGTA	TTATGTTCCA	CAATTAAGAC	AAATTCCTCC	█ = Exon 14
151	ATCTCCGGAT	TCCAAATCAG	ATACCACCGT	TGAAAGTCC	CATTCAGATG	
201	CCTCAGTTCA	AGTGCTAATC	ACTGGGGATG	AGAACCTCTC	AGACAAAAAA	
251	CAGCAAGAGA	TTCACAGTAC	AAGGGCAGTG	ACTGAGGCTG	CCCAGGCTAA	
301	AGAAAAAGAA	TCTTTGCAGA	AAGATACTGC	AGATTCCAGT	GCTGCTGCTG	
351	CTGCAGAGCA	CTCAGCTCAA	GTAGGAGACC	CAGAAATGAA	GAACTTGCCA	
401	GACACTAAAG	CCATTACACA	GAAAGAGGAG	ATCCATAGGA	AGAAGACAGT	
451	TCCCGAGGAA	GCCTGGCCAA	ACAATAAAGA	ATCCCTACAG	ATCAATATTG	
501	AAGAGTCCGA	ATGTCATTCA	GAATTTGAAA	ATACTACCCG	TCTGTCTTTC	
551	AGGTGAGCAA	AGTTTTACAT	TCATCATCCC	GTACACCTAC	CAAGTGATCA	
601	AGATAATTTG	CATGAATCTT	TGGGAAAGAG	TGTTTTCATG	AGACATCTTT	
651	GGAAAGATTT	CTTTCAGCAT	CATCCAGACA	AACATAGAGA	ACACATGTGT	
701	CTTCCTCTTC	CTTATCAAAA	CATGGACAAG	ACTAAGACAG	ATTATACCAG	
751	AATAAAGAGC	CTCAGCATCA	ATGTGAATTT	GGGAAACAAA	GAAGTGATGG	
801	ATACTACTAA	AAGTCAAGTT	AGAGATTATC	CAAAACATAA	TGGACAATTT	
851	AGTGATCCAC	AAAGGGATCA	GAAGGTCACC	CCAGAGCAAA	CAACTCAGCA	
901	CACTGTGAGT	TTGAATGAAC	TGTGGAACAA	GTATCGGGAG	CGACAGAGGC	
951	AACAGAGACA	GCCTGAGTTG	GGTGACAGGA	AAGAAGTGTG	CTTGGTGGAC	
1001	CGACTTGATC	GTTTGGCTAA	AATTCTTCAG	AAT		

**Abbildung 16: Sequenzerggebnis der Spleißvariante ohne Exon 13.**

Dargestellt ist das Sequenzerggebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 und der Primerkombination B5 und 16R. Nachgewiesen wurde die Spleißvariante ohne Exon 13, welche der unteren Bande in Abb. 14 entspricht.

Diese Spleißvariante ohne Exon 13 liegt sowohl in anderen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien als auch in gesundem Gewebe vor (siehe Abb. 17). Als Qualitätskontrolle der cDNAs wurde eine PCR des *housekeeping* Gens *ACTB* durchgeführt (siehe Anhang S. 80).



**Abbildung 17: PCR-Produkte der Spleißvarianten mit und ohne Exon 13 in verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und gesundem Gewebe.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung der Primerkombinationen B5 (sense Primer) und A3 (antisense Primer) und cDNA aus verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (L-1236-, L-428, L-540) mit gesunden Zellen des peripheren Blutes (BC3 = Buffy Coat) und anderen Geweben im Vergleich. Die obere Bande (Produktgröße: 412 bp) entspricht jeweils der Variante mit Exon 13, die untere Bande (Produktgröße: 241 bp) entspricht der Spleißvariante ohne Exon 13.

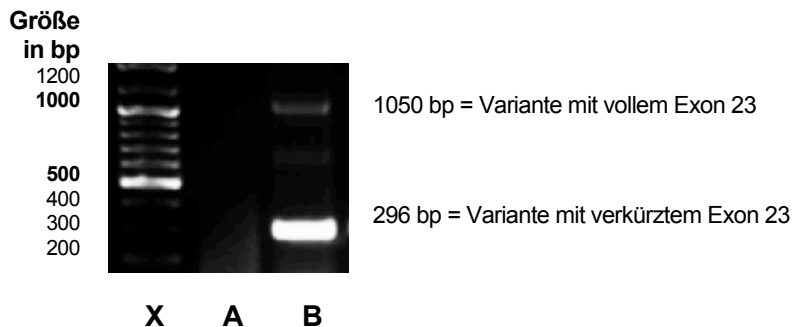
**X** = DNA-Größenmaßstab  
(GeneRuler™ 100 bp Plus)  
**A** = Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)  
**B** = L-1236  
**C** = L-428  
**D** = L-540  
**E** = BC3

**F** = Lymphknoten  
**G** = Milz  
**H** = Hoden  
**I** = Ovar  
**J** = Gehirn  
**K** = Cerebellum  
**L** = Niere

**M** = Mamma  
**N** = Thymus  
**O** = Skelettmuskel  
**P** = Plazenta  
**Q** = Schilddrüse  
**R** = Pankreas  
**S** = Lunge

### 4.2.3 Alternative 5'-splice sites von Exon 23

Bei der Sequenzanalyse stellte sich heraus, dass unterschiedliche 5'-splice sites vorliegen, was zu einer Spleißvariante mit Verkürzung von Exon 23 um 237 bp führt. Weiterhin liegt eine Spleißvariante vor, in der das Exon 23 vollständig vorhanden ist und nachfolgend das gesamte Intron 23 sowie das nachfolgende Exon als 3'-UTR enthält. Das 3'-UTR-Exon ist in der genomischen DNA-Sequenz bei Ensembl als transkribiertes Exon gekennzeichnet, weshalb dafür ein spezifisches Primerpaar entworfen wurde.



**Abbildung 18: PCR-Produkt der Spleißvarianten mit alternativen 5'-splice sites von Exon 23.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 (B) bzw. H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle (A) und der Primerkombination 23L und 3UTR\_R. Nachgewiesen wurden Spleißvarianten mit alternativen 5'-splice sites von Exon 23. Die obere Bande (Produktgröße: 1050 bp) entspricht der Variante mit vollem Exon 23 und Intron 23, die untere Bande (Produktgröße: 296 bp) entspricht der Spleißvariante mit verkürztem Exon 23. Mit (X) gekennzeichnet ist der DNA-Größenmaßstab (GeneRuler™ 100 bp Plus).



**Abbildung 19: Sequenzergebnis Spleißvariante mit vollem Exon 23 und Intron 23.**

Dargestellt ist das Sequenzergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 und der Primerkombination 23L und 3UTR\_R. Nachgewiesen wurde die Spleißvariante mit vollem Exon 23 und Intron 23, welche der oberen Bande in Abb. 18 entspricht.



Da das Stopp-Codon im vorderen Abschnitt von Exon 23 liegt, welcher in beiden Transkriptvarianten vorhanden ist, ergibt sich aus dieser Spleißvariante jedoch keine Änderung der Proteinsequenz. Die entsprechenden PCR-Produkte sind in Abb. 18 und die Sequenzierergebnisse in den Abb. 19 und 20 dargestellt.

```

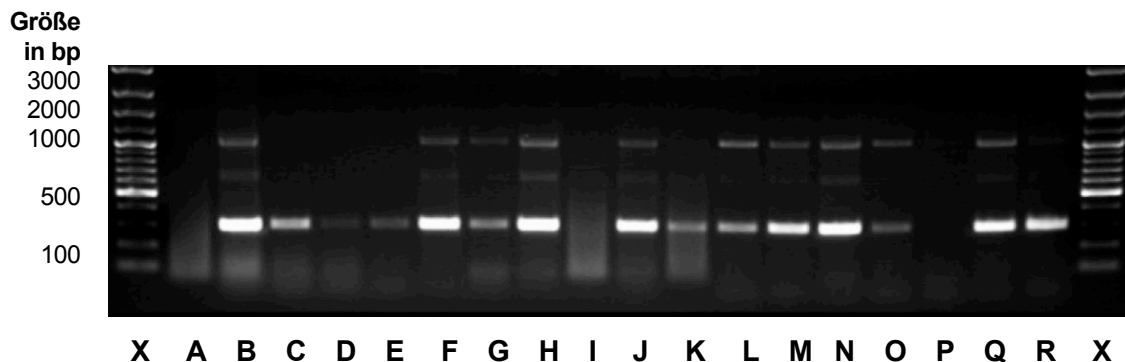
1      CCCTGGGACT GACACAAGTT TATTTTCCTC AGAGCCTTGG AATTCTATTT
51     TATGAACCTA GAGAAGCAGA ATCCTTACTT TTCTAAGGCC CAAAGTAATG
101    GAGGAAGGTT TTCAACAGCC TCACTCTAAG TTCAGCAAAC CCCAGTACAA
151    AGATTGGCAA GGGCCAGTCA TCCACCGAGA AGGCTTCCTG GGAGGCTGGA
201    TCCAAGAGCA GGCCCTGCC TCAAGCACGG TTCAGAGCTT TCAGATCCTG
251    CCCCTGGGC  TCCCTGCCAT GAAGAGGACA CTGGGAAAAG AACCCA

```

**Abbildung 20: Sequenzergebnis Spleißvariante mit verkürztem Exon 23.**

Dargestellt ist das Sequenzergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA der Zelllinie L-1236 und der Primerkombination 23L und 3UTR\_R. Nachgewiesen wurde die Spleißvariante mit verkürztem Exon 23, welche der unteren Bande in Abb. 18 entspricht.

Auch diese Spleißvariante liegt sowohl in anderen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, als auch in gesunden Geweben vor (siehe Abb. 21). Als Qualitätskontrolle der aus den Hodgkin-Lymphomzellen und gesundem Gewebe extrahierten cDNA wurde eine PCR des housekeeping Gens *ACTB* durchgeführt (siehe Anhang S. 80).



**Abbildung 21: PCR-Produkte der Spleißvarianten mit alternativen 5'-splice sites von Exon 23 in verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien und gesunden Geweben.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung der Primerkombinationen 23L (sense Primer) und 3UTR\_R (antisense Primer) und cDNA aus verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (L-1236-, L-428, L-540) mit gesunden Zellen des peripheren Blutes (BC3 = Buffy Coat) und anderen gesunden Geweben im Vergleich. Die obere Bande (Produktgröße: 709 bp) entspricht jeweils der Variante mit vollem Exon 23 und Intron 23, die untere Bande (Produktgröße: 423 bp) entspricht der Spleißvariante mit verkürztem Exon 23.

**X** = DNA-Größenmaßstab  
(GeneRuler™ 100 bp Plus)  
**A** = Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O)  
**B** = L-1236  
**C** = L-428  
**D** = L-540  
**E** = BC3

**F** = Lymphknoten  
**G** = Milz  
**H** = Hoden  
**I** = Ovar  
**J** = Gehirn  
**K** = Cerebellum  
**L** = Niere

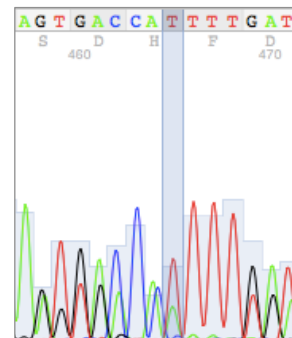
**M** = Mamma  
**N** = Thymus  
**O** = Skelettmuskel  
**P** = Plazenta  
**Q** = Schilddrüse  
**R** = Pankreas

### 4.3 Analyse von Polymorphismen

Mittels Sequenzierung wurde die Sequenz der L-1236-Zellen auf das Vorliegen von Polymorphismen hin untersucht. Dabei fanden sich 7 *single nucleotide* Polymorphismen (SNPs). Insgesamt sind 1.257 Variationen von *ALMS1* in Ensembl<sup>9</sup> gelistet. Insgesamt konnten 7 von der Referenzsequenz<sup>10</sup> abweichenden SNPs in der cDNA der L-1236-Zellen nachgewiesen werden, wobei 5 SNPs in heterozygoter und 2 SNPs in homozygoter Variante vorlagen. Alle weiteren Sequenzierungsergebnisse entsprachen der Referenzsequenz.

#### rs191091347

Der SNP rs191091347 befindet sich in Exon 5 an bp 39.669 der genomischen DNA von *ALMS1*. In der cDNA der Zelllinie L-1236 liegt er in homozygoter Form als Thymin vor. In der Gesamtbevölkerung liegt rs191091347 überwiegend als Thymin vor, nur in 0,002% der Fälle liegt ein Basenaustausch mit Cytosin vor (Ensembl Genome Browser, Stand: 15.04.2015). Ein Aminosäureaustausch ergibt sich durch die Mutation nicht, da sowohl CAT als auch CAC für die Aminosäure Histidin codieren.



**Abbildung 22: Histogramm des SNP rs191091347.**

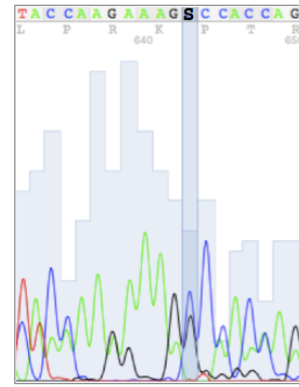
Die PCR erfolgte mit cDNA aus der Zelllinie L-1236 und der Primer-Kombination 4L (sense Primer) und 8.0R (antisense Primer). Die Sequenzierung erfolgte mit dem sense Primer. Der Basenaustausch ist blau markiert. Die Qualitätsdaten der Sequenz werden als blauen Balken im Hintergrund des Histogramms angezeigt.

<sup>9</sup> [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSG00000116127;r=2:73385758-73610793;t=ENST00000613296](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Transcript/ProtVariations?db=core;g=ENSG00000116127;r=2:73385758-73610793;t=ENST00000613296)  
Stand: 16.04.2015

<sup>10</sup> ENSG00000116127: [http://www.ensembl.org/Homo\\_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000116127;r=2:7338575873610793;t=ENST00000613296](http://www.ensembl.org/Homo_sapiens/Gene/Sequence?db=core;g=ENSG00000116127;r=2:7338575873610793;t=ENST00000613296)  
Stand: 16.04.2015

**rs377283762**

Der SNP rs377283762 befindet sich in Exon 7 an bp 47.041 der genomischen *ALMS1*-DNA der Referenzsequenz. In der cDNA der Zelllinie L-1236 liegt er in heterozygoter Form als Guanin/Cytosin vor. Die Allelhäufigkeit von Guanin beträgt in der europäisch-amerikanischen Bevölkerung nur 0,002 % (Ensembl Genome Browser, Stand: 15.04.2015). Es handelt sich dabei um eine *missense*-Mutation, die einen Aminosäureaustausch von Prolin zu Alanin an Position 448 des *ALMS1*-Proteins bewirkt.

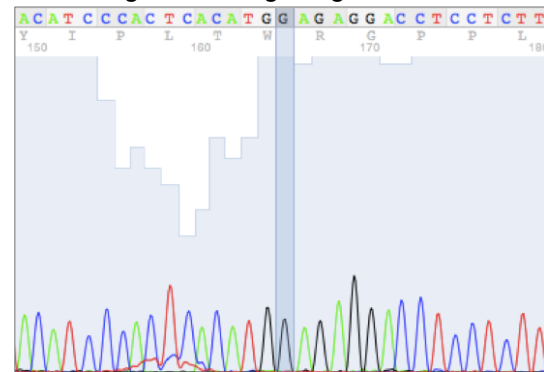


**Abbildung 23: Histogramm des SNP rs377283762.**

Die PCR erfolgte mit cDNA aus der Zelllinie L-1236 und der Primer-Kombination 4L (sense Primer) und 8.0R (antisense Primer). Die Sequenzierung erfolgte mit dem sense Primer. Der Basenaustausch ist blau markiert. Die Qualitätsdaten der Sequenz werden als blauen Balken im Hintergrund des Histogramms angezeigt.

**rs2037814**

Dieser Polymorphismus befindet sich in Exon 8 an bp 63.385 der genomischen *ALMS1*-DNA. In der Zelllinie L-1236 liegt er in homozygoter Form als Guanin vor. In der Gesamtbevölkerung kommt dieser SNP zu 84 % als Guanin und zu 14 % als Thymin vor (Ensembl Genome Browser, Stand: 15.04.2015). Die *missense*-Mutation führt zu einem Austausch der Aminosäure Valin gegen Glycin an Position 673 des *ALMS1*-Proteins.

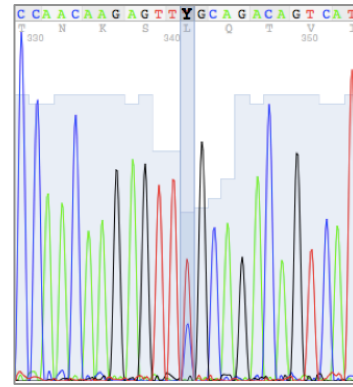


**Abbildung 24: Histogramm des SNP rs2037814.**

Die PCR erfolgte mit cDNA aus der Zelllinie L-1236 und der Primer-Kombination 8\_neu\_A\_L (sense Primer) und 8\_neu\_D\_R (antisense Primer). Die Sequenzierung erfolgte mit dem sense Primer. Der Basenaustausch ist blau markiert. Die Qualitätsdaten der Sequenz werden als blauen Balken im Hintergrund des Histogramms angezeigt.

**rs7598901**

Dieser SNP befindet sich in Exon 8 an bp 63.559 der genomischen *ALMS1*-DNA. In der Zelllinie L-1236 liegt er in heterozygoter Form als Cytosin/Thymin vor. In der Gesamtbevölkerung liegt zu 54 % Thymin und zu 46 % Cytosin vor (Ensembl Genome Browser, Stand: 15.04.2015). Die Mutation hat keinen Aminosäureaustausch zur Folge, da sowohl TTC als auch TTT für Phenylalanin codieren.

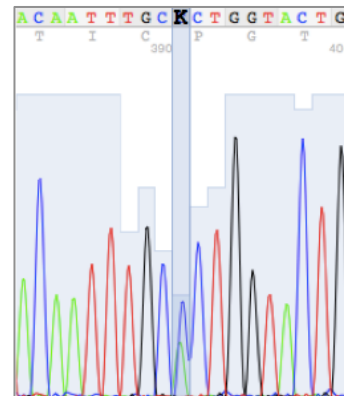


**Abbildung 25: Histogramm des SNP rs7598901.**

Die PCR erfolgte mit cDNA aus der Zelllinie L-1236 und der Primer-Kombination 8\_neu\_A\_L (sense Primer) und 8\_neu\_B\_R (antisense Primer). Die Sequenzierung erfolgte mit dem sense Primer. Der Basenaustausch ist blau markiert. Die Qualitätsdaten der Sequenz werden als blauen Balken im Hintergrund des Histogramms angezeigt.

**rs2056486**

Der SNP rs2056486 befindet sich in Exon 10 an bp 105.282 der genomischen *ALMS1*-DNA und liegt in der Zelllinie L-1236 in heterozygoter Form als Guanin/Thymin vor. In der Gesamtbevölkerung liegt in 67 % der Fälle Guanin und in 33 % Thymin vor (Ensembl Genome Browser, Stand: 15.04.2015). Durch die hier vorliegende *missense*-Mutation ergibt sich ein Aminosäureaustausch von Arginin zu Serin an Position 2828 des *ALMS1*-Proteins.

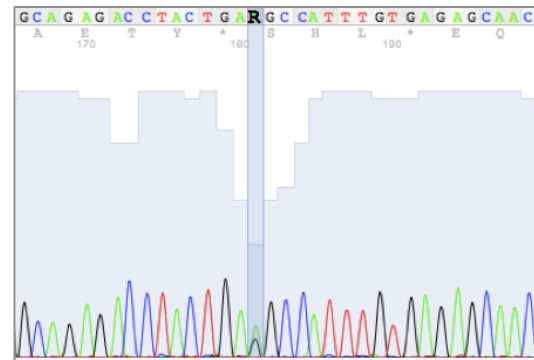


**Abbildung 26: Histogramm des SNP rs2056486.**

Die PCR erfolgte mit cDNA aus der Zelllinie L-1236 und der Primer-Kombination 9L (sense Primer) und 10R (antisense Primer). Die Sequenzierung erfolgte mit dem antisense Primer. Der Basenaustausch ist blau markiert. Die Qualitätsdaten der Sequenz werden als blauen Balken im Hintergrund des Histogramms angezeigt.

**rs1052161**

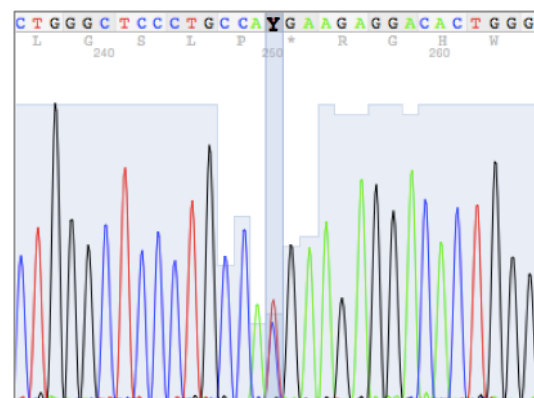
Der SNP rs1052161 befindet sich in Exon 19 an bp 216.253 und liegt in den L-1236-Zellen als heterozygote Variante mit Adenin/Guanin vor. In der Gesamtbevölkerung liegt in 58 % der Fälle Adenin, in 42 % Guanin vor (Ensembl Genome Browser, Stand: 15.04.2015). Durch die *missense*-Mutation ergibt sich ein Aminosäureaustausch von Arginin gegen Lysin an Position 4031 des ALMS1-Proteins.



**Abbildung 27: Histogramm des SNP rs1052161.**

Die PCR erfolgte mit cDNA aus der Zelllinie L-1236 und der Primer-Kombination 20L (sense Primer) und 23R\_A (antisense Primer). Die Sequenzierung erfolgte mit dem sense Primer. Der Basenaustausch ist blau markiert. Die Qualitätsdaten der Sequenz werden als blauen Balken im Hintergrund des Histogramms angezeigt.

**rs6546856:** Der SNP rs6546856 befindet sich im 3'-UTR-Exon nach Exon 23 an bp 225.466. In der Zelllinie L-1236 liegt er als heterozygote Form als Thymin/Cytosin vor. In der Gesamtbevölkerung liegt in 66 % Thymin und in 34 % Cytosin vor (Ensembl Genome Browser, Stand: 15.04.2015). Da sich rs6546856 in einem untranslatierten Bereich nach Exon 23 befindet, bewirkt die Mutation keine Veränderung der Proteinsequenz.



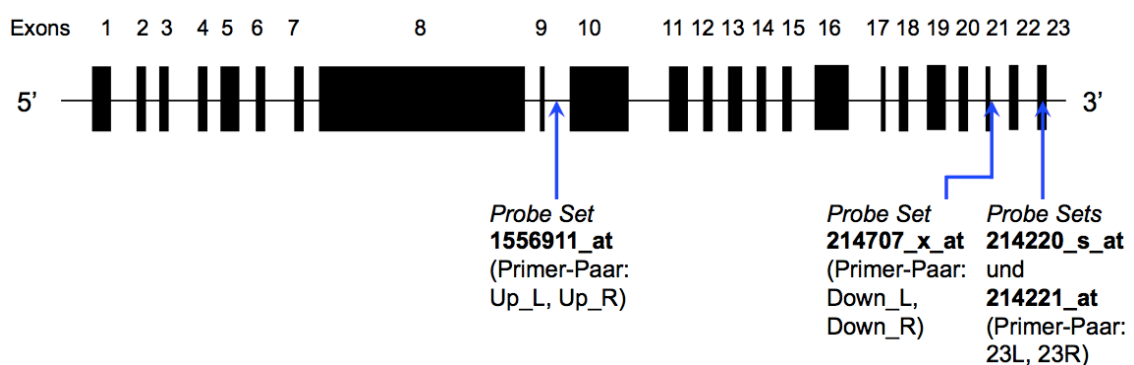
**Abbildung 28: Histogramm des SNP rs6546856.**

Die PCR erfolgte mit cDNA aus der Zelllinie L-1236 und der Primer-Kombination 23L (sense Primer) und 3UTR\_R (antisense Primer). Die Sequenzierung erfolgte mit dem sense Primer. Der Basenaustausch ist blau markiert. Die Qualitätsdaten der Sequenz werden als blauen Balken im Hintergrund des Histogramms angezeigt.

#### 4.4 Microarray-Daten zu ALMS1

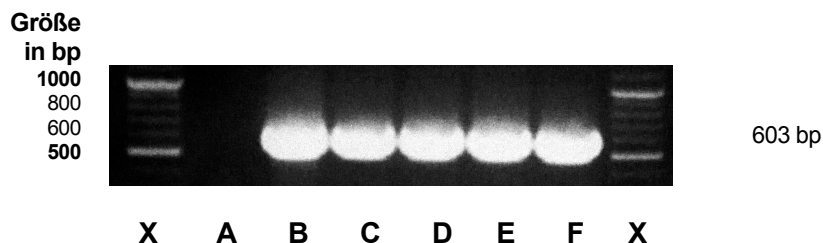
Mittels DNA-Microarray-Analysen wurde das Expressionsverhalten sämtlicher Gene in Hodgkin-Lymphom-Zellen unterschiedlicher Zelllinien, Hodgkin-Lymphom-Gewebeproben und normalem Gewebe unterschiedlicher Herkunft (*normal body atlas*, NBA) und im Vergleich zur Zelllinie NTERA-2 eines embryonalen Karzinoms des Hodens untersucht.

Dazu wurden die Datensätze GSE2109 (*Expression Project for Oncology, expO*), GSE3526, GSE7307 (Roth *et al.*, 2006), GSE12427 (Lin *et al.*, 2010), GSE12453 (Brune *et al.*, 2008), GSE14879 (Eckerle *et al.*, 2009), GSE20011 (Köchert *et al.*, 2011), GSE25986 (Steidl *et al.*, 2011) und GSE26325 (Staeger *et al.*, 2008) genutzt. Zur Analyse des Expressionsmusters von *ALMS1* wurden die Sondensätze 214707\_x\_at, 214220\_s\_at und 214221\_at herangezogen, sowie der Sondensatz 1556911\_at für *ALMS1-IT*. Auffällig sind dabei die unterschiedlichen Expressionsstärken der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien innerhalb der verschiedenen Sondensätze. Die Signalstärken der jeweiligen Sondensätze sind in den Abb. 31 bis 34 dargestellt. Der Sondensatz 214707\_x\_at weist in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236, L-428, L-540, KM-H2 und HDLM-2 im Vergleich zu humanen Gewebeproben ohne pathologischen Veränderungen eine verminderte Expression auf, während die Expression der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien beim Sondensatz 1556911\_at, welches *ALMS1-IT* entspricht, im Vergleich zu normalen Gewebe- und Organproben erhöht ist. Die Sondensätze 214220\_s\_at und 214221\_at weisen vor allem für die chemoresistente Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-1236 eine verminderte Expression von *ALMS1* sowohl im Vergleich zu anderen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, als auch zu Normalgewebe auf. Mit Hilfe des Tools Primer3Plus wurden spezifische Primer für die jeweiligen Target-Sequenzen der DNA-Microarray-Probe-Sets 214707\_x\_at (Primer-Paar: Down\_L, Down\_R), 1556911\_at (Primer-Paar: Up\_L, Up\_R), 214220\_s\_at und 214221\_at (Primer-Paar für beide Sondensätze: 23L, 23R) entworfen. Die Benennung erfolgte entsprechend der Up- bzw. Downregulation der Expression der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im *Microarray* bzw. bei den Sondensätzen 214220\_s\_at und 214221\_at entsprechend des in der Target-Sequenz gelegenen Exons. Die Lokalisationen der Target-Sequenzen innerhalb des *ALMS1*-Transkriptes sind in Abb. 29 dargestellt. Sequenzanalysen der verschiedenen Target-Sequenzen der Sondensätze ergaben, dass nur die Target-Sequenzen der Sondensätze 214220\_s\_at und 214221\_at tatsächlich in den untersuchten *ALMS1*-Transkripten enthalten sind.



**Abbildung 29: Lokalisation der Target-Sequenzen der zur DNA-Microarray-Analyse verwendeten Sondensätze in *ALMS1*.**

Die Target-Sequenz des Sondensatzes 1556911\_at befindet sich in einem Bereich zwischen Exon 9 und 10 und codiert für *ALMS1-IT* (*ALMS1 intronic transcript*). Somit kommt die Target-Sequenz nicht innerhalb des *ALMS1*-Transkriptes vor. Die Target-Sequenz des Sondensatzes 214707\_x\_at liegt laut der NCBI-Referenzsequenz in der genomischen DNA im Bereich nach Exon 21. Nach der Referenzsequenz von Ensembl liegt sie als Teil von Exon 21 vor. Die Sequenzanalyse der PCR-Amplifikate der vorliegenden Arbeit ergab, dass diese in den untersuchten Proben nicht von *ALMS1*-Transkripten stammen, sondern einer repetitiven *Alu*-artigen Sequenz des *ALMS1*-Lokus entsprechen (siehe Anhang S. 76-80). Die Kombination aus stromauf- bzw. stromabwärts gelegenen Primern ergeben sowohl bei L-1236-Zellen, als auch in gesundem Gewebe (PBMC, Gehirn, Cerebellum, Mamma, Thymus) ein eindeutiges PCR-Produkt mit nur einer Bande (siehe Abb. 30), dessen Sequenzabfolge die der NCBI-Referenzsequenz entsprechende Form von Exon 21 enthält, und keinerlei Anhalt für das Vorliegen zweier Transkripte gibt (siehe Anhang S. 76-80).



**Abbildung 30: PCR-Produkte der Exons 20 bis 23.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung von cDNA aus PBMC (B), Gehirn (C), Cerebellum (D), Mamma (E) und Thymus (F) bzw. H<sub>2</sub>O als Negativkontrolle (A) und der Primerkombination 20L und 23R\_A.

**X** = DNA-Größenmaßstab (GeneRuler™ 100 bp Plus)

**A** = Negativkontrolle (H<sub>2</sub>O), Primer-Paar 20L + 23R\_A

**B** = cDNA PBMC, Primer-Paar 20L + 23R\_A

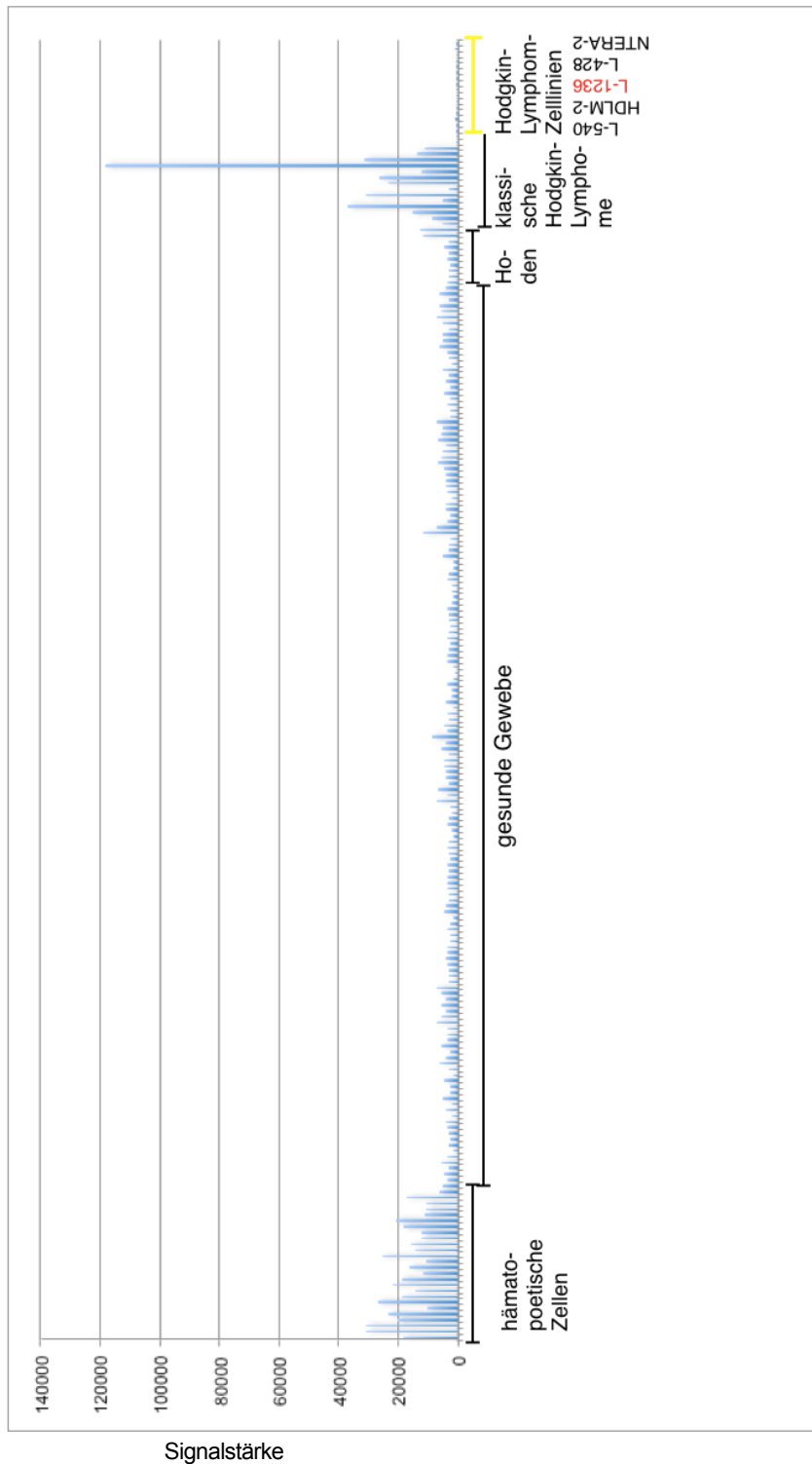
**C** = cDNA Gehirn, Primer-Paar 20L + 23R\_A

**D** = cDNA Cerebellum, Primer-Paar 20L + 23R\_A

**E** = cDNA Mamma, Primer-Paar 20L + 23R\_A

**F** = cDNA Thymus, Primer-Paar 20L + 23R\_A

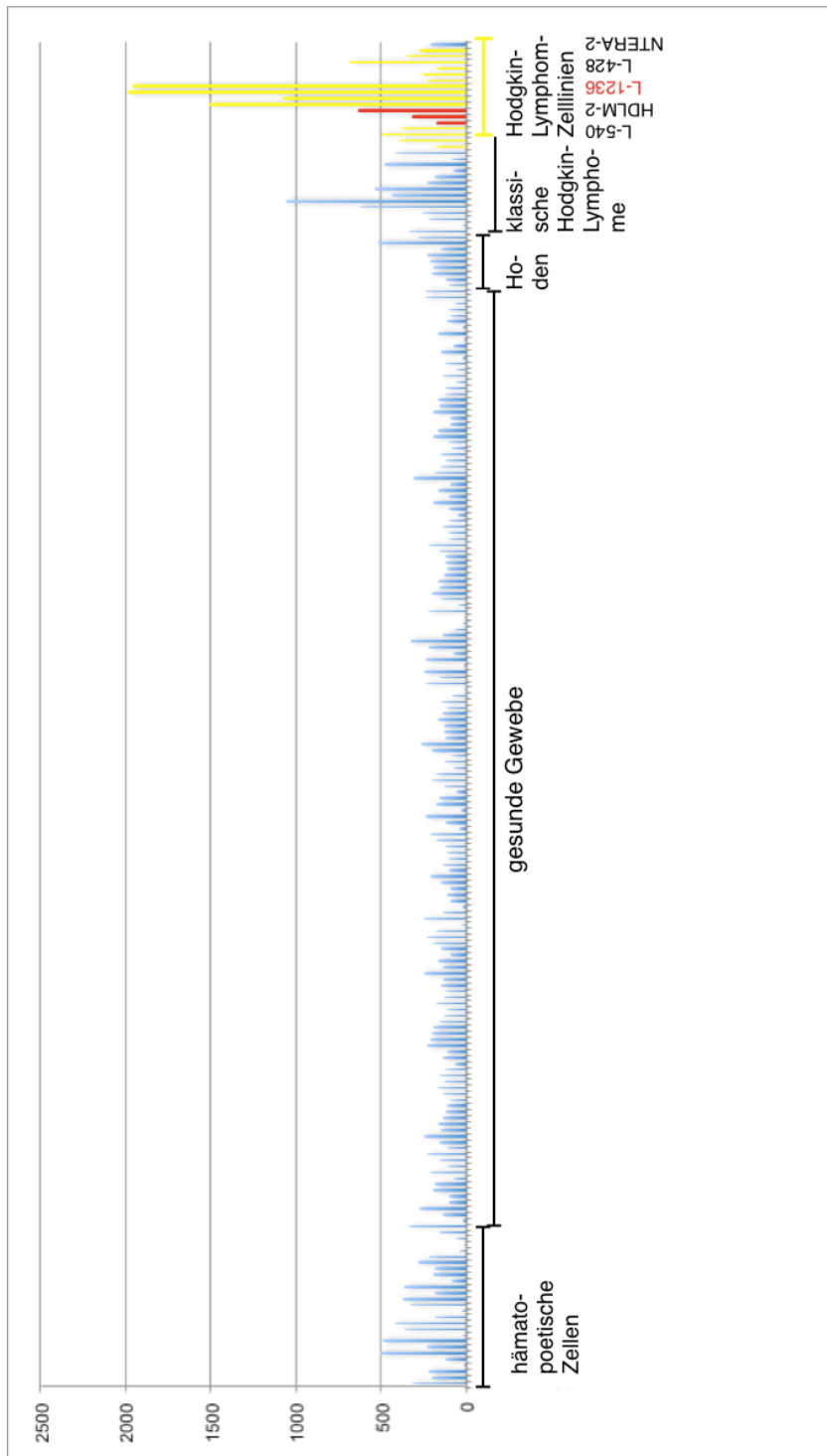
Primer-Kombinationen der Primer Down\_L bzw. Down\_R mit einem komplementären Primer eines jeweils davor- bzw. dahinterliegenden Exon (z.B. mit 23R\_B, 23R\_C, 3UTR\_R) lieferten nicht die entsprechenden Ergebnisse, sondern brachten nur unspezifische PCR-Produkte hervor (siehe Anhang S. 75-80). Beispielsweise ergab die Kombination von Down\_L und 23R\_B als *antisense* Primer ein Produkt mit einer Sequenzidentität von 87 % zu genomischer DNA auf Chromosom 19, während Kombinationen von Down\_L mit anderen *antisense* Primern keine Ähnlichkeiten zu bekannten Nukleinsäuresequenzen aufweisen. Daher wurden nur die *Microarray*-Daten der Sondensätze 214220\_s\_at und 214221\_at zur weiteren Auswertung des Expressionsverhaltens von *ALMS1* herangezogen.



**Abbildung 31: Signalstärken verschiedener Gewebe im DNA-Microarray, Sondensatz 214707\_x\_at.**

Es sind Signalstärken von DNA-Microarray-Expressionsdaten dargestellt. Die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (gelb, sehr niedrige Säulen) weisen im Vergleich zu anderen Geweben des normal body atlas (blau) eine niedrige Expression auf. Die Reihenfolge der Proben entspricht den im Anhang auf S. 98-107 aufgelisteten Datensätzen. Der Sondensatz 214707\_x\_at entspricht einer im ALMS1-Transkript nicht enthaltenen, jedoch in der genomischen DNA enthaltenen Region nach Exon 21.

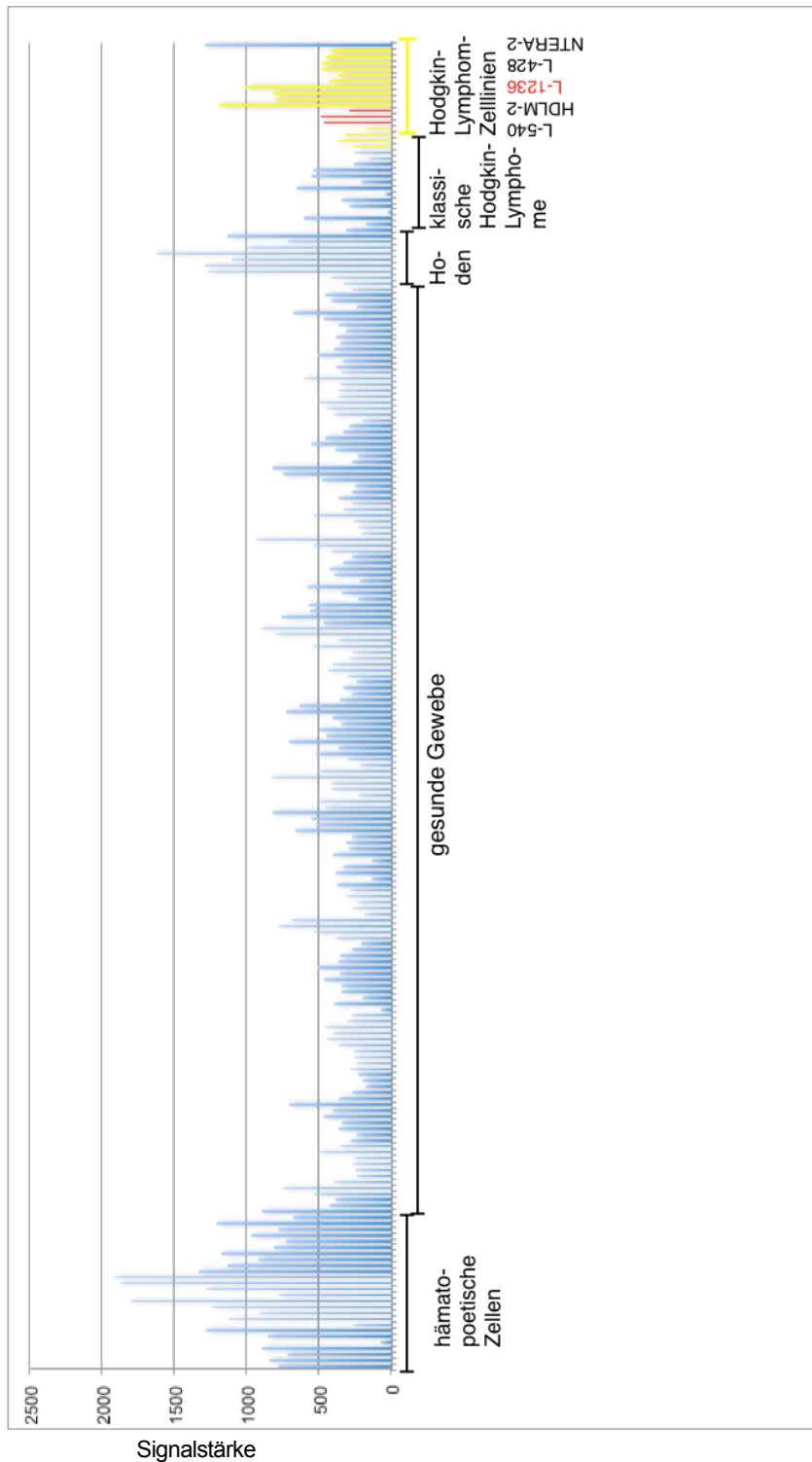




Signalstärke

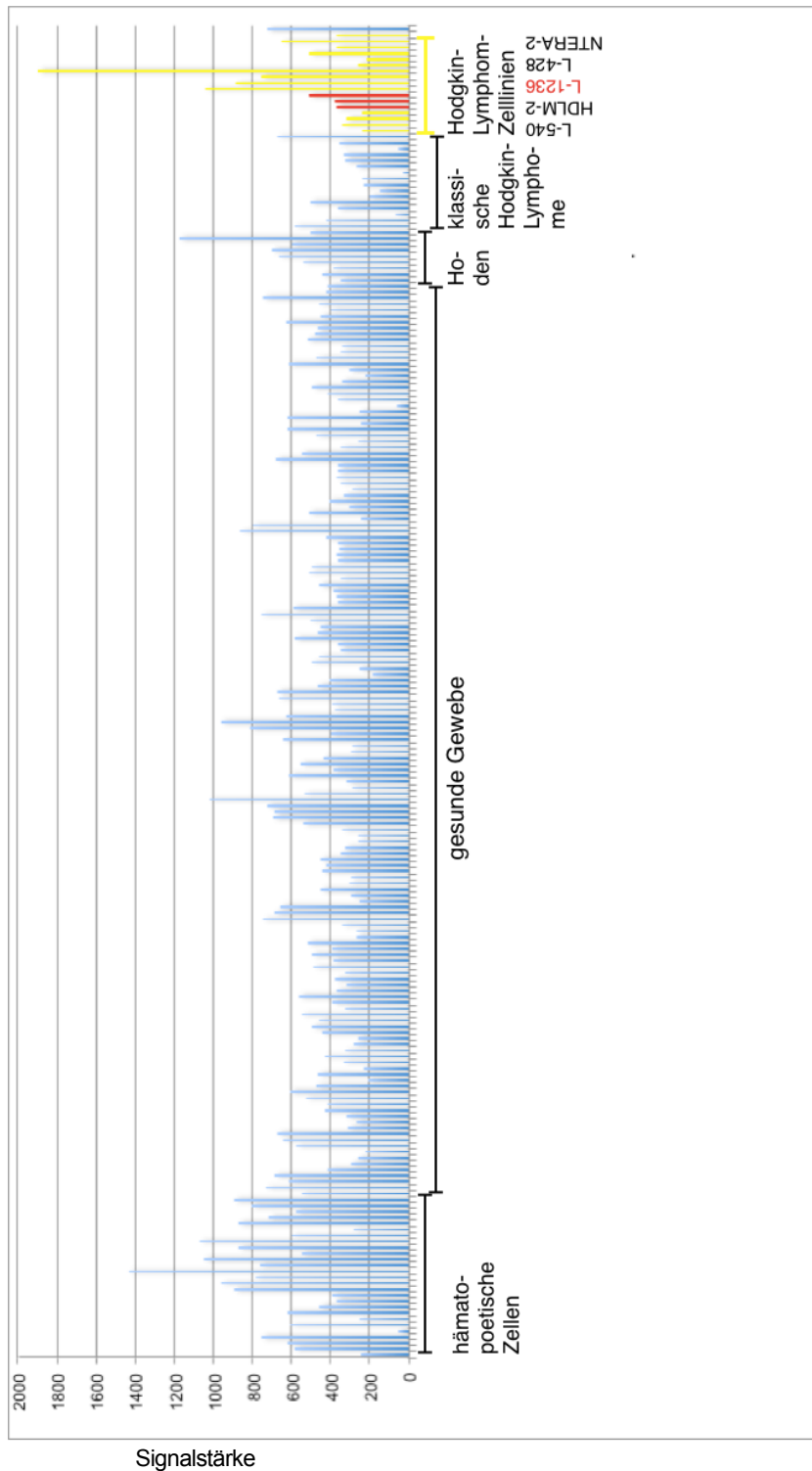
**Abbildung 32: Signalstärken verschiedener Gewebe im DNA-Microarray, Sondensatz 1556911\_at.**

Es sind Signalstärken von DNA-Microarray-Expressionsdaten dargestellt. Die Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (gelb bzw. rot) weisen im Vergleich zu Geweben des normal body atlas (blau) eine hohe Expression auf. Bei der Zelllinie L-1236 (rot) ist dies jedoch im Vergleich zu den anderen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (gelb) weniger stark ausgeprägt. Die Reihenfolge der Proben entspricht den im Anhang auf S. 98-107 aufgelisteten Datensätzen. Der Sondensatz 1556911\_at entspricht ALMS1-IT.



**Abbildung 33: Signalstärken verschiedener Gewebe im DNA-Microarray, Sondensatz 214220\_s\_at.**

Es sind Signalstärken von DNA-Microarray-Expressionsdaten dargestellt. L-1236-Zellen (rot) und weitere Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (gelb) sind im Vergleich zu Proben anderer Gewebe des normal body atlas (blau) dargestellt. Die Reihenfolge der Proben entspricht den im Anhang auf S. 98-107 aufgelisteten Datensätzen. Der Sondensatz 214220\_s\_at entspricht Exon 23 von ALMS1.



**Abbildung 34: Signalstärken verschiedener Gewebe im DNA-Microarray, Sondensatz 214221\_at.**

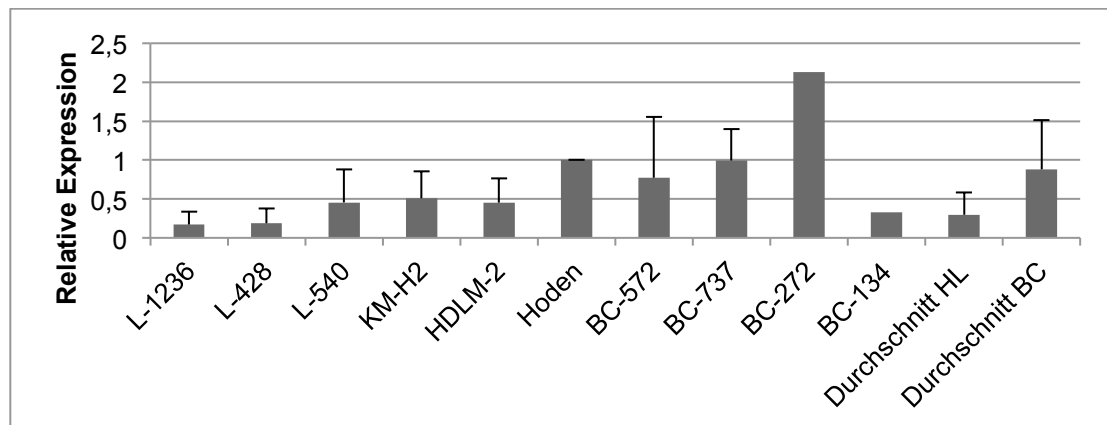
Es sind Signalstärken von DNA-Microarray-Expressionsdaten dargestellt. L-1236-Zellen (rot) und weitere Hodgkin-Lymphom-Zelllinien (gelb) sind im Vergleich zu Proben anderer Gewebe des normal body atlas (blau) dargestellt. Die Reihenfolge der Proben entspricht den im Anhang auf S. 98-107 aufgelisteten Datensätzen. Der Sondensatz 214221\_at entspricht Exon23 von ALMS1.

Die DNA-*Microarray*-Analysen der für *ALMS1* spezifischen Sondensätze 214220\_s\_at und 214221\_at zeigten, dass *ALMS1* in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236, L-428, L-540, KM-H2 und HDLM-2 im Vergleich zu gesundem Gewebe vermindert exprimiert wird. In hämatopoetischen Zellen verschiedenster Reifestadien sowie im Hoden als gesunde Referenzgewebe wird *ALMS1* hingegen konstant hoch exprimiert, weshalb diese Gewebe für weiterführende Untersuchungen zur differentiellen Genexpression herangezogen wurden. Der Vergleich der für *ALMS1* spezifischen Expressionsdaten des Sondensatzes 214220\_s der angegebenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien gegenüber PBMC ( $p=4,6214E-06$ ) und dem Hoden ( $p=3,5927E-07$ ) ergaben eine statistisch hochsignifikante geringere Expression. Der für *ALMS1-IT* spezifische Sondensatz 1556911\_at wies eine für die untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien höhere Expressionsrate im Vergleich zu PBMC ( $p=0,0105$ ) und dem Hoden ( $p=0,0068$ ) auf.

#### 4.5 Untersuchung der differentiellen Genexpression mittels qRT-PCR

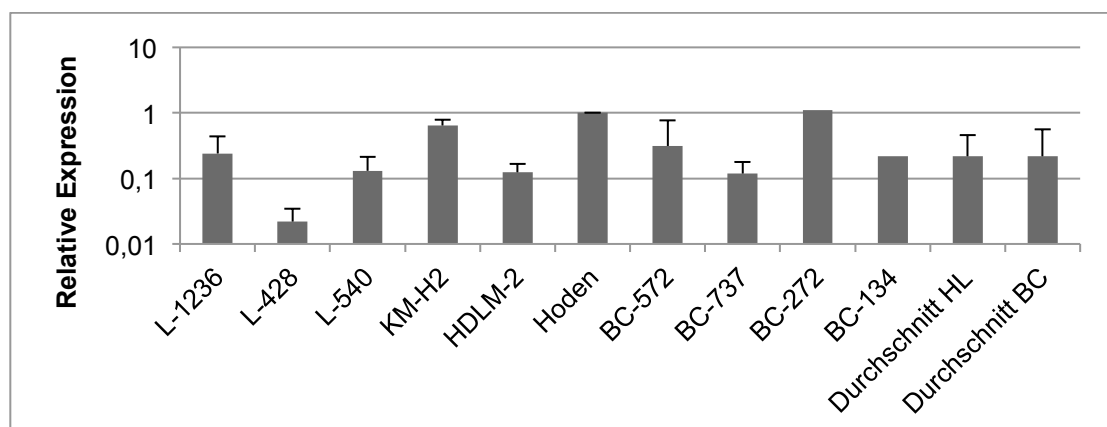
Als ergänzende Methode zur DNA-*Microarray*-Analyse wurde mittels qRT-PCR eine quantitative Expressionsanalyse durchgeführt. Dazu wurde cDNA aus den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236, L-428, L-540, KM-H2 und HDLM-2 sowie cDNA aus PBMC-Proben (*buffy coat*) sowie Gewebeproben des Hodens als gesundes Referenzgewebe, in dem *ALMS1* hoch exprimiert wird (Li *et al.*, 2007), genutzt. Als Positivkontrolle zur Normalisierung der in der qRT-PCR gemessenen Werte wurde  $\beta$ -Aktin (Primer: *ACTB*) als *housekeeping gene* mitgeführt (siehe Anhang S. 80). Die Target-Sequenzen für die Sondensätze 214220\_s\_at und 214221\_at liegen sehr nah beieinander und konnten daher mit demselben Primer-Paar erfasst werden (23L, 23R). Die Bindungsstelle für 214220\_s\_at befindet sich im Bereich von Exon 22 und 23 des *ALMS1*-Transkripts, während die Bindungsstelle für 214221\_at in Exon 23 lokalisiert ist. Weiterhin liegen verschiedene Transkriptvarianten vor, welche jeweils ein um 237 bp verkürztes bzw. vollständiges Exon 23 enthalten. Da sich der Rückwärts-Primer (23R) in der Sequenz an einer Stelle befindet, welche nur in der Spleißvariante mit vollem Exon 23 enthalten ist, wurde hier in der qRT-PCR nur eine der beiden Transkriptvarianten erfasst. Beim Vergleich der Expressionswerte der qRT-PCR (siehe Abb. 35 und 36) wird ersichtlich, dass die Expression des *ALMS1*-Transkriptes (Primer-Paar: 23L und 23R) beziehungsweise der *Alu*-artigen Sequenz von *ALMS1* (Primer-Paar: Down\_L und Down\_R) in den untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu PBMC (*Alu*-Sequenz:  $p=0,0436$ ) und insbesondere im Vergleich zu gesundem testikulärem Gewebe (*Alu*-Sequenz:  $p=1,4956E-9$ ; *ALMS1*-Transkript:  $p=1,6447E-11$ ) signifikant geringer ist. Insbesondere in den Zelllinien L-1236 (*Alu*-Sequenz:  $p=0,0228$  im Vergleich zu PBMC,  $p=0,0034$  im Vergleich zum Hoden; *ALMS1*-Transkript:  $p=0,0015$  im Vergleich zum Hoden) und L-428 (*Alu*-Sequenz:  $p=0,0245$  im Vergleich zu

PBMC,  $p=0,001$  im Vergleich zum Hoden; *ALMS1*-Transkript:  $p=1,1014E-8$  im Vergleich zum Hoden) war die Expression vermindert. Innerhalb der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien waren die Expressionsunterschiede weniger stark ausgeprägt, wobei die gegen Cisplatin resistente Zelllinie L-428 niedrigere Expressionsraten im Vergleich zu der chemosensitiveren Zelllinien L-540 und den Zelllinien KM-H2 und HDLM-2, welche durch mittlere Chemosensitivität charakterisiert sind, aufwiesen (*Alu*-Sequenz:  $p=0,0084$ ; *ALMS1*-Transkript:  $p=0,006$ ).



**Abbildung 35: Quantitative Analyse der repetitiven *Alu*-artigen Sequenz von *ALMS1* mittels qRT-PCR.**

Vergleich der relativen Expression in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236, L-428, L-540, KM-H2 und HDLM-2 gegenüber PBMC (BC-573, BC-737, BC-272, BC-134) gesundem, testikulärem Gewebe. Für den besseren Vergleich der Gewebe untereinander wurde die relative Expression des Hodens als 1 gesetzt. Die Target-Sequenz entspricht dem SONDENSATZ 214707\_x\_at (Primer-Paar: Down\_L + Down\_R).

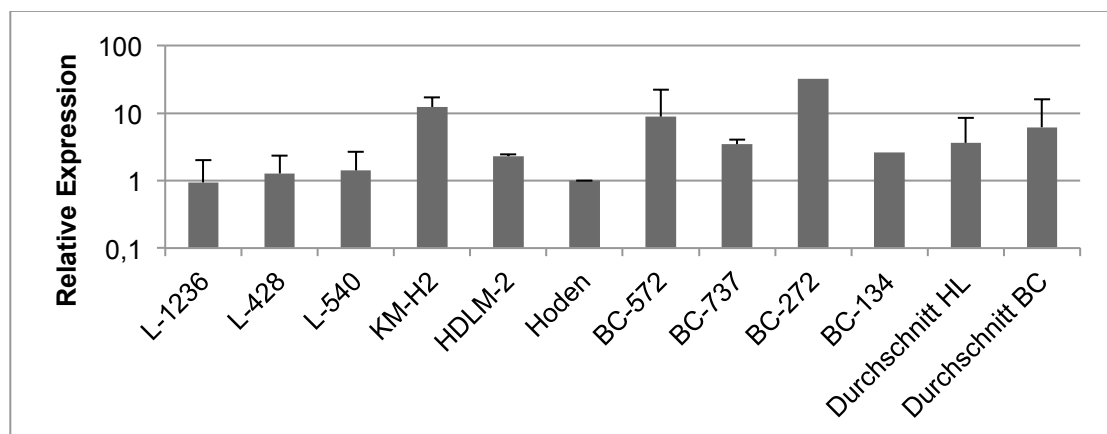


**Abbildung 36: Quantitative Analyse von *ALMS1* mittels qRT-PCR.**

Vergleich der relativen Expression von *ALMS1* in den Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236, L-428, L-540, KM-H2 und HDLM-2 gegenüber PBMC (BC-573, BC-737, BC-272, BC-134) und gesundem, testikulärem Gewebe. Für den besseren Vergleich der Gewebe untereinander wurde die relative Expression des Hodens als 1 gesetzt. Die Target-Sequenz entspricht den SONDENSÄTZEN 214220\_s\_at und 214221\_at (Primer-Paar: 23L, 23R).

Der Genexpressionsunterschied zwischen Hodgkin-Lymphom-Zellen und testikulärem Gewebe zeigt sowohl in der qRT-PCR als auch im DNA-Microarray den gleichen Trend. Es konnte gezeigt werden, dass *ALMS1* sowohl in Hodgkin-Lymphom-Zellen, als auch in gesundem Gewebe am Beispiel des Hodens und in gesunden Zellen des peripheren Blutes exprimiert wird. Sowohl die *Microarray*-Analysen, als auch die qRT-PCR ergaben, dass *ALMS1* in Hodgkin-Lymphom-Zellen im Vergleich zu gesundem Gewebe vermindert exprimiert wird, insbesondere in der Zelllinie L-428, welche Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika aufweist.

Die Expression von *ALMS1-IT* war in den untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu den PBMC nicht signifikant verschieden (siehe Abb. 37). Die Zelllinien KM-H2 ( $p=0,0291$ ) und HDLM-2 ( $p=0,0008$ ) wiesen im Vergleich zum testikulären Gewebe höhere Expressionsraten auf, während sich die Expressionsraten der Zelllinien L-1236, L-428 und L-540 nicht signifikant vom testikulären Gewebe unterschied. Die Target-Sequenz des Sondensatzes 1556911\_at ist dabei weder in der Referenzsequenz noch in den untersuchten *ALMS1*-Transkripten vorhanden, sondern Teil des *intronic transcripts ALMS1-IT*.



**Abbildung 37: Quantitative Analyse von *ALMS1-IT* mittels qRT-PCR.**

Vergleich der relativen Expression von *ALMS1-IT* in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien L-1236, L-428, L-540, KM-H2 und HDLM-2 gegenüber PBMC (BC-573, BC-737, BC-272, BC-134) und gesundem, testikulärem Gewebe. Für den besseren Vergleich der Gewebe untereinander wurde die relative Expression des Hodens als 1 gesetzt. Die Target-Sequenz entspricht dem Sondensatz 1556911\_at (Primer-Paar: UP\_L + UP\_R).

## 5. Diskussion

Das *ALMS1*-Gen zählt zu den größten heute bekannten Krankheitsgenen im menschlichen Genom, wobei seine physiologische und pathogene Bedeutung sowohl für die Entstehung maligner Neubildungen als auch für die Pathogenese des Alström-Syndroms noch nicht vollständig bekannt sind. DNA-*Microarray*-Analysen zeigten, dass *ALMS1* in verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu anderen Geweben differentiell exprimiert werden könnte (Staege *et al.*, 2008).

### 5.1 *ALMS1* – ein möglicher Tumorsuppressor?

Die Ergebnisse der qRT-PCR bestätigten die Ergebnisse aus den DNA-*Microarray*-Analysen. Anhand beider Verfahren konnte gezeigt werden, dass *ALMS1* sowie die *Alu*-artige Sequenz in *ALMS1* in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu testikulärem Gewebe als gesundem Referenzgewebe vermindert exprimiert werden. Die gegenüber Cisplatin resistente Zelllinie L-428 zeigte im Vergleich zu gesunden Zellen des peripheren Blutes besonders geringe Expression. Somit könnte die verminderte Expression von *ALMS1* in Verbindung mit der Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms stehen. Innerhalb der Hodgkin-Lymphom-Zelllinien zeigte die Zelllinie L-428 in der qRT-PCR geringere Expressionsraten, wohingegen die chemosensitive Zelllinie L-540 und die Zelllinien KM-H2 und HDLM-2 mit mittlerer Chemosensitivität eine höhere Expression aufwiesen. Daher könnte die verminderte Expression von *ALMS1* als möglicherweise proapoptotisches Gen (Zulato *et al.*, 2011) nicht nur zur Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms in der Funktion eines Tumorsuppressorgen beitragen, sondern kommt auch als möglicher Faktor in der Entwicklung von Chemoresistenzen in Frage. *ALMS1* wurde bereits als proapoptotisches Gen diskutiert, da ein Mangel an *ALMS1* in Fibroblasten in Zusammenhang mit einer Überexpression extrazellulärer Matrix-Komponenten, einer Verlängerung des Zellzyklus und Resistenz gegenüber apoptotischen Stimuli auftrat (Zulato *et al.*, 2011). *ALMS1* könnte somit eine *gatekeeper*-Funktion in der Genese des Hodgkin-Lymphoms innehaben. Einige Tumorsuppressoren kontrollieren den Zellzyklus und sind mit verantwortlich für die Initiation der Apoptose. Bei einem Defekt oder Mangel eines durch ein Tumorsuppressorgen codierten Proteins kann sich daher eine Tumorzelle entwickeln. Derzeit zielen die meisten gezielten Krebstherapieverfahren auf die Inhibition von Onkogenen ab, da inaktivierte Tumorsuppressorgene therapeutisch komplizierter zu erreichen sind. Dennoch sind Tumorsuppressorgene in Krebszellen häufiger von Alterationen betroffen als Onkogene und stellen daher einen interessanten Therapieansatz dar (Morris und Chan, 2015). Das Mutationsmuster von Onkogenen und Tumorsuppressorgen unterscheidet sich insofern, dass Onkogene typischerweise *missense* Mutationen aufweisen, während Mutationen in Tumorsuppressorgen häufig verkürzte Proteine hervorbringen (Vogelstein *et al.*, 2013).

Somit könnten verkürzte *ALMS1*-Transkripte ebenfalls von Bedeutung für die Entstehung des Hodgkin-Lymphoms sein. Um die Bedeutung von *ALMS1* als möglichen Tumorsuppressor und Einflussfaktor auf die Chemosensitivität näher zu untersuchen, könnte man in weiterführenden Studien eine Verringerung der *ALMS1*-Level bewirken und anschließend die Auswirkungen dieses sogenannten *knock-down* in Hinblick auf Zellviabilität und Chemoresistenz verschiedener Hodgkin-Lymphom-Zelllinien untersuchen. Des Weiteren sollte die differentielle Expression in anderen Tumorgeweben und im Vergleich zu Normalgewebe untersucht werden, um festzustellen, ob *ALMS1* auch in anderen malignen Geweben vermindert exprimiert wird. Ergänzend könnte die Transfektion auch in PBMC sowie in anderen Tumorzellen durchgeführt und ihre Auswirkungen auf Chemosensitivität und Zellviabilität beobachtet werden. Weiterhin wäre von Interesse, ob ein Zusammenhang zur Prognose des Hodgkin-Lymphoms besteht. Dazu könnte man Hodgkin-Lymphom-Zellen aus Patientenproben verschiedener Krankheitsstadien quantitativ analysieren. Sollte die verminderte Expression bzw. der Grad der Expressionsverringerung von *ALMS1* mit einem fortgeschrittenen Krankheitsstadium bzw. geringeren Überlebensraten von Hodgkin-Lymphom-Patienten korrelieren, könnte *ALMS1* zukünftig als zusätzlicher prognostischer Marker dienen. Ergänzend könnte das Expressionsverhalten mit *ALMS1* korrelierender Gene untersucht werden, woraus sich weitere Pathogenese- und Resistenzfaktoren sowie neue Therapieansätze ergeben könnten.

## 5.2 *Microarray*-Daten

Obwohl die Ergebnisse der DNA-*Microarray*-Analysen und der qRT-PCR den gleichen Trend aufweisen, ergeben sich geringe Unterschiede innerhalb der Expressionsdaten der verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien. Eine mögliche Erklärung ist die geringe Sensitivität von DNA-*Microarrays*. In früheren Arbeiten wurde beschrieben, dass mittels DNA-*Microarray*-Analysen nur etwa 30 % der Transkripte erfasst werden, darunter nur mäßig bis stark exprimierte Transkripte (Evans *et al.*, 2002), jedoch Expressionsdaten aus qRT-PCR und DNA-*Microarray* miteinander korrelieren, wenn mittels beider Methoden identische Transkripte gesucht werden (Dallas *et al.*, 2005). Weitere Nachteile von DNA-*Microarrays* stellen der hohe Kostenaufwand und die Qualitätsansprüche an das diagnostische Material dar, weshalb sich das Verfahren eher zur Identifikation von Expressionsmustern tumorassoziierter Gene mit Anschluss weiterer Verfahren als zum routinemäßigen Einsatz eignet.

## 5.3 Konnten neue Transkriptvarianten von *ALMS1* gefunden werden?

In der vorliegenden Studie konnte gezeigt werden, dass *ALMS1*-Transkripte sowohl in Zelllinien des Hodgkin-Lymphoms, als auch in Zellen des peripheren Blutes sowie



zahlreichen weiteren humanen Gewebe- und Organproben ohne pathologische Veränderungen exprimiert werden. Es konnten in der vorliegenden Arbeit neue Transkriptvarianten mit alternativem Transkriptionsstart bei Exon 2, fehlendem Exon 13 und 2 Varianten mit alternativ gespleißtem 5'-Ende von Exon 23 identifiziert werden. Mittels PCR wurde die Expression dieser Spleißvarianten in allen getesteten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, in PBMC-Proben, sowie in gesunden Geweben und Organen nachgewiesen. Demzufolge ist davon auszugehen, dass die vorliegenden Transkriptvarianten nicht spezifisch von Hodgkin-Lymphom-Zellen, sondern auch von gesundem Gewebe exprimiert werden und sind somit keine geeigneten Marker für die molekulare Diagnostik des Hodgkin-Lymphoms. Nach Purvis *et al.* (2010) wird die Transkription von *ALMS1* durch CpG-Inseln ähnliche Promoterregionen reguliert. Per *cap analysis of gene expression* (CAGE) wurden mehrere gewebspezifische *transcription start sites* (TSS) gefunden, welche eine Region von 70 bp Länge umfassen und durch eine X-Box und drei GC-Box-ähnliche Elemente als Transkriptionsfaktoren reguliert werden. Jedoch konnten in Vorarbeiten keine alternativen TSS per RACE bestätigt werden, sondern nur der bereits bekannte Start von Exon 1. Collin *et al.* (2002) konnte bereits eine Transkriptvariante des menschlichen Gehirns nachweisen, in der Exon 2 gänzlich fehlt (*ALMS1-002*). Weiterhin wurde beobachtet, dass menschliche Transkripte, welche Exon 2 enthalten, nur selten vorkommen und dessen Amplifikation nur mit für Exon 2 spezifischen Primern gelang. Auch in den untersuchten L-1236-Zellen gelang der Nachweis der Transkriptvariante ohne Exon 2, jedoch konnte auch ein schwaches PCR-Produkt mit einem *sense* Primer in Exon 2 (2L) und einem *antisense* Primer in Exon 3 (3R) erzeugt und sequenziert werden. Somit liegt nahe, dass zwei Transkriptvarianten mit jeweils unterschiedlichen TSS existieren. Dabei ergeben sich die unterschiedlichen Transkriptionsstarts wahrscheinlich durch 2 Promoterregionen jeweils vor Exon 1 und 2. Für den Transkriptionsstart mit Exon 1 ergab die Promoteranalyse recht niedrige Scores, wohingegen der Transkriptionsstart für Exon 2 mit einem höheren Score vorausgesagt wird. Die Ergebnisse der PCR sprechen hingegen eher dafür, dass ein Transkriptionsstart mit Exon 1 wahrscheinlicher ist, so wie es auch bislang in der Literatur beschrieben wurde. Vorstellbar wäre außerdem die Existenz eines weiteren, noch unbekanntem, außerhalb des *open reading frame* gelegenen Exons vor dem bislang bekannten Exon 1. Dafür spricht, dass in dem bislang beschriebenen Exon 1 eine Akzeptorstelle mit einem Score von 0,47 vorliegt und die Amplifikation des Transkriptionsstarts per SMART-RACE kein auswertbares Ergebnis hervorbrachte. Für das 3'-UTR-Exon wurde hingegen keine Akzeptorstelle gefunden, woraus sich das Spleißmuster von Exon 23 erklärt. Aufgrund der enormen Größe des gesamten *ALMS1*-Transkripts konnte die vollständige Exon-Struktur der individuellen cDNAs mit herkömmlichen PCR-Verfahren nicht gänzlich ermittelt, sondern die Transkripte nur in Ausschnitten sequenziert und anschließend aus den Einzelsequenzen

zusammengesetzt werden. Denkbar ist daher auch eine Kombination der identifizierten Transkriptvarianten untereinander, woraus sich eine Vielzahl von Strukturvarianten ergäbe. Mittels einer *long range* PCR, welche den gesamten Transkriptbereich von *ALMS1* umfasst, könnte in nachfolgenden Studien die endgültige Exon-Struktur der Transkriptvarianten untersucht werden. Weiterhin ist von Interesse, welche unterschiedlichen Proteine sich aus den Transkriptvarianten ergeben. Aufgrund fehlender Strukturinformationen zum *ALMS1*-Protein ist die Erstellung von 3D-Modellen sowohl des *ALMS1*-Referenzproteins als auch der sich aus den Transkriptvarianten ergebenden Proteine mit veränderter Struktur bisher nicht möglich. Die Analyse des *ALMS1*-Proteins mit BLAST ergab keine Strukturähnlichkeit zu Proteinen mit ausreichender Strukturinformation, so dass bisher keinerlei Templates mit ausreichender Sequenzidentität für die Erstellung von *ALMS1*-Proteinmodellen existieren. Von den bereits bekannten Polymorphismen in *ALMS1* konnten in den L-1236-Zellen insgesamt 7 SNPs identifiziert werden. Welche Auswirkungen die jeweiligen Polymorphismen von *ALMS1* auf den Phänotypen haben, ist bislang noch nicht hinreichend geklärt. Jedoch wurden in Vorarbeiten Unterschiede bei Alströmsyndrompatienten bezüglich der Insulinempfindlichkeit (Scheinfeldt *et al.*, 2009) und Nierenfunktion (Marshall *et al.*, 2007b) beobachtet. Da die Transkriptvarianten von *ALMS1* möglicherweise unterschiedliche Funktionen in verschiedenen Organen und Gewebetypen ausüben, könnten die Mutationen des Gens einzelne Transkriptvarianten unterschiedlich betreffen. Daraufhin könnten verschiedene Varianten des Alström-Syndroms mit unterschiedlich ausgeprägtem Phänotyp entstehen.

#### **5.4 Epigenetische Regulation von Tumorsuppressorgenen als möglicher therapeutischer Ansatz**

Zur Tumorentstehung kommt es nach der Zwei-Stufen-Hypothese nach Knudson (2001) erst, wenn beide Allele eines Gens defekt sind. Tumorsuppressorgene, die durch kompletten Verlust oder *loss of function*-Mutation ausfallen, werden als Klasse-I-Tumorsuppressorgene bezeichnet. Gene, welche genomisch intakt sind, jedoch in ihrer Expression unterdrückt werden, gehören zu Klasse II (Lee *et al.*, 1991). Da sich die Transkriptvarianten von *ALMS1* in Hodgkin-Lymphom-Zellen nicht von den Transkripten gesunder Gewebe unterscheiden, ist das Gen in Hodgkin-Lymphomen wahrscheinlich intakt und dessen Expression somit prinzipiell reversibel verhindert. *ALMS1* wäre somit gegebenenfalls zu den Klasse-II-Tumorsuppressorgenen zu zählen. Ein möglicher Therapieansatz wäre daher, *ALMS1* durch Pharmaka erneut zu exprimieren und dessen vermutete Tumorsuppressorfunktion therapeutisch zu nutzen. Nach neusten Erkenntnissen ist der Wirkstoff 5-Aza-2-deoxycytidin auch in Hodgkin-Lymphom-Zellen geeignet, um über epigenetische Regulationselemente Tumorsuppressorgene wieder zu aktivieren (Eberth *et al.*, 2010; Navarro *et al.*, 2015).

Tumorsuppressorgene sind in Krebszellen häufig durch eine Hypermethylierung von CpG-Inseln als epigenetische Transkriptionsregulatoren inaktiviert (Herman und Baylin 2003). Auch die Transkription von *ALMS1* wird über CpG-Inseln reguliert (Purvis *et al.*, 2010). 5-Aza-2-deoxycytidin hemmt die Methylierung und kann somit das Wachstum von Tumoren hemmen (Chuang *et al.*, 2010). Es bleibt zu untersuchen, inwieweit 5-Aza-2-deoxycytidin auch die Transkription von *ALMS1* zu modulieren vermag.

## 6. Zusammenfassung

Mit einer 5-Jahres-Überlebenswahrscheinlichkeit von über 90 % weist das Hodgkin-Lymphom eine der besten Prognosen aller kindlichen Malignome auf. Dennoch können nicht alle Patienten geheilt werden. Die Ätiologie des Hodgkin-Lymphoms sowie die molekularen Mechanismen zur Entwicklung von Resistenzen gegen die eingesetzten Zytostatika sind zum derzeitigen Zeitpunkt noch nicht hinreichend geklärt. Darüber hinaus ist die konventionelle Therapie des Hodgkin-Lymphoms mit zahlreichen Nebenwirkungen assoziiert und geht bei einem Teil der Patienten mit der Entwicklung von Zweitmalignomen einher. Daher wird in der klinischen Forschung intensiv nach Kandidatengenen als Ansatzpunkte für neue, gezieltere Therapieverfahren gesucht.

Das mit der seltenen Multisystemerkrankung Alström-Syndrom assoziierte *ALMS1*-Gen könnte eines dieser Kandidatengene darstellen. Sowohl die physiologische Funktion von *ALMS1* als auch die pathogene Bedeutung von *ALMS* für die Entstehung maligner Neubildungen sowie für die Pathogenese des Alström-Syndroms sind bisher noch nicht hinreichend geklärt. Vermutet wird, dass *ALMS1* als Bestandteil des Zentrosoms an intrazellulären Transportvorgängen, der Ziliogenese sowie als proapoptotisches Gen an der Regulation des Zellzyklus beteiligt ist.

Aufbauend auf DNA-Microarray-Daten zur differentiellen Expression von Genen in Hodgkin-Lymphom-Zelllinien wurde in dieser Arbeit die Expression von *ALMS1* mittels PCR und qRT-PCR untersucht. Sowohl die Ergebnisse der qRT-PCR, als auch die DNA-Microarray-Analysen zeigten, dass sowohl für *ALMS1* spezifische Transkripte als auch Transkripte einer repetitiven *Alu*-artigen Sequenz aus *ALMS1* in den im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu testikulärem gesundem Gewebe vermindert exprimiert werden. Die partiell chemoresistente Zelllinie L-428 wies sowohl im Vergleich zur chemosensitiven Zelllinie L-540 und den Zelllinien HDLM-2 und KM-H2 mit mittlerer Chemosensitivität als auch gegenüber gesunden Zellen des peripheren Blutes in der qRT-PCR geringere Expressionsraten auf. Daher könnte die verminderte Expression von *ALMS1* als möglicherweise proapoptotisches Gen nicht nur zur Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms in der Funktion eines Tumorsuppressorgens beitragen, sondern kann auch als

möglicher Faktor in der Entwicklung von Chemoresistenzen in Betracht gezogen werden. Um die Bedeutung von *ALMS1* als möglichen Tumorsuppressor und Einflussfaktor auf die Chemosensitivität näher zu untersuchen, könnte man in weiterführenden Studien eine Verringerung der *ALMS1*-Level bewirken und anschließend die Auswirkungen dieses sogenannten *knock-down* in Hinblick auf Zellviabilität und Chemoresistenz verschiedener Hodgkin-Lymphom-Zelllinien untersuchen.

Die *ALMS1*-Transkripte der Zelllinie L-1236 wurden per PCR amplifiziert und anschließend per Sequenzanalyse vollständig untersucht. Alle 23 Exons des *ALMS1*-Gens werden von der Zelllinie L-1236 exprimiert. Es konnten 7 bereits bekannte Polymorphismen in den L-1236-Zellen identifiziert werden (rs191091347, rs377283762, rs2037814, rs7598901, rs2056486, rs1052161, rs6546856), deren Auswirkungen auf den Phänotyp noch unbekannt sind. Neben den 8 bereits bekannten Transkriptvarianten konnten darüber hinaus neue Transkriptvarianten identifiziert werden. Diese beinhalten eine Transkriptvariante mit alternativem TSS mit Exon 2, eine Variante ohne Exon 13 und 2 Varianten mit alternativ gespleißtem 5'-Ende von Exon 23, welche entweder verkürztem Exon 23 oder das Intron zwischen Exon 23 und dem 3'-UTR-Exon beinhalten.

Die Transkriptvarianten kommen sowohl in verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien als auch in PBMC und verschiedenen anderen humanen Geweben vor. Somit sind *ALMS1* bzw. seine Transkriptvarianten kein geeigneter diagnostischer Marker für Hodgkin-Lymphome. Das *ALMS1*-Gen ist in Hodgkin-Lymphomen wahrscheinlich intakt und dessen Expression somit prinzipiell reversibel verhindert. Ein möglicher Therapieansatz wäre daher, *ALMS1* durch Pharmaka erneut zu exprimieren und dessen vermutete Tumorsuppressorfunktion therapeutisch zu nutzen. Ergänzend könnte das Expressionsverhalten mit *ALMS1* korrelierender Gene untersucht werden, woraus sich weitere Pathogenese- und Resistenzfaktoren sowie neue Therapieansätze ergeben könnten.

## 7. Literaturverzeichnis

Alström CH, Hallgreen B, Nilsson LB, Asander H. Retinal degeneration combined with obesity, diabetes mellitus and neurogenous deafness: a specific syndrome (not hitherto described) distinct from the Laurence-Moon-Bardet-Biedl syndrome: a clinical, endocrinological and genetic examination based on a large pedigree. *Acte Psychiatr Neurol Scand Suppl.* 1959;129:1-35.

Andersen JS, Wilkinson CJ, Mayor T, Mortensen P, Nigg EA, Mann M. Proteomic characterization of the human centrosome by protein correlation profiling. *Nature.* 2003;426:570-4.

Ansell SM. Hodgkin lymphoma: 2014 update on diagnosis, risk-stratification, and management. *Am J Hematol.* 2014;89:771-9.

Bonfante V, Santoro A, Viviani S, Devizzi L, Balzarotti M, Soncini F, Zanini M, Valagussa P, Bonadonna G. Outcome of patients with Hodgkin's disease failing after primary MOPP-ABVD. *J Clin Oncol.* 1997;15:528-34.

Brune V, Tiacchi E, Pfeil I, Döring C, Eckerle S, van Noesel CJ, Klapper W, Falini B, von Heydebreck A, Metzler D, Bräuninger A, Hansmann ML, Küppers R. Origin and pathogenesis of nodular lymphocyte-predominant Hodgkin lymphoma as revealed by global gene expression analysis. *J Exp Med.* 2008;205:2251-68.

Carbone PP, Kaplan HS, Musshoff K, Smithers DW, Tubiana M. Report of the Committee on Hodgkin's Disease Staging Classification. *Cancer Res.* 1971;31:1860-1.

Chabner BA, Roberts TG. Jr. Timeline: Chemotherapy and the war on cancer. *Nat Rev Cancer.* 2005;5:65-72.

Chuang JC, Warner SL, Vollmer D, Vankayalapati H, Redkar S, Bearss DJ, Qiu X, Yoo CB, Jones PA. S110, a 5-Aza-2'-deoxycytidine-containing dinucleotide, is an effective DNA methylation inhibitor in vivo and can reduce tumor growth. *Mol Cancer Ther.* 2010;9:1443-50.

Clarke CA, Morton LM, Lynch C, Pfeiffer RM, Hall EC, Gibson TM, Weisenburger DD, Martínez-Maza O, Hussain SK, Yang J, Chang ET, Engels EA. Risk of lymphoma subtypes after solid organ transplantation in the United States. *Br J Cancer.* 2013;109:280-8.

Collin GB, Marshall JD, Ikeda A, So WV, Russell-Eggitt I, Maffei P, Beck S, Boerkoel CF, Siculo N, Martin M, Nishina PM, Naggert JK. Mutations in ALMS1 cause obesity, type 2 diabetes and neurosensory degeneration in Alstrom syndrome. *Nat Genet.* 2002;31:74-8.

Collin GB, Cyr E, Bronson R, Marshall JD, Gifford EJ, Hicks W, Murray SA, Zheng QY, Smith RS, Nishina PM, Naggert JK. Alms1-disrupted mice recapitulate human Alström syndrome. *Hum Mol Genet.* 2005;14:2323-33.

Creutzig U, Henze G, Bielack S, Herold R, Kaatsch P, Klusmann JH, Graf N, Reinhardt D, Schrappe M, Zimmermann M, Jürgens H. Krebserkrankungen bei Kindern: Erfolg durch einheitliche Therapiekonzepte seit 25 Jahren. *Dtsch Arztebl.* 2003;100,842-52.

Dallas PB, Gottardo NG, Firth MJ, Beesley AH, Hoffmann K, Terry PA, Freitas JR, Boag JM, Cummings AJ, Kees UR. Gene expression levels assessed by oligonucleotide microarray analysis and quantitative real-time RT-PCR—how well do they correlate? *BMC Genomics.* 2005;6:59.

Davis TA, Grillo-Lopez AJ, White, CA, McLaughlin P, Czuczman MS, Link BK, Maloney D, Weaver RL, Rosenberg J, Levy R. Rituximab anti-CD20 monoclonal antibody therapy in non-Hodgkin's lymphoma: safety and efficacy of re-treatment. *J Clin Oncol.* 2000;18,3135-43.

- Deutsches Kinderkrebsregister. Jahresbericht / Annual Report 2013/14. Stand: November 2014. [http://www.kinderkrebsregister.de/fileadmin/kliniken/dkkr/pdf/jb/jb2013\\_2014/jb2014\\_s.pdf](http://www.kinderkrebsregister.de/fileadmin/kliniken/dkkr/pdf/jb/jb2013_2014/jb2014_s.pdf) (abgerufen am 16.03.2015)
- Diehl V, Kirchner HH, Burrichter H, Stein H, Fonatsch C, Gerdes J, Schaadt M, Heit W, Uchanska-Ziegler B, Ziegler A, Heintz F, Sueno K. Characteristics of Hodgkin's disease-derived cell lines. *Cancer Treat Rep.* 1982;66:615-32.
- Doxsey S, McCollum D, Theurkauf W. Centrosomes in cellular regulation. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 2005;21:411-34.
- Drexler HG, Gaedicke G, Lok MS, Diehl V, Minowada J. Hodgkin's disease derived cell lines HDLM-2 and L-428: comparison of morphology, immunological and isoenzyme profiles. *Leuk Res.* 1986;10:487-500.
- Eberth S, Schneider B, Rosenwald A, Hartmann EM, Romani J, Zaborski M, Siebert R, Drexler HG, Quentmeier H. Epigenetic regulation of CD44 in Hodgkin and non-Hodgkin lymphoma. *BMC Cancer.* 2010;10:517.
- Eckerle S, Brune V, Döring C, Tiacci E, Bohle V, Sundström C, Kodet R, Paulli M, Falini B, Klapper W, Chaubert AB, Willenbrock K, Metzler D, Bräuninger A, Küppers R, Hansmann ML. Gene expression profiling of isolated tumour cells from anaplastic large cell lymphomas: insights into its cellular origin, pathogenesis and relation to Hodgkin lymphoma. *Leukemia.* 2009;23:2129-38.
- Encyclopédie Orphanet Grand Public. Le syndrome d'Alström. Stand: Dezember 2014. [https://www.orpha.net/data/patho/Han/fr/Handicap\\_Alstrom-FrfrPub1328.pdf](https://www.orpha.net/data/patho/Han/fr/Handicap_Alstrom-FrfrPub1328.pdf) (abgerufen am 16.03.2015)
- Evans SJ, Datson NA, Kabbaj M, Thompson RC, Vreugdenhil E, De Kloet ER, Watson SJ, Akil H. Evaluation of Affymetrix Gene Chip sensitivity in rat hippocampal tissue using SAGE analysis. *Serial Analysis of Gene Expression.* *Eur J Neurosci.* 2002;16:409-13.
- Finetti F, Paccani SR, Riparbelli MG, Giacomello E, Perinetti G, Pazour GJ, Rosenbaum JL, Baldari CT. Intraflagellar transport is required for polarized recycling of the TCR/CD3 complex to the immune synapse. *Nat Cell Biol.* 2009;11:1332-9.
- Foell JL, Max D, Giersberg C, Korholz D, Staeger MS. Sensitivity of Hodgkin's lymphoma cell lines to the cell cycle inhibitor roscovitine. *Anticancer Res.* 2008;28:887-94.
- Forsythe E, Beales PL. Bardet-Biedl syndrome. *Eur J Hum Genet.* 2013;21:8-13.
- Franceschi S, Dal Maso L, La Vecchia C. Advances in the epidemiology of HIV-associated non-Hodgkin's lymphoma and other lymphoid neoplasms. *Int J Cancer.* 1999;83:481-5.
- Froguel P, Velho G. Genetic determinants of type 2 diabetes. *Recent Prog Horm Res.* 2001;56, 91-105.
- Girard D, Petrovsky N. Alström syndrome: insights into the pathogenesis of metabolic disorders. *Nature Reviews Endocrinology.* 2011;7,77-88.
- Graser S, Stierhof YD, Lavoie SB, Gassner OS, Lamla S, Le Clech M, Nigg EA. Cep164, a novel centriole appendage protein required for primary cilium formation. *J Cell Biol.* 2007;179:321-30.
- Hauser K: Zytoskelett. In: Bob A, Bob K (Hrsg): *Biochemie.* Thieme, Stuttgart, 2006, S. 376-83.
- Hearn T, Renforth GL, Spalluto C, Hanley NA, Piper K, Brickwood S, White C, Connolly V, Taylor JF, Russell-Eggitt I, Bonneau D, Walker M, Wilson DI. Mutation of ALMS1, a large gene with a tandem repeat encoding 47 amino acids, causes Alström syndrome. *Nat Genet.* 2002;31:79-83.

- Hearn T, Spalluto C, Phillips VJ, Renforth GL, Copin N, Hanley NA, Wilson DI. Subcellular localization of ALMS1 supports involvement of centrosome and basal body dysfunction in the pathogenesis of obesity, insulin resistance, and type 2 diabetes. *Diabetes*. 2005;54:1581-7.
- Herman JG, Baylin SB. Gene silencing in cancer in association with promoter hypermethylation. *N Engl J Med*. 2003;349:2042-54.
- Hodgkin T. On some morbid appearances of the absorbent glands and spleen. *Medico-Chirurgical Transactions*. 1832;17:68–114.
- Jackson MJ, Bindoff LA, Weber K, Wilson JN, Ince P, Alberti KG, Turnbull DM. Biochemical and molecular studies of mitochondrial function in diabetes insipidus, diabetes mellitus, optic atrophy, and deafness. *Diabetes Care*. 1994;17:728-33.
- Johnston PB, Inwards DJ, Colgan JP, Laplant BR, Kabat BF, Habermann TM, Micallef IN, Porrata LF, Ansell SM, Reeder CB, Roy V, Witzig TE. A Phase II trial of the oral mTOR inhibitor everolimus in relapsed Hodgkin lymphoma. *Am J Hematol*. 2010;85:320-4.
- Kamesaki H, Fukuhara S, Tatsumi E, Uchino H, Yamabe H, Miwa H, Shirakawa S, Hatanaka M, Honjo T. Cytochemical, immunologic, chromosomal, and molecular genetic analysis of a novel cell line derived from Hodgkin's disease. *Blood*. 1986;68:285-292.
- Kapatai G, Murray P. Contribution of the Epstein Barr virus to the molecular pathogenesis of Hodgkin lymphoma. *J Clin Pathol*. 2007;60:1342-9.
- Kanzler H, Küppers R, Hansmann ML, Rajewsky K. Hodgkin and Reed-Sternberg cells in Hodgkin's disease represent the outgrowth of a dominant tumor clone derived from (crippled) germinal center B cells. *J Exp Med*. 1996;184:1495-505.
- Karnath, BM. Review of Clinical Sign: Approach to the patient with lymphadenopathy. *Hospital Physician*. 2005;29-33. Stand: Juli 2005. [http://www.turner-white.com/memberfile.php?PubCode=hp\\_jul05\\_lymph.pdf](http://www.turner-white.com/memberfile.php?PubCode=hp_jul05_lymph.pdf) (abgerufen am 23.06.2015)
- Kewitz S, Staeger MS. Knock-down of PRAME increases retinoic acid signaling and cytotoxic drug sensitivity of Hodgkin lymphoma cells. *PLoS One*. 2013;8:e55897
- Kirkwood JM, Butterfield LH, Tarhini AA, Zarour H, Kalinski P, Ferrone S. Immunotherapy of cancer in 2012. *CA Cancer J Clin*. 2012;62:309-35.
- Knorz VJ, Spalluto C, Lessard M, Purvis TL, Adigun FF, Collin GB, Hanley NA, Wilson DI, Hearn T. Centriolar association of ALMS1 and likely centrosomal functions of the ALMS motif-containing proteins C10orf90 and KIAA1731. *Mol Biol Cell*. 2010;21:3617-29.
- Kopelman PG. Obesity as a medical problem. *Nature*. 2000;404:635-43.
- Knudson A. Alfred Knudson and his two-hit hypothesis. *Lancet Oncol*. 2001;2:642-5.
- Köchert K, Ullrich K, Kreher S, Aster JC, Kitagawa M, Jöhrens K, Anagnostopoulos I, Jundt F, Lamprecht B, Zimmer-Strobl U, Stein H, Janz M, Dörken B, Mathas S. High-level expression of Mastermind-like 2 contributes to aberrant activation of the NOTCH signaling pathway in human lymphomas. *Oncogene*. 2011;30:1831-40.
- Körholz D, Claviez A, Hasenclever D, Kluge R, Hirsch W, Kamprad F, Dorffel W, Wickmann L, Papsdorf K, Dieckmann K, Kahn T, Mauz-Korholz C, Dannenberg C, Potter R, Brosteanu O, Schellong G, Sabri O. The concept of the GPOH-HD 2003 therapy study for pediatric Hodgkin's disease: evolution in the tradition of the DAL/GPOH studies. *Klin Padiatr*. 2004;216:150-6.

- Krebs U. Untersuchung von Kandidatengenomen als mögliche Angriffspunkte einer gezielten Krebstherapie. München, Univ., Biol. Fak., Diss., 2008;9-14.
- Küppers R, Rajewsky K, Zhao M, Simons G, Laumann R, Fischer R, Hansmann ML. Hodgkin disease: Hodgkin and Reed-Sternberg cells picked from histological sections show clonal immunoglobulin gene rearrangements and appear to be derived from B cells at various stages of development. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994;91:10962-6.
- Lee SW, Tomasetto C, Sager R. Positive selection of candidate tumor-suppressor genes by subtractive hybridization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1991;88:2825-9.
- Li G, Vega R, Nelms K, Gekakis N, Goodnow C, McNamara P, Wu H, Hong NA, Glynn R. A role for Alström syndrome protein, *alms1*, in kidney ciliogenesis and cellular quiescence. *PLoS Genet*. 2007;5;3:e8.
- Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2<sup>-</sup>(Delta Delta C(T)) method. *Methods*. 2001;25:402-8.
- MacMahon B. Epidemiology of Hodgkin's disease. *Cancer Res*. 1966;26:1189-201.
- Maggioncalda A, Malik N, Shenoy P, Smith M, Sinha R, Flowers CR. Clinical, molecular, and environmental risk factors for Hodgkin lymphoma. *Adv Hematol*. 2011;2011:736261.
- Marshall JD, Bronson RT, Collin GB, Nordstrom AD, Maffei P, Paisey RB, Carey C, Macdermott S, Russell-Eggitt I, Shea SE, Davis J, Beck S, Shatirishvili G, Mihai CM, Hoeltzenbein M, Pozzan GB, Hopkinson I, Sicolo N, Naggert JK, Nishina PM. New Alström syndrome phenotypes based on the evaluation of 182 cases. *Arch Intern Med* 2005;165:675-83.
- Marshall JD, Beck S, Maffei P, Naggert JK. Alström Syndrome. *Eur J Hum Genet*. 2007;15:1193-202.
- Marshall JD, Hinman EG, Collin GB, Beck S, Cerqueira R, Maffei P, Milan G, Zhang W, Wilson DI, Hearn T, Tavares P, Vettor R, Veronese C, Martin M, So WV, Nishina PM, Naggert JK. Spectrum of ALMS1 variants and evaluation of genotype-phenotype correlations in Alström syndrome. *Hum Mutat*. 2007;28:1114-23.
- Marshall JD, Maffei P, Collin GB, Naggert JK. Alström Syndrome: Genetics and Clinical Overview. *Curr Genomics*. 2011;12:225-235.
- Marshall JD, Maffei P, Beck S, Barrett TG, Paisey R, Naggert JK. Clinical utility gene card for: Alström Syndrome - update 2013. *Eur J Hum Genet*. 2013;21.
- Mendioroz J, Bermejo E, Marshall JD, Naggert JK, Collin GB, Martínez-Frías ML. Presentación de un caso con síndrome de Alström: Aspectos clínicos, moleculares y guías diagnósticas y anticipatorias. *Med Clin (Barc)*. 2008;131:741-6.
- Mighell AJ, Smith NR, Robinson PA, Markham AF. Vertebrate pseudogenes. 2000;468:109-114.
- Moen MD, McKeage K, Plosker GL, Siddiqui MA. Imatinib: a review of its use in chronic myeloid leukaemia. *Drugs*. 2007;67:299-320.
- Morris LG, Chan TA. Therapeutic targeting of tumor suppressor genes. *Cancer*. 2015;121;1357-68.
- Müschen M, Rajewsky K, Bräuning A, Baur AS, Oudejans JJ, Roers A, Hansmann ML und Küppers R. Rare occurrence of classical Hodgkin's disease as a T cell lymphoma. *J Exp Med*. 2000;191:387-394.



Naggert J, Harris T, North M. The genetics of obesity. *Curr Opin Genet Dev.* 1997;7:398-404.

Navarro A, Díaz T, Cordeiro A, Díaz Beyá M, Ferrer G, Fuster D, Martínez A, Monzó M. Epigenetic regulation of microRNA expression in Hodgkin lymphoma. *Leuk Lymphoma.* 2015;14:1-18.

Ozantürk A, Marshall JD, Collin GB, Düzenli S, Marshall RP, Candan Ş, Tos T, Esen İ, Taşkesen M, Çayır A, Öztürk Ş, Üstün İ, Ataman E, Karaca E, Özdemir TR, Erol İ, Eroğlu FK, Torun D, Pariltay E, Yılmaz-Güleç E, Karaca E, Atabek ME, Elçioğlu N, Satman İ, Möller C, Muller J, Naggert JK, Özgül RK. The phenotypic and molecular genetic spectrum of Alström syndrome in 44 Turkish kindreds and a literature review of Alström syndrome in Turkey. *J Hum Genet.* 2015;60:1-9.

Paisey RB, Geberhiwot T, Waterson M, Cramb R, Steeds R, Williams K, White A, Hardy C. Modification of severe insulin resistant diabetes in response to lifestyle changes in Alström syndrome. *Eur J Med Genet.* 2014;57:71-5.

Punnett A, Tsang RW, Hodgson DC. Hodgkin lymphoma across the age spectrum: epidemiology, therapy, and late effects. *Semin Radiat Oncol.* 2010;20:30-44.

Purvis TL, Hearn T, Spalluto C, Knorz VJ, Hanley KP, Sanchez-Elsner T, Hanley NA, Wilson DI. Transcriptional regulation of the Alström syndrome gene ALMS1 by members of the RFX family and Sp1. *Gene.* 2010;460:20-9.

Ristow M. Neurodegenerative disorders associated with diabetes mellitus. *J Mol Med (Berl).* 2004;82:510-29.

Ritz S. Untersuchungen zur Funktion Hodgkin-Lymphom-assoziiierter Glutathion-S- Transferasen. Halle, Universität, Naturwissenschaftliche Fakultät I, Institut für Biochemie und Biotechnologie, Diplomarbeit, 2010. S. 60, 74-76.

Roth SL, Sack H, Havemann K, Willers R, Kocsis B, Schumacher V. Contiguous pattern spreading in patients with Hodgkin's disease. *Radiother Oncol.* 1998;47:7-16.

Roth RB, Hevezi P, Lee J, Willhite D, Lechner SM, Foster AC, Zlotnik A. Gene expression analyses reveal molecular relationships among 20 regions of the human CNS. *Neurogenetics.* 2006;7:67-80.

Schaadt M, Fonatsch C, Kirchner H, Diehl V. Establishment of a malignant, Epstein-Barr-Virus (EBV)-negative cell-line from the pleura effusion of a patient with Hodgkin's disease. *Blut.* 1979;38:185-190.

Scheinfeldt LB, Biswas S, Madeoy J, Connelly CF, Schadt EE, Akey JM. Population genomic analysis of ALMS1 in humans reveals a surprisingly complex evolutionary history. *Mol Biol Evol.* 2009;26:1357-67.

Slavotinek AM, Stone EM, Mykytyn K, Heckenlively JR, Green JS, Heon E, Musarella MA, Parfrey PS, Sheffield VC, Biesecker LG. Mutations in MKKS cause Bardet-Biedl syndrome. *Nat Genet.* 2000;26:15-6.

Staege MS, Banning-Eichenseer U, Weißflog G, Volkmer I, Burdach S, Richter G, Mauz-Körholz C, Föll J, Körholz D. Gene expression profiles of Hodgkin's lymphoma cell lines with different sensitivity to cytotoxic drugs. *Exp Hematol.* 2008;36:886-896.

Steidl C, Shah SP, Woolcock BW, Rui L, Kawahara M, Farinha P, Johnson NA, Zhao Y, Telenius A, Neri SB, McPherson A, Meissner B, Okoye UC, Diepstra A, van den Berg A, Sun M, Leung G, Jones SJ, Connors JM, Huntsman DG, Savage KJ, Rimsza LM, Horsman DE, Staudt LM, Steidl U, Marra MA, Gascoyne RD. MHC class II transactivator CIITA is a recurrent gene fusion

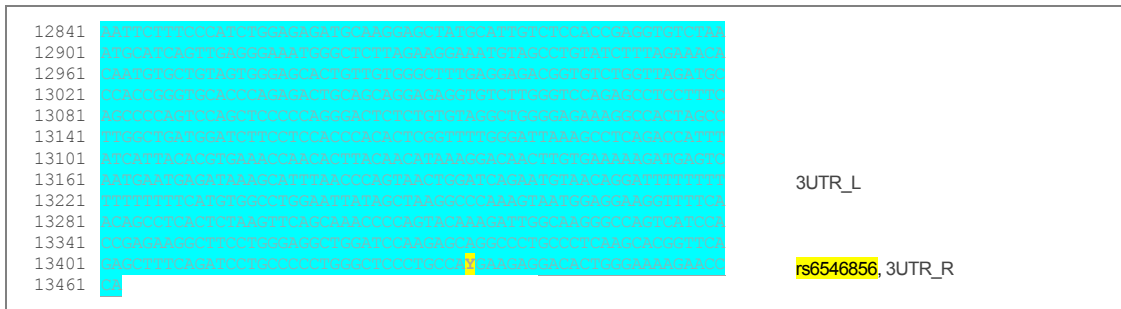
- partner in lymphoid cancers. *Nature*. 2011;471:377-81. van Leeuwen FE1, Klokman WJ, Hagenbeek A, Noyon R, van den Belt-Dusebout AW, van Kerkhoff EH, van Heerde P, Somers R. Second cancer risk following Hodgkin's disease: a 20-year follow-up study. *J Clin Oncol*. 1994;12:312-25.
- Vogelstein B, Papadopoulos N, Velculescu VE, Zhou S, Diaz LA Jr, Kinzler KW. Cancer genome landscapes. *Science*. 2013;339:1546-58.
- Wacheck V, Zangemeister-Wittke U. Antisense molecules for targeted cancer therapy. *Crit Rev Oncol Hematol*, 2006;59,65-73.
- Waring MJ. Complex formation between ethidium bromide and nucleic acids. *J Mol Biol*. 1965;13:269-82.
- Weinreb M, Day PJ, Niggli F, Powell JE, Raafat F, Hesseling PB, Schneider JW, Hartley PS, Tzortzatou-Stathopoulou F, Khalek ER, Mangoud A, El-Safy UR, Madanat F, Al Sheyyab M, Mpofu C, Revesz T, Rafii R, Tiedemann K, Waters KD, Barrantes JC, Nyongo A, Riyat MS, Mann JR. The role of Epstein-Barr virus in Hodgkin's disease from different geographical areas. *Arch Dis Child*. 1996;74:27-31.
- Weiss LM, Chen YY, Liu XF, Shibata D: Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. A correlative in situ hybridization and polymerase chain reaction study. *Am J Pathol*. 1991;139:1259-65.
- Weiss LM. Epstein-Barr virus and Hodgkin's disease. *Curr Oncol Rep*. 2000;2:199-204.
- Younes A, Bartlett NL, Leonard JP, Kennedy DA, Lynch CM, Sievers EL, Forero-Torres A. Brentuximab vedotin (SGN-35) for relapsed CD30-positive lymphomas. *N Engl J Med*. 2010;363:1812-21.
- Younes A, Oki Y, Bociek RG, Kuruvilla J, Fanale M, Neelapu S, Copeland A, Buglio D, Galal A, Besterman J, Li Z, Drouin M, Patterson T, Ward MR, Paulus JK, Ji Y, Medeiros LJ, Martell RE. Mocetinostat for relapsed classical Hodgkin's lymphoma: an open-label, single-arm, phase 2 trial. *Lancet Oncol*. 2011;12:1222-8.
- Younes A, Sureda A, Ben-Yehuda D, Zinzani PL, Ong TC, Prince HM, Harrison SJ, Kirschbaum M, Johnston P, Gallagher J, Le Corre C, Shen A, Engert A. Panobinostat in patients with relapsed/refractory Hodgkin's lymphoma after autologous stem-cell transplantation: results of a phase II study. *J Clin Oncol*. 2012;30:2197-203.
- Zaghloul NA, Katsanis N. Mechanistic insights into Bardet-Biedl syndrome, a model ciliopathy. *J Clin Invest*. 2009;119:428-37.
- Zentrum für Krebsregisterdaten. Krebs in Deutschland 2009/2010. Stand: 13.12.2013. [http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs\\_in\\_Deutschland/kid\\_2013/krebs\\_in\\_deutschland\\_2013.pdf?\\_\\_blob=publicationFile](http://www.krebsdaten.de/Krebs/DE/Content/Publikationen/Krebs_in_Deutschland/kid_2013/krebs_in_deutschland_2013.pdf?__blob=publicationFile) (abgerufen am 16.03.2015)
- Zhang X, Zhang Q, Zhang J, Qiu L, Yan SS, Feng J, Sun Y, Huang X, Lu KH, Li Z. FATS is a transcriptional target of p53 and associated with antitumor activity. *Mol Cancer*. 2010;9:244.
- Zhang J, Gu L, Zhao LJ, Zhang XF, Qiu L, Li Z. Expression level of novel tumor suppressor gene FATS is associated with the outcome of node positive breast cancer. *Chin Med J (Engl)*. 2011;124:2894-8.
- Zulato E, Favaretto F, Veronese C, Campanaro S, Marshall JD, Romano S, Cabrelle A, Collin GB, Zavan B, Belloni AS, Rampazzo E, Naggert JK, Abatangelo G, Siculo N, Maffei P, Milan G, Vettor R. ALMS1-deficient fibroblasts over-express extra-cellular matrix components, display cell cycle delay and are resistant to apoptosis. *PLoS One*. 2011;6.

1. *ALMS1* wird in den untersuchten Hodgkin-Lymphom-Zelllinien im Vergleich zu Hoden als gesundem Referenzgewebe vermindert exprimiert.
2. Die chemoresistente Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-428 wies sowohl in der quantitativen RT-PCR im Vergleich zu der chemosensitiven Zelllinie L-540 und den Zelllinien HDLM-2 und KM-H2 mit mittlerer Chemosensitivität als auch im Vergleich zu gesunden Zellen des peripheren Blutes eine verringerte Expression von *ALMS1* auf.
3. In der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-1236 werden alle zur Zeit bekannten 23 Exons des *ALMS1*-Gens exprimiert.
4. Von den 1.257 zum Zeitpunkt der Analyse bekannten *Single-Nucleotide*-Polymorphismen konnten 7 dieser Polymorphismen in der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-1236 identifiziert werden. Die Polymorphismen rs191091347 (T) und rs2037814 (G) liegen in der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-1236 in homozygoter Form vor. Der seltene Polymorphismus rs377283762 (S) sowie die Polymorphismen rs7598901 (Y), rs2056486 (K), rs1052161 (R) und rs6546856 (Y) liegen in heterozygoter Form vor.
5. Es konnten neue Transkriptvarianten von *ALMS1* im Bereich des Transkriptionsstarts, des Exons 13 und des Exons 23 identifiziert werden.
6. Für den bisher bekannten Transkriptionsstart liegen zweierlei Transkriptvarianten vor, welche jeweils entweder Exon 1 oder 2 enthalten. Es liegt in der Hodgkin-Lymphom-Zelllinie L-1236 keine Transkriptvariante in nachweisbaren Mengen vor, in der Exon 1 und 2 gleichzeitig vorliegen.
7. Es existiert eine Transkriptvariante ohne Exon 13.
8. Es liegen alternative 5'-*splice sites* von Exon 23 vor, was zu einer Spleißvariante mit Verkürzung des Exon 23 um 237 bp führt. Weiterhin liegt eine Spleißvariante vor, in der das Exon 23 vollständig vorhanden ist und nachfolgend das gesamte Intron 23 sowie das nachfolgende 3'-UTR-Exon enthalten ist.
9. Die Transkriptvarianten ohne Exon 13 und mit alternativ gespleißtem Exon 23 kommen sowohl in verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien als auch in normalen Blutzellen und verschiedenen anderen humanen Geweben vor.
10. *ALMS1*-Transkripte könnten als möglicherweise proapoptotische Faktoren nicht nur zur Pathogenese des Hodgkin-Lymphoms in der Funktion eines Tumorsuppressorgens beitragen, sondern kommen auch als möglicher Faktor in der Entwicklung von Resistenzen gegenüber Chemotherapeutika in Frage.



2521	TGAAAGTTTCAGCTGTTTCTGGACCAGCTGACGGAAAGACTGGGACACCAGCTGTAACCT	
2581	CTACTTCCCTTGGCTCCCTTTCACTTGGAGAAAAGCCAGTGCTTTCTATCAGCAGACCT	8.1R
2641	TACCCAATAGTCATCTAACTGAAGAGGCTCTGAAAGTATCAATTTGCTCCGGACAGGTG	
2701	ATCAGAAGACTGGGATACCCTCAGCACCATCTAGTTTCTACTCACACAGAGAGAAGCCCA	
2761	TTATTTTTTCCAGCAGACCTGCCAGACTTTCTTTCCCTGAAGAAAGCTCTGAAGGTTT	
2821	CAGCTGTTTCTGTATTGGCTGCCAGAAAGACTGGGACACCAACAGTGTCTCTAATTTCTC	
2881	ACTCACATAGCGAGAAAATCTAGTGTTTTCTACCAGCAAGAGTTGCCAGACAGTGATCTAC	8neu_D_R
2941	CTAGAGAACTCTGAAAATGTCTGTATTTCCTGGACTGACTGACCAGAAAGACTGTCCCAA	
3001	CAACCAACAGTACCTTCAGGTTCCCTTTCACATAGAGAGAAGCCAGTATTTTCTATCAAC	
3061	AGGAGTGGCCAGATAGTTATGCAACTGAAAAGGCTCTGAAAAGTTTCAACTGGCCCTGGAC	8neu_B_R, 8neu_C_R
3121	CAGCTGACCAGAAGACTGAGATACCAGCAGTACAGTCTAGTTCTTACCACAGAGGGGAGA	
3181	AGCCTAGTGTTTGTACCCACAGGTGTTATCAGACAGTCACTACCTGAAGAGAGTCTGA	
3241	AAAGTTTCAGCTTCCCTGGACCAGCTGACCAGATGACTGACACACCAGCAGTACCCTCTA	
3301	CTTTCTACTCACAAAGAGAGAAGCCTGGTATTTTCTACCAACAGACCTTGGCAGAGAGTC	
3361	ATCTGCCTAAAGAGGCTCTGAAAATTCAGTAGTCTCTGGACTAGCAGACCAGAAGACTG	
3421	GCACACCAACTGTAACCTCAACTTCCCTACTCACAACTAGAGAAAAGCCAGCATTTTCC	
3481	ACCAGCAGGCTTCCAGGTAATACCTGAAAGGCTCAGAAAGTTTCAGCTGTTA	
3541	CTGGACCAGGTAACCAGAAGACTGGATACCAAGAGTACTTTTACCTTCTACTCACAAA	
3601	GAGAGAACTGGTATTTTCTATCAACAGACCTTGGCAGGTAGTCACATACCTGAAGAGG	
3661	CACAGAAGTTTACCTGTCTTGGACCAGCTGACCAGAAGACTGGGACCAACCTCCAA	8.2L
3721	CCTCTGCCTTCTTACTCACACAGAGAAGCCTGGTATTTTCTACCAACAGGTTCTGGCCAG	
3781	ATAATCATCCAACTGAAGAGGCTCTGAAAATTCAGTTGCCTCTGAACCAGTTGACCAGA	
3841	CAACTGGCACACCAGCTGTAACCTCTACTTCTACTCACAACTAGAGAGAAGCCAGCA	
3901	TTTTCTACCAACAGTCTGTTGCCAAGTAGTCACTTAACTGAAGAGGCTAAGAATGTTTTCAG	
3961	CGGTTCCCTGGACCAGCTGACCAGAAGACTGTGATACCAATTTTACCCCTACTTTTCTACT	
4021	CACACACAGAGAAGCCTGGTGTTTTCTACCAACAGGCTTGGCCACATAGTCATCCAACCTG	
4081	AAAGGCTCTGAAAATTCAGTTGCCTTGAACCAAGTTGACCAGCAACTGGCACACCAA	
4141	CTGTAACCTTACTTCTTACTCACAACTACAGAGAAGCCGAGTATTTTCTACCAACAGT	
4201	CGTTGCCAGGTAGTCATCTAACTGAAGAGGCTAAGAAGCTTTCAGCGGTTCTGGACCAG	
4261	GTGACCAGAAAGACTGGGATACCAACTTTACCCCTTACTTCTACTCACACACAGAGAAGC	
4321	CTGGTAGTTTCTACCAACAGGCTTGGCCACATAGTCATCTACCTGAAGAGGCTTGGAG	
4381	TTTTAGTTGCCTTGGACCAGTTGACCAGAGGTTGGCACCAACTGTAACCTCCCTT	8.2R
4441	CCAGCTCATTTGGAGAGAAGCCATTGTTATCTACAACAGGCTTTCAGAGGGTCTATC	
4501	TACCTGAAGAGTCTCTGAAAATTCAGTTGCCTTGGACCAGTTGGCCAGACCACTGGCG	
4561	CAACCAACTATAACCTCTCTTCCCTACTCACAACTAGAGCAAAGCTTGGCAGTTTCTACC	
4621	AACTGGCATTTCTAGGTAGTCAAATACCTGAAAGAGGCTCTCAGAGTTTCTTCTGCTCCTG	
4681	GACCAGCTGACCAGACAACCTGGCATACCAACCAATACCTTACTTCTACTCATTTGGAG	
4741	AGAAGCCGATTTGTAACATAACAACAGGCTTCCAGATGGTCACTACCTGAAGAGGCTC	
4801	TGAAAATTTTCATTGTTTCTGGACCTACTGAAAAAAGACTGACATACCAAGCAGGACCTT	8.3L
4861	TAGGTTCCAGTGCATTTGGAGAGAAGCCATTACTTTCTACCCGAGGCTCTGCTAGACA	
4921	GTCTCTAAATAAAGAGGTTGTGAAAATTCAGCTGCTTCCCTGGACCAGCTGACCAGAAGA	
4981	CTGAGACATACCAAGTACATTTCTACTAGTCACTCAAAATAGGGGGAAGCCGTGTCATTTTCT	
5041	ACCAGCAGACCCATACAGACAGTCAATTTACCTGAAGAAGCTCTGAAAATTCACCTGTTC	
5101	CTGGACCAGATGGCCAGAAGACTGAGACACCATCAGTATCCTCTAGTTTATACTCATATA	
5161	GAGAGAAGCCATTGTCTTCTACCAACAGGCCCCGCCAGACAGTGAAGTAACTCAAGAAG	
5221	CTCTGAAAGTTTTCAGCTGTCTCAACAGCTGACCAGAAGACTGGGTTATCTACTGTAA	
5281	CTTCTCTTTCTATTACATACAGAGAAGCCTAAATTTCTTACCAGCAAGAGTTGCCAG	
5341	ATAGTCACTCAACTGAAGAGGCTCTGAAAATTCAAAATGTTCCCTGGACCAGCTGACCAGA	
5401	AGACTGGGTATCAACAGTAACTCTACTTCTACTCACACAGAGAGAAGCCATTGTTT	
5461	CCTACCAGCAGAGTTGCCGATTTTACTGAAGCAGGTTTGAANAATTTAAGAGTTCCCTG	8.4L
5521	GACCAGCTGACCAGAAAGACTGGAAATAAATCACTCCCTGCTCAATTTCTACCACAGAGAG	
5581	AGCACTCTGTCAATTTCTATGAGCAGGAGTTGCCAGATCTTACTGAAGTAACTTTGAAAG	8.4R
5641	CAATAGGGTTCTTGGCCCTGCTGACCAGAAGACTGGGATACAAATAGCATCCTCTAGTT	
5701	CCTACTCAAATAGAGAGAAGCCAGTATTTTCTCAGCAGGAGTTGCCAGATGTTACTG	
5761	AAGAAGCTTTAAATGTTTGTGTTCTTGGACAGGTTGACCCGGAAGACTGAGATACCAA	
5821	CAGTACCTTTAAGTTACTACTCACGTAAGAGAAGCCAGTGTATCTCTCAACAGGAGT	
5881	TGCCAGACTCACTCTCACAGAAGAGGCTCTGAAAATTTCAACTGTTCCCTGACCAGCTGACCAGA	
5941	AGCAGAAGACTGGGATACCAATAGGACTGTCTAGTTCTTACTCACATTCACATAAAGAGA	
6001	AACCTAAGATTTCAACTGTGCATATACCAAGTACCAGAAAATGAGTTTCCAGCAGCTA	
6061	CCCTTAGTTTCTACTCACAAATAGAGAAGCCCAAGATTTCAACTGTGATTGGACCAAAATG	
6121	ACCAGAAGACTCCATCCAGACAGCTTTTCAATAGTTCTTATTTCTCAAACAGTAAAGCCCA	
6181	ATATTTTTATTCAACAGCAGTTGCCAGATAGAGATCAAAGTAAAGGATTTCTAAAGATTT	
6241	CAGCTGCCCCGAACTAACTGATGTGAATACTGGAAAACCAGTATCTCTCTAGTTCTCT	
6301	ATTTTTCACAGAGAGAAATCGAATATTTTTCAGTCCACAGGAATTGCCAGGTAGTCATGTAA	
6361	CTGAAGATGTGTGAAGTTTCAACAATTTCCGACCAGCTGGCCAGAAAACAGTATTTAC	
6421	CAACAGCTCTTCCCTAGTTCTTTTCACTCGAGAGAAAACAGATATTTTCTATCAAAAAGG	
6481	ATTTGCCAGATAGACATCTAACTGAAGATGCTTAAAGATCTCAAGTGTCTTGGGCAAG	
6541	CTGATCAAATACCGGATTACAACAGTTCCCTCTGGTACTTACTCACATGGTGAGAATC	
6601	ACAAGCTTGTTCAGAACATGTCCAAAGGCTAATAGATAATTTGAATTTCTGACTCCA	
6661	GTGTTAGCTCAAATAATGTGCTTTTAAATTTCTCAGGCTGATGACAGAGTTGTAATAAATA	
6721	AACCAGACTGCGAGGTTTGAAGATGTTGGCTCTGAAGAAAATCCAGGATGCAGAAAATA	8.5L
6781	GTGCTAAAACCTTTAAGAAAATTCGGACACTTTTGTATGGAGGCAGAAAATATGGCACTGA	
6841	AACGATGCAATTTTCTGCTCCCTTGGCCGTTTTCAGAGATAATAGTGATATTTCAATTTA	8.6A_L
6901	TACAATCTAAGAAGGTGGTTTGTCTCAAAGAACCCTTCCACGGGTGATCTAATGGTG	8.5R
6961	ATTTGCTTACAGACAGCCATTACAGAGGAAAGCCCAAGCAGGTCATACAGAAGG	
7021	ATATTGGCACACAGCAAAATTTGAAATGCCGAGAGGCAATGAAAATTTGGGAGTTTATTA	
7081	GTTCAACTACAGTTAGAAGTCTTCTACAGGAAGCAGAGAGCAAGTCAAGTATGGCATTAG	
7141	AAGAACTCTTAGGCAATATCAAGCAGCCAAATCTGTAATGAGGCTGAACCTGAAGGGT	
7201	GTAGTGAACCATTTGGGAAATAAATTTATTTCCCTATGATGACTGCAATAAAAAGTGATT	
7261	CAAGTAGTGCAGTGTGAAATGGTTCTGCTGCTGGGACAGTAATTTACCAGAGT	8L
7321	CTTTGGAATCAGTTCTGATGTTCTTCTAAACTTCTTTCCATATGTTTACCACCAAGACAA	8.6A_R
7381	GTATAACAGATAGCAGGGAGGAAAGAGGGTGTGTCAGAGAGTGGAGTGGTGGTAGCA	8R
7441	GTGTAGATTCACTGGCTGCACATGTGAAAACCTTCTGCAATGTGAATCTCACTGAATC	
7501	ATGCTAAAGAAATACTCAGAAATGCAGAGAAGGAAAGCCGGTACGAGCAGATGCCT	9L
7561	GGAAATGAAGTTCAATTTAGCACATGATTGGGATACTCCATTTTCAAGTAAATGAAG	
7621	ATGACAGGAGGAAAGTAGAAGAGATCAAGGCAGAGTTATTTGGTCATGGAAACAACACTG	9R

7681	<a href="#">ACTTGTCCAAGGGTTTACAGAGTCCACGGGGAATGGGATGCAAGCCAGAAGCTGTATGTA</a>	
7741	<a href="#">GTCACATATATATTGAGAGCCATGAAAAGGGATGTTCCGGACTCTAACTTCTGAAACATC</a>	
7801	<a href="#">CACAACTAGATAGACACCCCTTGCTGCTTTTTCAGATCTGCTGGACCCCTCAGAAATGACCCAGAG</a>	
7861	<a href="#">GACGGCAGAACCCTATCATCATGCAGAGCCCAAGCATGCAACCTTTCTGCATCCTTAGACC</a>	
7921	<a href="#">AGAACAACTCCCACTTCAAAGTTTGGAAATTCCTGTCAGTTAAAAGATCATTCCCCATTTT</a>	
7981	<a href="#">AGAACCTTATACCTGATGAATTCAAAATCAGCAAAGGCTTTCGAATGCCATTCGATGAAA</a>	
8041	<a href="#">AGATGGACCCCTTGCTGTCAGAATTAGTAGAACCTGCTTTTGTGCCACCTAAAAGAAGTGG</a>	
8101	<a href="#">ATTTTCATTTCTCATCACAATGCCGTCGCCAGAACCCATGAAAAAGTTTACTACCTCCA</a>	
8161	<a href="#">TCACCTTTTCATCTCACCCGACATTTAAATGCATTTCCAATTCCTCTGTTGTTAAGGTTG</a>	
8221	<a href="#">GTGTTACTGAAGGTAGCCAGTGTACTGGAGCATCTGTGGGGGTATTAAATTCATTTCA</a>	
8281	<a href="#">CTGAAGAACAATAATCCCTCCAGAGATCTTAAACAGAAAACCTCTCCCTTTCATCATTTA</a>	
8341	<a href="#">AAATGCATAGTAATTCACAAGATAAAGAAGTACTATTTTAGCAGAAGGTAGAAGGCCAAA</a>	
8401	<a href="#">GCCAAAATTAACCTGTTGATTTTGGACGTTCTTTTCAAGAAGAAAAACCTTAGAAAAGAT</a>	
8461	<a href="#">CAGATTTTACAGGCAGTCACTCTGAGCCAGTACCAGGCAAAATGTAGCAATTTCAAGG</a>	<b>rs2056486</b>
8521	<a href="#">AAATTCAGATTTCTGATAACCATAACCTTATTAGCATGGGCAGACCAAGTCCACCCCTAG</a>	
8581	<a href="#">GAGTAAAACAGATCGAGTTCAGACTAGGAGTAAAAGAGAAGAATGTAACATAAATCCAG</a>	
8641	<a href="#">ATCTTCCCTCTGTCATTTTCTTGAACACAGAGAGCTCTTGAACAAAGCAAAGCCAC</a>	
8701	<a href="#">GTGCAGATGACCATGTGAGGAAACCACTTCTCCCTCTCCTCAACATCAGGATATGTAG</a>	10L
8761	<a href="#">CTCCAGACTCTCCTTCTTGCAATTTTCTTGAACACAGAGAACTCTTGAACAGTCAAAG</a>	
8821	<a href="#">CCCCATATGTAGATCATCAAATGAGAGAAAACCACTTCTCCCTTCTCAAGGTCAAGGAT</a>	
8881	<a href="#">CTATAGCTTCAGACCTTCCGCTCTCCCAATTTCTTGAACAATGCCAAAAGCAAAGCCAG</a>	10R
8941	<a href="#">GTGTAGATGACCAAAATGAATAAACACCACTTTTCCCTTCTCAAGGTCAAGGATGTGTAG</a>	
9001	<a href="#">TGGAAAAAATAAACAACAAGCCATAACACACATTTCTAATAATAAATGTTGAAGCCA</a>	
9061	<a href="#">AGTTCAATCTGATGCTGGTCTCCAGTCAAGCCCAATCACTGTACATTAGCAGCATGTGCAT</a>	
9121	<a href="#">CTACTCCTCCTTCAAATAGAAAAGCACTTTCTGTTTCATATAACTCTTTGTCCCAAGA</a>	
9181	<a href="#">TTCTCTCAAGTTGGATAGTGGAACTTTAGATGAAAGATTCCTTCAATGGATGCTGCTT</a>	
9241	<a href="#">CTAAAGCCAGGATGAATAGTGAATTTAACTTTGACTTACATACTGTATCTTCAGATCAC</a>	
9301	<a href="#">TGGAAACCAACCTCAAATTTATGACCAGTAAACCTGTAGCACAGGATCAAGAATCTTTAG</a>	
9361	<a href="#">GTTTCTTAGGACCTAAATCTTCACTGGATTTCCAAAGTCGTACAGCCTCTCTTCCAGACA</a>	
9421	<a href="#">GTAACACTTATTACTCAGGACTTGAAAACCACTTCTTTCAGAAATGACAGATAGTAACT</a>	
9481	<a href="#">CCAGGCAAAACAAGTGAACATTTTCAGATTTTCAAGGACATTCGAATCCAGAGGGACCC</a>	
9541	<a href="#">CAGTATTTGCAGATCGATTTACCAGAGAAGATGAGAGCCCACTTTCTGCTTTCTCTGAAA</a>	11L
9601	<a href="#">AATFTGCATCTGATGCACTCACTCAGATAAACACAGAAAGTCCAGAAAAGCCCTATTTT</a>	
9661	<a href="#">CATCTGAGATTTTATTAATGCTGAAGATCGTGGACATGAAATATAGAGCCTGGTAACC</a>	
9721	<a href="#">AGAAGCTACGCAAGCTCCTGTCAAGTTTGCCTCATCATCTTCACTCAACAGGTTACTT</a>	B5, 11R
9781	<a href="#">TTTCTCCGGGCACAGATGGCCAGCCTTTATTTATGCCATATAAGCCCTTCTGGTAGTACA</a>	12L
9841	<a href="#">AGATGTATTTGTTCCACAATTAAGACAATTTCTCCATCTCCGGATTTCAAATCAGATA</a>	
9901	<a href="#">CCACCGTTGAAGCTCCCAATTCAGGATCCAATGATGCCATTTGCTCCAGACTTCCAGCTC</a>	12R, 13L
9961	<a href="#">AGGTGCTAGGCACAAGAGATGATGACCTCTCAGCCACTGTATAACATAAACAATAAAGAA</a>	
10021	<a href="#">GAATCTACAGTAAGAGGGTAGTGACTAAGGCATCCTTCCAGTGGGAGAAAACCTTGC</a>	
10081	<a href="#">AGAAATGAAAATGACAGTGCCTCAGTTCAAGTGTAACTCACTGGGGATGAGAACCCTCAG</a>	13R
10141	<a href="#">ACAAAAACAGCAAGAGATTCACAGTACAAGGGCAGTGAAGGCTGAGGCTGCCAGGCTAAAG</a>	A3
10201	<a href="#">AAAAAAGATCTTTGCAGAAAGATATGCAGATTTCCAGTCTGCTGCTGTCAGAGCACT</a>	
10261	<a href="#">CAGCTCAAGTAGGAGACCCAGAAATGAAGAACTTGCAGACATAAAGCCATTACACAGA</a>	15L
10321	<a href="#">AAGAGGAGATCCATAGGAAGAAGACAGTTCCCGAGGAAGCCTGGCCAAACAATAAAGAAAT</a>	
10381	<a href="#">CCCTACAGATCAATATGAAGAGTCCGAATGTCAATTCAGAAATTTGAAAATCTACCCGTT</a>	15R
10441	<a href="#">CTGCTTTCAGGTCAGCAAAGTTTACATTCATCTCCCTACACCTACCAAGTATCAAG</a>	
10501	<a href="#">ATATTTGCCATGAAATCTTTGGGAAAGAGTGTTTTTCATGAGACATTTCTGAAAGATTTCT</a>	
10561	<a href="#">TTCAGCATCATCCAGACAACATAGAGAACACATGTGCTTCTCTCTTATCAAAAACA</a>	
10621	<a href="#">TGGACAAGACTAAGACAGATTATACCAGAAATAAAGAGCCTCAGCATCAATGTGAATTTGG</a>	
10681	<a href="#">GAAACAAGAGATGATGGAATACTACTAAAAGTCAAGTTAGAGATTTATCCAAAACATAATG</a>	
10741	<a href="#">GACAAATAGTGTATCCACAAGGGATCAGAAGGTCAAGGCTCAGGCAAGCAAACTCAGCACA</a>	
10801	<a href="#">CTGTGATTTGAAATGAACTGTGGAACAAGTATCGGGAGCCAGAGGCAACAGAGACAGC</a>	16L
10861	<a href="#">CTGAGTTGGGTGACAGGAAAGAACTGTCTTGGTGGACCGACTTGATCGTTTGGCTAAAA</a>	
10921	<a href="#">TTCTTCAGAAATCCAATCACACATTTCTCCAGGCTCAGAAAGTACACATGATGATAGCA</a>	16R
10981	<a href="#">GAGGGGAACGAAGTGAAGGAATGGATGGTAGACAACAGCAGAGAAATAAGCTTCAGA</a>	
11041	<a href="#">AAAAAGAGCGTTTAAAGCCTAGAGAAAAGCCATAAAAATAAGAGGCTTAAAAAAA</a>	
11101	<a href="#">GCAAGGTGCTTTCTCATCTCGAGCTGGGAGGTCTAATCAAATAAAAATGAACAGATTA</a>	
11161	<a href="#">AATTTGATAAATATATTTCTGAGTAAACAGCCAGGTTTAAATATATAAGCAACACTTCTT</a>	
11221	<a href="#">CGGATTTGCGCCCTCAGAGGAGAGTGAAGTCTCACAGATACTACCACCAACATCCTTT</a>	
11281	<a href="#">CCGGCACCACCTTCTACTGTGCAATCAGATATATTGACCCAAACAGATAGAGAGGTGGCTC</a>	
11341	<a href="#">TGCACGAAAGGATAGCTCTGTTTCCACTATTGACACTGCCCGGCTGATTCAGCTTTTGG</a>	
11401	<a href="#">GCAATGAAAGATATGCTTTGTCACCCAGACGAATTAATATATATAGCAGCATCACCAACC</a>	
11461	<a href="#">AACAGAGGAGATACCTTGAAGAGCGGACAAACACAGCAAGAAAGTGTGAATACAGGTC</a>	
11521	<a href="#">ATCCCTAGTGACTTCTGAGCACACCGAAGGAGACATCCAGGTAGCAAACCATGTGA</a>	
11581	<a href="#">TTTCTTCTGACTTATTTCTCTTCTGCCAGTAGTTTCTGAGCTCAAACCTACTTTTTT</a>	17L
11641	<a href="#">GCAACAAGCAGAAATGTACACATGTTAAACAAGGGCATACAAGCAGGTAACCTGGAGATTG</a>	
11701	<a href="#">TGAAAGGTGCCAAAACAACACTCGAGATGTTGGGATAACTTTCCCAACTCCAAGTTCCA</a>	17R, 18L
11761	<a href="#">GCGAGGCTAAATTTGAAGAGAACAGTGTGACTTCTTGGTCAAGAAAAACGTTGAAG</a>	
11821	<a href="#">AGAAAATGCTCTTTACCAGTTATCTCTGAGGACAGAAAGTTAAAAAGAAACAAGAAAT</a>	
11881	<a href="#">CCCATGAGGAGTTTCTGTTTGTCTTCTGTTGAAAATGTTGGAGTCTAGATCAAAGAAGG</a>	18R
11941	<a href="#">AAAACGTGCCTAACACTTGTGGCCCTGGCATCTCTGTTTGAACCAATAACCAAGACCA</a>	19L
12001	<a href="#">GACCTTGGAGGGAGCCACTGCGGGAGCAGAACTGTCAAGGGCAGCAGCTGGACCGTCCGG</a>	
12061	<a href="#">GCTTACCCTGGCAGGCCAGGACAGAGGCTGGCAGAGACCTACTGAGCCATTTGTGAGAG</a>	
12121	<a href="#">CAACCTTCAGGAATCGCTTCAAGTTTACAGACCTGACTTCACTCCCGCTCTGGGGAGC</a>	<b>rs1052161</b>
12181	<a href="#">GGATAAAGCGCCTGAAGTTAATAGTCCAGGAGAGGAGCTGCAGAGCATGTTACAGACCC</a>	19R, 20L
12241	<a href="#">AGCGGATGCACTATTCAAATGACAGGGAACGGCAGGGCCACCAGAAATCGCATGTGCC</a>	
12301	<a href="#">CGCTGCCAAGAGAGTCTTCTGGCTATCCAGAAGAACAGCCTATCAGCAAGAGGAAA</a>	20R
12361	<a href="#">TGATTCAGAGTCCAACCGGATTTATGAGCAGCTTCCAGAAGTACAGAAAAAGAGAGAAG</a>	
12421	<a href="#">AAGAGAAGAAAATCAGAAATATAAGTCATACCCGCTGCGAGCCAGCTATATAAAAAAG</a>	
12481	<a href="#">GAGTGACCAATCAACTTCTGGGAGAAAAGTTCCTGGGAC</a>	
12541	<a href="#">TCTGCTTCTGACTTATTTCTCTTCTGCCAGTAGTTTCTGAGCTCAAACCTACTTTTT</a>	23L_A
12601	<a href="#">GCAACAAGCAGAAATGTACACATGTTAAACAAGGGCATACAAGCAGGTAACCTGGAGATTG</a>	23L
12661	<a href="#">TGAAAGGTGCCAAAACAACACTCGAGATGTTGGGATAACTTTCCCAACTCCAAGTTCCA</a>	
12721	<a href="#">TGCATTTGCAAGTGTGTTGTTTCTGTTGAAAATGTTGGAGTCTAGATCAAAGAAGG</a>	23R, 23R_A, 23R_B, 23R_C
12781	<a href="#">TTTCTTCTGACTTATTTCTCTTCTGCCAGTAGTTTCTGAGCTCAAACCTACTTTTT</a>	



**Abbildung 38: Gesamt-mRNA-Sequenz von ALMS1 aus der Zelllinie L-1236.**

Dargestellt sind sämtliche im Rahmen der Arbeit untersuchte und charakterisierte Exons in unterschiedlicher Farbe.

### 8.2 ALMS1-Protein

Aus der in 9.1 dargestellten Sequenz ergibt sich folgende Abfolge der Aminosäuren (dargestellt im Einbuchstaben-Code). Sich überlappende Spleißstellen (*residue overlap splice sites*), an denen eine Aminosäure durch Anteile von zweier Exons codiert werden, sind rot dargestellt. Gelb markiert ist der Aminosäureaustausch in Rahmen von SNPs. Bereiche, in denen Spleißvarianten vorliegen, sind cyanblau markiert.

schwarz, blau = alternierende Exons        = SNP/Aminosäureaustausch  
 rot = *residue overlap splice site*        = Bereiche mit Spleißvarianten



```

2521 NLAHDCGYSISELNEDDRKVEEIKAEILFGHGRITDLSKGLQSPRGMGCKPEAVCSHII
2581 ESHEKGCFFRTLSEHPQLDRHPCAFRSAGPSEMTRGRQNPSSCRAKHVNLASLDQNNSH
2641 FKVWNSLQLKSHSPFQNFIPDEFKISKGLRMPFDEKMDPWLSELVEPAFVPPKVEVDFHSS
2701 SQMPSPEPMKFTTSTIFSSHRSKCSINSSVVKGVTEGSOCTGASVGVFNSHFTEEQN
2761 PPRDLKQKTSPPSSFKMHSNSQDKVETILAEGRRSQKLPVDFERSFQEEKPLERSDFTG
2821 SHSEPT [R/S] ANCSNFKEIQISDNHTLISMRPSSTLGVRSSSRLGVKEKNVTITPDLFPC rs2056486
2881 IFLEQRELFQSKAPRADDHVRKHSPPSQHQDYVAPDLPSCIFLEQRELFQCKAPYVD
2941 HQMRENHSLPQQGDSIASDLPSPISELEQCSKAPGVDDQMNKHHFPLPQQGDCVVEKNN
3001 QHKPKSHISINVEAKFNTVVSQAPNHCTLAASASTPPSNRKALSCVHITLCPKTSSKL
3061 DSGTLDERFHS LDAASKARMNEFNFDLHTVSSRSLEPTSKLLTSKFVAQDQESLGFGLP
3121 KSLDLQVVQPSLPSDNTITQDLKTI PSQNSQIVTSRQIQVNI SDFEGHSNPEGTVPFAD
3181 RLPEKMKTPLSAFSEKLSDDAVTQITTESPEKTLFSSEIFINAEDRGHEIEPQNQKLRK
3241 APVKFASSSSVQQVTF SRGT DQFLLLPYKPSGSTKMYYPQLRQIPSPFDSKSDTTVES
3301 SHS [G]SNDALAPDFPAQVLGTRDDLSATVNIKHKEGIYSKRVTKASLPVGEKPLQENENA
3361 DASVQVLIITGDNLSDDKQQEIHSTRAVTEAAQAKEKESLQKDTADSSAAAAAHSQAQVG
3421 DPEMKNLPDTKAITQKEEIHRRKTVPEEAWPNKESLQINIESECHSEFENTRSVFRS
3481 AKFYIHHPVHLPSDQDICHESLGLKSVFMRHSWKDFQHHPKHREHMCLPLPYQNMKTK
3541 TDYTRIKSLISNVNLGNKEVMDTTKSQVRDY PKHNGQISDPQRDQKVTPEQTTQHTVSLN
3601 ELWNKYRERQRQPELGDRELSLVDRDLRLAKILQNPITHSLQVSESTHDSRGRERS
3661 VKEWSGRQQQRNKLQKKRFSLEKSHKNTGELKSKVLSHHRAGRSNQIKIEQIKFDKY
3721 ILSKQPGFNYISNTSSDCRPSESELLDTTNTNLSGTTSTVE SDILTQTDREVALHERS
3781 SSVSTIDTARLIQAFGHERVCLSPRRIKLYSSITNQRRYLEKRSKHSKVLNTGHPLVT
3841 SEHTRRRHIQVANHVISSDSISSASSFLSSNSTFCNKQNVHMLNKGIQANLEIVNGAK
3901 KHTRDVGITFPSPSSEAKLENSDVTWSSEKREKMLFTGY PEDRLKLNKKNKSHEGV
3961 SWFVPEVNESRSKKENVPNTCGPGISWFEPITKTRPWREPLREQNCQGHLDGRGYLAG rs1052161
4021 PGREAG [R/K] PFVVRATLQESLQFHRPDFISRSGERIKRLKLIQVERKLSQMLQTERDAL
4081 FNIDRERQGHQNRMCPLPKRVFLAIQKNKPI SKKEMIQRSKRIEYQLPEVQKKREBEKRR
4141 SEYKSYRLAQLYK [R]VTINQLLGRKVPFW
    
```

**Abbildung 39: Gesamtproteinsequenz von ALMS1 aus der Zelllinie L-1236.**

### 8.3 DNA-Microarray-Daten

**Tabelle 4: Microarraydaten zur Analyse der Genexpression.**

Dargestellt sind die jeweiligen Probensorten und Signalintensitäten der für ALMS1 bzw. ALMS1-IT spezifischen SONDENSÄTZE unter Angabe der Probe Set ID.

Gewebe	Datensatz	214220_s_at	214221_at	214707_x_at	1556911_at
		ALMS1	ALMS1	ALMS1	ALMS1-IT
Naive B-Zellen	GSM312870	777,77	246,84	18011,52	314,69
Naive B-Zellen	GSM312872	846,21	585,76	30939,94	196,33
Naive B-Zellen	GSM312874	715,08	621,82	30858,52	216,92
Naive B-Zellen	GSM312875	893,07	751,13	20195,13	8,93
Naive B-Zellen	GSM312876	67,99	52,49	23210,33	114,71
Gedächtniszellen	GSM312877	856,36	604,64	9942,41	498,69
Gedächtniszellen	GSM312879	1279,89	250,69	26857,98	224,71
Gedächtniszellen	GSM312882	253,65	622,92	18393,78	483,17
Gedächtniszellen	GSM312883	1125,17	455,19	14199,96	17,91
Gedächtniszellen	GSM312886	906,91	372,98	21559,18	356,96
Zentrozyten	GSM312887	1235,91	391,2	18353,88	411,4
Zentrozyten	GSM312890	1798,49	893,33	11602,35	176,5
Zentrozyten	GSM312893	775,9	960,99	15816,13	23,27
Zentrozyten	GSM312894	1285,49	785,71	10489,38	324,62
Zentrozyten	GSM312895	1870,97	1430,65	25082,08	365,52
Zentroblasten	GSM312937	1913,82	760,77	13779,36	177,98
Zentroblasten	GSM312938	1335,17	1046,71	15683,89	362,21
Zentroblasten	GSM312939	1130,71	543	12215,76	82,03
Zentroblasten	GSM312940	918,95	869,25	11910,39	185,88
Zentroblasten	GSM312941	1176,22	1070,24	17945,01	173,92
Plasmazellen	GSM312942	810,68	596,23	20568,89	281,78
Plasmazellen	GSM312943	731,2	278,84	11022,36	214,16
Plasmazellen	GSM312944	972,17	870,05	10542,8	30,6
Plasmazellen	GSM312945	775,24	717,01	10374,53	7,69
Plasmazellen	GSM312946	1206,33	577,66	16846,85	55,49
Ovar	GSM175789	672,18	805,86	5849,45	153,12
Ovar	GSM176131	891,2	895,63	4919,8	332,05
Mamma	GSM175792	429,92	544,88	3620,42	17,8



Mamma	GSM175795	384,64	729,88	4252,07	130,55
Synovialmembran	GSM175810	527,65	610,83	2861,85	266,83
Synovialmembran	GSM175811	751,75	684,5	5232,3	97,66
Herzvorhof	GSM175814	390,97	417,02	3377	98,1
Herzvorhof	GSM175815	241	294,03	1603,09	185,35
Herzventrikel	GSM175817	251,86	257,79	2842,87	182,81
Herzventrikel	GSM175819	269,98	219,42	2347,33	69,72
Koronararterie	GSM175820	257,15	573,67	3099,36	201,74
Koronararterie	GSM175821	507,05	642,06	3623,54	108,84
Kardia	GSM175822	347,67	671,63	3860,47	147,11
Kardia	GSM175823	277,54	312,99	2139,13	225,6
Dorsale Basalganglien	GSM175825	242,6	268,56	3703,42	107,62
Dorsale Basalganglien	GSM175827	359,23	315,17	2108,35	149
Ventrales Tegmentum	GSM175829	339,21	426,03	4806,42	244,25
Ventrales Tegmentum	GSM175831	470,62	415,27	2658,55	141,35
Cervix	GSM175833	405,35	521,32	2387,13	161,54
Cervix	GSM176130	704,77	605,3	4456,74	129,32
Omentum majus	GSM175834	363,6	469,33	1228,01	115,68
Omentum majus	GSM175836	263,77	208,19	3115,47	107,95
Mamille	GSM175838	170,98	466,09	5761,71	83,87
Mamille	GSM175840	194,46	233,03	3926,8	130,67
Amygdala	GSM175842	224,17	335,65	2211,93	161,34
Amygdala	GSM175844	281,97	429,95	5415,59	126,22
Putamen	GSM175846	239,52	324,51	3214,47	153,75
Nucleus accumbens	GSM175849	259,07	283,82	3313,67	115,4
Nucleus accumbens	GSM175851	258,14	259,45	3531,49	61,35
Cerebellum	GSM175852	359,46	441,13	7122,94	130,4
Cerebellum	GSM176157	443,14	492,28	5314,7	104,35
Corpus callosum	GSM175855	406,9	461,17	3709,38	225,97
Corpus callosum	GSM175857	459,59	547,61	5564,94	207,47
Frontallappen	GSM175859	300,4	326,22	4062,49	200,09
Frontallappen	GSM175860	264,05	394,01	5382,89	186,61
Hippocampus	GSM175861	67,87	563,91	6883,23	154,25
Hippocampus	GSM175987	394,64	373,04	3096,72	128,57
Parietallappen	GSM175862	191,01	319,31	3020,51	102,71
Parietallappen	GSM175864	346,92	378,36	2998,34	171,41
Rückenmark	GSM175865	342,25	327,54	3252,07	122,15
Rückenmark	GSM175867	467,08	487,18	3862,06	114,12
Nucleus subthalamicus	GSM175869	354,22	382,28	3628,67	142,18
Nucleus subthalamicus	GSM175870	507,13	491,98	3595,26	133,33
Substantia nigra	GSM175871	367,22	394,96	2624,52	238,06
Substantia nigra	GSM175873	353,05	515,5	2559,15	132,45
Temporallappen	GSM175874	273,94	268,45	3534,51	156,56
Temporallappen	GSM175876	205,89	264,73	2478,1	91,41
Vagina	GSM175878	382,7	337,69	1353,54	143,82
Vagina	GSM176129	532,12	746,77	4194,05	187,88
Vena saphena magna	GSM175879	777,99	685,08	4104,5	220,2
Vena saphena magna	GSM175880	686,91	657,48	2982,9	167,23
Skelettmuskel	GSM175882	182,5	253,75	2831,29	24,27
Skelettmuskel	GSM175883	273,86	293,8	3218,31	238,87
Thalamus	GSM175885	231,89	453,58	3342,28	129,58
Thalamus	GSM175887	306,32	302,74	3268,9	17,31
Ganglion trigeminale	GSM175889	282,99	298,98	2910,82	88,42
Ganglion trigeminale	GSM175891	369,42	442,16	3203,43	108,21
Nucleus vestibularis superior	GSM175893	134,43	421,26	2610,82	88,14
Nucleus vestibularis superior	GSM175894	383,76	448,5	2986,15	141,4
Zungenoberfläche mit	GSM175896	335,78	348,09	3602,03	207,93
Zungenoberfläche mit	GSM175898	134,76	328,75	2711,98	94,39
Zungenkörper	GSM175900	403,25	261,44	1569,6	134,01
Zungenkörper	GSM176014	287,89	257,34	1828,54	101,33
Mittelhirn	GSM175901	314,83	336,72	3252,9	107,67

Mittelhirn	GSM175903	273,79	536,56	3139,97	111,27
Prostata	GSM175923	666,18	693,29	2063,77	168,74
Prostata	GSM175924	524,09	684,87	2620,42	206,98
Thymus	GSM175973	547,75	721,91	7197,51	35,89
Thymus	GSM176262	825,61	1021,85	3656,85	117,21
Knochenmark	GSM175974	452,77	532,5	6431,95	234,26
Knochenmark	GSM176300	520,92	288,23	3123,63	24,72
Trachea	GSM175980	226,44	315,85	3810,04	168,86
Trachea	GSM175981	414,24	615,39	3863,48	150,93
Jejunum	GSM175982	418,22	387,02	4409,72	55,95
Caecum	GSM175983	832,03	551,17	4360,67	120,7
Caecum	GSM175984	511,25	437,34	3087,24	196,95
Haut	GSM175993	212,4	294,19	5542,59	167,99
Putamen	GSM176020	302,41	286,63	4161,91	66,31
Mamma	GSM176231	518,77	640,08	8406,66	120,29
Mamma	GSM176232	367,18	395,62	3367,31	80,52
Eileiter	GSM176239	710,82	812,81	4639,95	198,34
Aorta	GSM176263	448,92	958,91	3014,25	262,62
Aorta	GSM176264	496,75	631,13	3456,23	113,96
Jejunum	GSM176265	341,41	375,91	1628,58	122,4
Haut	GSM176267	407,88	395,07	3689,26	121,13
Synovialmembran	GSM176268	728,8	666,52	1819,79	158,22
Synovialmembran	GSM176269	629,37	674,25	1687,78	136,05
Penis	GSM176270	355,1	463,72	3301,76	108,05
Penis	GSM176271	269,47	409,84	1618,74	141,35
HUVEC	GSM176298	332,7	188,63	1120,1	78,81
HUVEC	GSM176299	241,59	254,83	1408,73	8,42
Musculus deltoideus	GSM176301	304,26	497,15	3638,85	233,03
Musculus deltoideus	GSM176312	436,98	457,75	3663,79	147,19
Substantia nigra, Pars compacta	GSM176393	407,07	347,8	2740,52	239,5
Substantia nigra, Pars compacta	GSM176401	292,58	359,1	2238,13	6,64
Substantia nigra, Pars reticulata	GSM176395	270,87	585,42	3315,26	233,26
Substantia nigra, Pars reticulata	GSM176402	541,45	468,93	2975,08	67,98
Globus pallidus medialis	GSM176436	358,83	451,47	2513,69	214,96
Globus pallidus medialis	GSM176445	797,94	499,6	2896,04	319,1
Globus pallidus lateralis	GSM176447	901,75	751,4	3141,87	134,93
Globus pallidus lateralis	GSM176448	468,97	592,94	3605,54	61,85
Nucleus subthalamicus	GSM176451	761,67	358,55	2011,67	18,18
Nucleus subthalamicus	GSM176453	564,03	366,04	1520,83	7,48
Thalamus	GSM176452	575,04	383,58	1881,46	212,67
Thalamus	GSM176454	231,12	457,01	1962,96	45,16
Bronchus	GSM80578	338,83	346,19	3648,17	145,86
Bronchus	GSM80579	578,2	506,55	2970,01	194,16
Subkutanes Fettgewebe	GSM80589	211,7	492,49	1458,87	154,57
Subkutanes Fettgewebe	GSM80590	397,68	363,49	1250,62	157,48
Nebennieren-rinde	GSM80606	424,23	368,37	5050,92	124,24
Nebennieren-rinde	GSM80607	333,27	352,31	3117,85	102,63
Großhirnrinde	GSM80651	268,82	361,66	2777,67	116,94
Großhirnrinde	GSM80652	418,85	423,93	2410,88	110,81
Endometrium	GSM80672	540,21	865,78	11542,33	153,35
Endometrium	GSM80673	940,32	795,75	6950,42	218,33
Niere	GSM80687	210,75	240,65	3601,05	94,86
Niere	GSM80688	222,35	506,25	2610,48	97,53
Hypothalamus	GSM80691	260,91	299,8	3962,15	135,23
Hypothalamus	GSM80692	532,16	410,12	3868,17	94,76
Ösophagus	GSM80695	335,8	333,13	2072,26	45,28
Ösophagus	GSM80696	268,45	291,81	3574,05	97,46
Lunge	GSM80707	365,09	350,92	3812,66	183,52

Lunge	GSM80712	270,67	370,43	3999,49	100,19
Medulla oblongata	GSM80709	252,41	360,07	3984,11	160,53
Medulla oblongata	GSM80711	481,04	363,18	4581,51	88,3
Myometrium	GSM80718	747,38	679,84	6410,97	302,04
Myometrium	GSM80719	821,79	545,25	5552,26	182,73
Leber	GSM80729	265,17	349,85	4725,65	145,59
Leber	GSM80730	224,76	259,49	4089,53	111,39
Nierenmark	GSM80732	380,51	471,62	6411,02	144,45
Nierenmark	GSM80733	552,33	618,6	5455	79,3
Lymphknoten	GSM80736	452,35	245,78	4891,09	100,65
Lymphknoten	GSM80737	335,92	618,09	7006,39	185,06
Pharyngeale Mukosa	GSM80748	293,53	254,9	2627,54	163,62
Pharyngeale Mukosa	GSM80749	199,4	59,17	2421,24	92,41
Nucleus nodosus	GSM80769	393,23	360,09	3271,17	90,01
Nucleus nodosus	GSM80770	448	413,53	2238,49	190,15
Okzipitallappen	GSM80773	504,53	495,49	4433,67	151,77
Okzipitallappen	GSM80774	362,33	338,89	2256,82	156,47
Orale Mukosa	GSM80777	362,88	222,78	3757,24	112,79
Orale Mukosa	GSM80778	355,2	304,1	3031,71	111,09
Fundus des Magens	GSM80810	602,63	613,49	4768,89	54,8
Fundus des Magens	GSM80811	337,5	469,22	1878,63	134,87
Pylorus des Magens	GSM80814	382	344,7	3028,73	54,21
Pylorus des Magens	GSM80815	334,73	341,22	3425,81	118
Epiphyse	GSM80817	506,78	514,73	6111,11	16,58
Epiphyse	GSM80818	396,68	478,22	4680,11	140,83
Speicheldrüse	GSM80821	350,09	466,84	4905,28	74,18
Speicheldrüse	GSM80822	386,91	625,99	3056,93	6,18
Milz	GSM80825	308,11	450,54	4807,04	160,75
Milz	GSM80826	366,14	397,55	6798,4	11,64
Schilddrüse	GSM80865	469,75	457,96	5575,73	101,62
Schilddrüse	GSM80866	680,83	742,77	6065,01	84,95
Tonsille	GSM80886	232,84	419,87	2674,66	93,43
Tonsille	GSM80889	411,6	411,62	5737,92	63,92
Vulva	GSM80897	458,8	348,77	3839,75	229,9
Vulva	GSM80898	270,8	446,95	3609,66	229,76
Urethra	GSM80911	335,62	385,29	2735,55	97,26
Urethra	GSM80912	422,13	542,7	2743,53	113,26
Hoden	GSM176276	1269,83	666,65	2161,61	198,31
Hoden	GSM176422	1291,22	703,94	3644,55	191,16
Hoden	GSM176423	1107,86	601,41	2908,92	200,93
Hoden	GSM176275	1628,83	1173,29	4195,23	220,1
Hoden	GSM176113	1003,78	500,91	3062,58	140,31
Klassisches HL	GSM312811	721,34	580,8	11623,13	510,25
Klassisches HL	GSM312812	1139,04	419,38	12646,35	280,82
Klassisches HL	GSM312813	315,03	64,4	4760,46	329,73
Klassisches HL	GSM312814	178,96	362,39	8491,68	11,99
Klassisches HL	GSM312815	602,15	499,57	15155,83	218,7
Klassisches HL	GSM312816	18,51	199,33	36737,62	253,06
Klassisches HL	GSM312817	288,28	151,47	4770,93	624,09
Klassisches HL	GSM312818	341,41	230,35	30466,69	1057,04
Klassisches HL	GSM312819	38,95	235,42	2739,43	433,88
Klassisches HL	GSM312820	654,7	33,72	23320,6	531,35
Klassisches HL	GSM312821	205,9	269,77	26070,77	220,54
Klassisches HL	GSM312822	549,13	323,29	12219,75	177,62
Klassisches HL	GSM371754	538,03	335,62	118152,4	70,76
Klassisches HL	GSM371755	259,7	52,08	31312,93	478,98
Klassisches HL	GSM371777	151,63	352,47	13520,22	82,37
Klassisches HL	GSM371780	257,44	670,73	10952,87	409,51
L-428	GSM311200	259,19	238,41	299,52	164,96
L-428	GSM499721	374,08	338,21	546,21	387,13
L-428	GSM499729	320,57	320,23	347,51	491,97

L-428	GSM637960	170,79	233,19	286,2	374,67
L-1236	GSM499722	469,8	368,26	845,92	167,64
L-1236	GSM499730	484,18	373,32	540,86	311,5
L-1236	GSM637962	288,05	511,09	198,4	627,58
KM-H2	GSM499723	1190,62	1043,04	611,71	1508,64
KM-H2	GSM311194	798,1	884,9	194,36	1072,62
KM-H2	GSM499731	823,25	752,12	545,03	1984,81
KM-H2	GSM637959	1005,04	1899,33	328,28	1951,28
HDLM-2	GSM499724	422,85	262,13	456,6	224,38
HDLM-2	GSM499732	363,13	214,71	426,74	249,32
HDLM-2	GSM637963	481,8	511,5	320,24	169,4
L-540	GSM499726	472,61	366,42	345,81	680,01
L-540	GSM637961	443,24	653,33	270,63	340,49
L-540	GSM499725	419,25	370,94	646,01	268,94
Keimzelltumor	GSM172582	1290,12	723,31	603,78	203,46

#### 8.4 DNA-Microarray-Target-Sequenzen mit Bindungsstellen der verwendeten Primer

Nachfolgend dargestellt sind die Target-Sequenzen der verschiedenen SONDENSÄTZE aus den DNA-Microarray-Analysen, die in der PCR und qRT-PCR verwendeten Primer und deren spezifischen Bindungsstellen. Die Primer-Bindungsstellen sind unterstrichen. Die dazugehörigen Primer-Namen sind rechts neben der Target-Sequenz beschriftet.

##### 1556911\_at ([https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133\\_PLUS\\_2:1556911\\_AT](https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133_PLUS_2:1556911_AT))

```

1  GGTGTCAGGTATGTTACTATTTCTATAATGTACAAGACAGTCCACACAATGAAGAGTTG           Up_L
61  TCCCTGTGCACATACAGCTTTTGAATGTCCCTGTAGATATTAATGTTGATGAAAAACCTG
121 TTATAAATTACTTCAGTGTGTCATGTTTAAATGATTTTTTTTTTAGTATAGGGTGT
181 TCTTCTGTTTTTCTTCTTTCATGACTGACATTTTGAAGAGTACAACCTAGTTACTTT           Up_R
241 GCAGATTTCCCTCAAATGAATTTATCTGGTGTTTTATCATGATTTGATTGAGTTGAT
301 TTTTATGTAGGAAAGCCACAGAAGTGATGTGCTTTTCATGCTTGTGAGGAGGCACATTAT
361 GTTGATTTGTCTCAATACTTGTAAATGTTAACTCATACCACCTAGTTAAGTGGTATCTGC
421 TGGTTGTGTGTTTTACATATTAATTAATAAGTTAATAAATATTAGGGAGAGATTCCTTG
      AGACTGTAAATATCTCTAGTTTAGGATCTAGTGTTTTACTGCT

```

##### 214707\_x\_at ([https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133\\_PLUS\\_2:214707\\_X\\_AT](https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133_PLUS_2:214707_X_AT))

```

1  CACCAAGTGGTCGGGAGCTCTGGCTTGCACAGAATAAATGTATTATACTCAAGTTTAAAC
61  ATTTATGAGAAAGTTGTGAGAGTCATTTCTCACTTATGGCACTGAAAAAAGCACA
121 TCATGGTATGAATGACTCATATGCAAAAGATGAAAACTTCTCACTAATTTGCATGTCTT
181 AGGCTCCTCTTTATTAGAAACCTAAATGTAATAAAGAATATTTTAGGCCAGGTACGGTG
241 GCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTAGGGAGGCCGAGGTGTGCAGATCAGATGAGGTTAG           Down_L
301 GAGTTCGAGACCAGCCTGGCCAACATGGTGAACCTCCATCTCTACTCAAATAACAAAAAT
361 TAGCTGGGTGTGGAGGCACACGCCCTGTAATCCCAGCTACTCAGTAGGCTGAGCCGGGAGG
421 ATCTCTTGAACCTAGGAGGCAGAGGTTGCAGTGAGCTTAGATGGTCCACTGFACTC           Down_R

```

##### 214220\_s\_at ([https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133\\_PLUS\\_2:214220\\_S\\_AT](https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133_PLUS_2:214220_S_AT))

```

1  ATATAAGTCATACCAGGCTGCGAGCCAGCTATATAAAAAGAGAGTGACCAATCAACTTCT
61  GGGGAGAAAAGTTCCCTGGGACTGACACAGTTTATTTTCTCAGAGCCTTGGAAATCTA           23L
121 TTTTATGAACCTAGAGAAGCAGAAATCCTTACTTTTGTGAGTCTGGTTGAATAAAGCTTA

```

##### 214221\_at ([https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133\\_PLUS\\_2:214221\\_AT](https://www.affymetrix.com/analysis/netaffx/fullrecord.affx?pk=HG-U133_PLUS_2:214221_AT))

```

1  AAGCTTATTTCTTTGTCCATGTGTATTTTAGAAATAGTAACTTCTAAAGAGTCTGGAACAA
61  AGTGGTGATTAATAATTCCTAATGGTTTGGGAGCAATACTTTCTGCATAGTGGCCTTGTC           23R
121 AATGGCCTGTGTGTTACAATGATATGATCATTCTCAAGAATAAGTCCCTTTTGTATGT
181 GT

```





GACCAGAAGACTGGCTACCAACAGTACCCTCTAGTGCATACTCACACAGAGAGAAGCTCCTTGTGTTTCTACCAACAGGCCCTTGCTGGACAGCCATCTACCCGAAGAG
ATTCTGAAAGTTTCAGCTGTTTCTGGACAGCTGACGGAAAGACTGGGACACAGCTGTAACCTCTACTTCTCGTCTCCTCTCACTTGGAGAAAAGCCAGTCT
TTCTATCAGCAGACCTTACCAATAGTCATCTAACTGAAGAGGCTCTGAAAGTATCAATTGTTCTGGACCAGGTGATCAGAAGACTGGGATACCCCTCAGCACCATCT
AGTTTCTACTCACACAGAGAGAAGCCATTATTTTTTCCAGCAGACCCCTGCCAGACTTTCTTTTCCCTGAAGAAGCTCTGAAGGTTTCAGCTGTTTCTGTATTGCC
TGCCCAAGACTGGGACACCAACAGTGCCTCTATTCTCCCTCACATAGCGAGAAATCTAGTGTTCCTACCAGCAGGAGTTGCCAGACCCGGTATTCTACCTAG
GAGAACTCTGAAATGTCTGCCTA

**Primer: 8neu\_A\_L + 8neu\_D\_R: 1116 bp. Sequenzierung mit dem Vorwärts-Primer. Gelb markiert ist der SNP rs2037814. Grün markiert ist der SNP rs2037814.**

CGTGTCCGGCTACTTACTACTCCATAGGGAGAGCCTTGAACATTACAAAAGAGTGTACCAGAGAGTAACCTAACCCGAAGAGCCCTTGGAAAGTTTCAGCTGCTCTGG
CCCAGTGGAGCAGAAGAGGGGAATACCTACAGTATCCTCTACATCCCCTCACATGAGAGGACCTCCTCTTTTCTATCGACAGACCTTGCCAGATGGTCATCTAAC
TGATCAGGCTCTGAAAGTCTCAGCTGTGTCTGGACCAGCTGACCGAAAGACTGGGACAGCAACAGTACTCTCTACTCCCCTCACATAGAGAGAAGCCCTGGTATTTTT
TTACCAACAAGAGTTTGCAGACAGTCTCAAACCTGAAGAGACTCTTACTAAAGTTTCAGCCACTCCTGGACCAGCTGACCAGAAGACTGAGATACCCAGTACAGTC
TAGTCTTACTCACAAAAGAGAAAAGCCTAGTATTTTGTACCCACAGGACTTAGCAGACAGTCTACCTGAAGAGGGTCTGAAAGTTTCAGCTGTTGCTGGACCAGC
TGACCAGAAGACTGGCTTACCAACAGTACCCTCTAGTGCATACTCACACAGAGAGAAGCTCCTGTTTCTTACCAACAGGCCCTTGCTGGACAGCCATCTACCCGAAGA
GGCTCTGAAAGTTTTCAGCTGTTTCTGGACCAGCTGACGGAAAGACTGGGACACCCAGCTGTAACCTCTACTTCTCTGCTGCTTCACTTGGAGAAAAGCCAGGTCG
TTTCTATCAGCAGACCTTACCAATAGTCATCTAACTGAAGAGGCTCTGAAAGTATCAATTGTTCTGGACCAGGTGATCAGAAGACTGGGATACCCCTCAGCACCATC
TAGTTTCTACTCACACAGAGAGAAGCCATTATTTTTTCCAGCAGACCCCTGCCAGACTTTCTTTTCCCTGAAGAAGCTCTGAAGGTTTCAGCTGTTTCTGTATTGCC
TGCCCAAGACTGGGACACCAACAGTGCCTCTAAATCTCACTCACATAGCGAGAAATCTAGTGTTCCTACCAGCAGGAGTTGCCAGAACAGTATTCTACCTAGA
GAATCTCTGAAAATGTCTGCCTA

**Primer: 8.3L + 8.4R: 779 bp. Sequenzierung mit Vorwärts-Primer.**

TTGCGAAGCCATTACTTCTACCGGCAGGCTCTGCAGAGACTCCTCTAAATAAAGAGGTTGTGAAAGTTTCAGCTGCTCCTGGACCCGCTGACCAGAAGACTGAGAC
ATTACAGTACATTTCTAGCTACTCAAATAGGGGAAGCCCTGTCAITTTTCTACCAGCAGACCCCTATCAGACAGTCAITTTACTTGAAGAAGCTCTGAAAGTTTCACC
TGTTCTGGACAGATGCCAGAGACTGAGACACCATCAGTATCCTCTAGTATTACTCATATAGAGAGAAGCCATTGCTCTTACCAACAGGCCCTGCCAGACAG
TGAGCTAACTCAAGAAGCTTCAAAGTTTCAGCTGTTCTCAACAGCTGACCAGAAGACTGGGTTATCTACTGTAACCTCCTCTTTCTATTCACATACAGAGAAGCC
TAATATTCTTACAGCAAGAGTTGCCAGATAGTCATCTAACTGAAGAGGCTCTGAAAGTTTCAAATGTTCTGGACCAGCTGACCAGAAGACTGGGGTATCAAAGT
AACCTTACTTCTACTCACACAGAGAGAAGCCATTGTTTCTACCAGCAGGAGTTGCCGCACTTTACTGAAGCAGGTTGAAATTTTAAAGAGTTCTGGACCAGC
TGACCAGAAGACTGGAAATAACATCCTGCCTCTAATCTCACTCACAGAGAGACTCTGTCAITTTCTATGAGCAGGAGTTGCCAGATCTTACTGAAGTAACTTTT
GAAAGCAATAGGGGTTCCCTGGA

**Primer: 8.4L + 8.5R: 1024 bp. Sequenzierung mit Rückwärts-Primer.**

ACACGTTCTTAGCTTGATAAATGAAATATCCGAAAACCTCTGAAAGGGCAAGGGGAGCGGAAAATGTCATCGTTTCAGTGCCATATTTTCTGCCTCCATCAAAGT
GTCCGAATTTCTTAAAGAGTTTAGCACTATTTCTGTCATCCTGGATTTCTCAGAGCCAACATCTCTAAAACCTGCAGATTTCTGGTTATTTTATTACAACCTCTGTCA
TCAGCTGGAGAAATTTAAAAGCACATTTTAGGCTAACACTGGAGTCAAGAAATTTCAAATATATCTATAGCCCTTTGGACATGTTCTGAAACAAGCTTGTGATTCTCA
CCATGTGAGTAAGTACCAGAGGGAAGCTGTTGTAATCCGGTAAATTTGATCAGCTTGCACAAGAGCATTGAGATCTTTAGAGCATCTTCAGTTAGATGTCTATCTGGC
AAATCTTTTGTATAGAAAATATCTGGTTCCTCGATGTGAAAAGGAAGTAGGAAGAGCTGTTGGTAATACTGTTTTCTGGCCAGCTGGTCCAGGAATTTGTGAAACC
TTCAGCACATCTTCAGTTACATGACTACCCTGGCAATTCCTGTGGACTGAAAATTTTCAGATTTCTCTCTGTGAAAATAAGAACTAGAGAGAGATACTGGTTTCCAGTA
TTCACATCAGTTAGTTTCAGGACAGCTGAAATCTTTAGAATACCTTTACTTTGATCTCTATCTGGCAACTGCTGTTGAAATAAAAATATGGGGCTTTACTGTTTGAGAA
TAGGAACATGAAAAGCTGCTGGGATGGAGTCTCTGTCATTTGGTCCAATCAGACTGAAAATCTTGGGCTTCTCTATTTGTGAGTAGGAACAAAGGGTAGCTGCT
GGAACTCAGTTTCTGGTCACTGGTATATGACAGTTGAAATCTTGAGTTTCTCTTTATGTGAATGTGAGTAGGAACCTAGACAGTCTTATGGTATCCAGCTCTTC
TGCTTCTGCTGGGTTTAGAAAACAGGTGAAACTTTCAGGAGCCTCTTCTTGTG

**Primer: 8L + 9R: 376 bp. Sequenzierung mit Vorwärts-Primer.**

GTCCTAGAGTCTTGGAACTGTTTCTGATGTTCTTCAAACCTCTTTCCATATGTTTACCCCAAGACATTATAACAGATATCAGGGATGATGATGGTGTGTCAGATAGT
GATGATGGTGGTGGTAGCAGTGTAGATTCAGTGGCTGCACATGTGAAATACCTTCTGCAATGTGAATCCTCACTGAATCATGCTAAAGAAATACTCAGAATCAGAG
GAAGAGAAAGCCGGTACGACACATGCCTGAAATTAAGGTTCAAATTTAGACATGATTTGGATCTCCATTTCAAGATTAATGAAGATGACAGGAGGAAAGTA
GAAGAGATCAAGCCAGAGTTATTTGGTCATGGAAGAACACTATTTGTCAG

**Primer: 8.5L + 9R: 817 bp. Sequenzierung mit Rückwärts-Primer.**

ACTTCCCCGCCCCCTCCCTCGGCCCCGACCTCCCTACCCCCATCTGCTTATTTAACTCCTGAAATGGAGATCCGAAAGAGGTATCATTATATTCAGGCTGTGCT
CGACCCGGCTTCTCTCTGCAATTCGAGGATTTCTTTACCATGATTCAGTGAGGATTCACATTCGAGAAGTTTTTTCACATGTGACAGCCAGTGAATCTACAC
TGCTACCACCACCATCTCCTCTGACACACCCCTTCTCTCCCTGCTATCTGTTATACTTGTCTTGGGTGAAACATATGGAAAGAGTTTAGAAGAACATCAGAAA
CTGAGGAAAGACTCTGGTAAATTAAGTACCTGTCACAGCAGGAAACCTTTCCATCCTGCACTACTTGAATCACTTTTATGACAGTCACTATAGGGATAAATAA
TTTTATCCCAATGGTTCCACTACACCCCTCAGGTTCCAGACTTACAGATTTGGCTGCTTATGATGCTTAAGAGTTTCTTCTAATGCCATACTGACTTTGCTCTC
TCTTCTCTGAGAGGACTTTCAACTGTAGTTGAACATAAACTCCCAATTTCAAATGCTCTCCGGCATTCAAATTCGCTGTGTGCCAATATCTCTGTATGCA
CCTGCTCTGGGCTTCTCTCTGTGAATGGCTGGCTGTGAAGCAAACTCCCAATTAGATACACCCCTGGAAGAGGGTCTTTGAAGCAAAACCCCTTTTATGATTGTTT
AATGAAATATCACTTATATCTGAAACGGCAAGGCAGCAGGAAAATGATCCGTTTT

**Primer: 8.6A\_L + 8.6A\_R: 460 bp. Sequenzierung mit Vorwärts-Primer.**

AGTGATTTCTTTATCAATCTAAGAGGTGGTTTGGCTTAAAGAACCCCTCTCCACGGGTGATCTAATGGTGAITTTGCTTACAGACAGCCATTACAGAGGAAAGCC
CAAGCAGCAGGTGCAATACAGAAGGATATTGGCACACAGACGAATTTGAAATGCCGAGAGGCCATTGAAAATTTGGAGTTTATTAGTTCAACTACAGTTAGAAGTCTC
TACAGGAAGCAGAGCAAAAGTCAAGTATGGCATTAGAAGAAACTCTTAGGCAATATCAAGCAGCCAAATCTGTAATGAGGTCTGAACCTGAAGGGTGTAGTGGAAACA
TTGGGAATAAAAATTAATATCCCTATGATGACTGTCAATAAAAGTATTCAAGTAGTGTGCCAGTGTGAAAATGGTTCTGCTCTGTTGGGACAGTAATTTACCAGAGT
CTTTGGAATCAGTTTCTGATGTTCTTCA

**Primer: 8.6A\_L + 9R: 460 bp. Sequenzierung mit Vorwärts-Primer.**

AGTGATTTCTTTATCAATCTAAGAGGTGGTTTGGCTTAAAGAACCCCTCTCCACGGGTGATCTAATGGTGAITTTGCTTACAGACAGCCATTACAGAGGAAAGCC
CAAGCAGCAGGTGCAATACAGAAGGATATTGGCACACAGACGAATTTGAAATGCCGAGAGGCCATTGAAAATTTGGAGTTTATTAGTTCAACTACAGTTAGAAGTCTC
TACAGGAAGCAGAGCAAAAGTCAAGTATGGCATTAGAAGAAACTCTTAGGCAATATCAAGCAGCCAAATCTGTAATGAGGTCTGAACCTGAAGGGTGTAGTGGAAACA
TTGGGAATAAAAATTAATATCCCTATGATGACTGTCAATAAAAGTATTCAAGTAGTGTGCCAGTGTGAAAATGGTTCTGCTCTGTTGGGACAGTAATTTACCAGAGT
CTTTGGAATCAGTTTCTGATGTTCTTCA

**Primer: 9L + 10R: 1140 bp. Sequenzierung mit dem Vorwärts-Primer. Gelb markiert ist der SNP rs2056486.**

CAGACCCCTTTAGATAAATGAAGAGACAGGAGGAAAGAGAGATCAAGGAGGTTATTTGGTTCATGGAAGAACAACCTGACTTGTCCAAGGGTTTACAGAGTCCACGGG
GAAATGGAGATCAAGCCAGAAAGCTGTATGTAGTCACATTAATTTAGAGCCATGAAAAGGGATGTTTCCGACTCTAACTTCTGAACATCCACAACATAGATAGACACC
CTTGTGCTTTCAGATCTGCTGGACCCCTCAGAAATGACCAGAGGACGGCAGAACCCATCATATGACAGCAAGCATGTCAACCTTCTGCTCCTTAGACCAAGAA
ACTCCCATTCAAAGTTTGGAAATCCTTGCAGTTAAAAGTCACTTCCCATTTCAGAAGTTTATACCTGATGAATCAAATCAGCAAAAGGCTTCCGAATGCCATTCG
ATGAAAAGACTGGACCCCTGGCTGTCAGAAATAGTAGAACCTGCTTTTGGCCACTTAAAGAAAGTGGATTTTCATTTCTCATCAAATCCAGCAAAACCCATGGA
AAAAGTTACTACTCCATCACTTTTTTCATCTCACGCACTTCAAATTCCTCTGTGTTAAGGTTGGTGTACTGAAAGTAGCCAGTGTACTGGAG



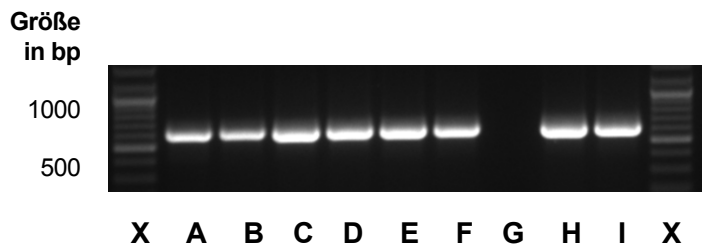




Primer: Up\_L + Up\_R: 172 bp. Sequenzierung mit Vorwärts-Primer.

TTATGACTGAGAATTAATGTTGATGAAAAACCTGTTATAAATTACTTCGTGTTTGTCTGTTTAAATGATTTTTTTTTTAGTATAGGGTGTTCCTCTGTTTTTCTTCTTTTCATGACTGACATTTTTGAAAAGTACAACCTAGTTACTTTGCAAATTTCCCTCAATTGA

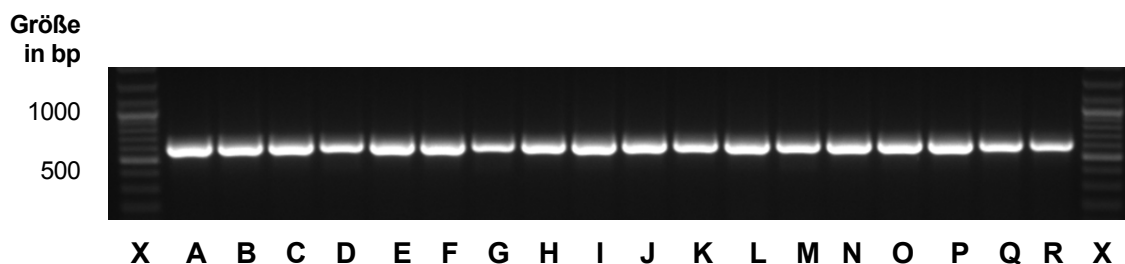
Primer-Kombination: *ACTB* (sense und antisense Primer)



**Abbildung 40: PCR-Produkte der Positivkontrolle mit für *ACTB* spezifischen Primern unter Verwendung von cDNA aus verschiedenen Geweben.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung der sense antisense Primer *ACTB* und cDNA aus verschiedenen Geweben im Vergleich. Die Produktgröße beträgt für alle gezeigten PCR-Produkte 613 bp.

X = DNA-Größenmaßstab (GeneRuler™ 100 bp Plus)	A = Gehirn	D = Milz	G = H <sub>2</sub> O
	B = Plazenta#	E = Schilddrüse	H = SIMA
	C = Lymphknoten	F = Thymus	I = SHSYSY



**Abbildung 41: PCR-Produkte der Positivkontrolle mit für *ACTB* spezifischen Primern unter Verwendung von cDNA aus verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien, PBMC und anderen Geweben.**

Dargestellt ist ein repräsentatives Ergebnis einer PCR unter Verwendung der sense antisense Primer *ACTB* und cDNA aus verschiedenen Hodgkin-Lymphom-Zelllinien mit anderen Zellen und Geweben im Vergleich. Die Produktgröße beträgt für alle gezeigten PCR-Produkte 613 bp.

X = DNA-Größenmaßstab (GeneRuler™ 100 bp Plus)	D = KM-H2	I = JURKAT	N = SK-N-MC
A = L-1236	E = HDLM-2	J = HL60	O = A673
B = L-428	F = Buffy Coat	K = A1	P = Raji
C = L-540	G = Buffy Coat	L = NM2	Q = Hoden
	H = K562	M = LCI74	R = Pankreas

# Lebenslauf

## Persönliche Angaben

Geburtsdatum: 10. Mai 1989  
Geburtsort: Halle (Saale)  
Staatsangehörigkeit: Deutsch

## Beruflicher Werdegang

08/2015 bis 10/2015 **MVZ für Entwicklungsförderung von Kindern und Jugendlichen GmbH, Berlin**  
Ärztin in Weiterbildung, Kinder- und Jugendpsychiatrie  
seit 03/2016 **Charité Universitätsmedizin, Klinik für Pädiatrie m.S. Endokrinologie und Diabetologie, Berlin**  
Ärztin in Weiterbildung, Flüchtlingshilfe

## Schulische Ausbildung

bis 07/2007 **St.-Benno-Gymnasium, Dresden**  
Allgemeine Hochschulreife, bestanden am 01.07.2007

## Hochschulstudium

10/2007 bis 12/2014 **Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg**  
Studium der Humanmedizin, bestanden am 04.12.2014  
08/2011 bis 07/2012 **Universität Autònoma de Barcelona (Spanien)**  
Erasmus-Auslandsstudium

## Famulaturen

02/2010 bis 03/2010 **Praxis Dr. med. Birgit Maack, Halbe**  
Allgemeinmedizin  
08/2010 bis 09/2010 **Universitätsspital Zürich (Schweiz)**  
Gynäkologie/Geburtshilfe  
02/2011 bis 04/2011 **Chris Hani Baragwanath Hospital, Johannesburg (Südafrika)**  
Pädiatrie  
03/2012 **Hospital de la Santa Creu i Sant Pau, Barcelona (Spanien)**  
Dermatologie

## Praktisches Jahr

08/2013 bis 12/2013 **Mater Dei Hospital, Msida (Malta)**  
Herz-Thorax Chirurgie/Plastische Chirurgie  
12/2013 bis 03/2014 **Universitätsklinikum Halle (Saale)**  
Hämatologie/Onkologie  
03/2014 bis 05/2014 **Great Ormond Street Hospital, London (Ver. Königreich)**  
Pädiatrische Endokrinologie  
05/2014 bis 07/2014 **Universitätsklinikum Halle (Saale)**  
Pädiatrie

## Nebentätigkeiten

10/2009 bis 03/2010	<b>Institut für Physiologische Chemie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg</b> Tutorin für ausländische Studierende
04/2010 bis 07/2010	<b>Institut für Anatomie und Zellbiologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg</b> Tutorin für ausländische Studierende
10/2010 bis 07/2011	<b>Institut für Humangenetik und Medizinische Biologie, Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg</b> Wissenschaftliche Hilfskraft
08/2012 bis 07/2013	<b>MDR Sputnik, Halle (Saale)</b> Sendeassistentin
01/2016 bis 02/2016	<b>Praxis Prof. Dr. med. Karl Paul-Buck</b> Pädiatrische Pulmologie und Allergologie

## Sprachkenntnisse

Deutsch:	Muttersprache
Englisch:	verhandlungssicher
Spanisch:	fließend
Französisch:	Grundkenntnisse
Katalanisch:	Grundkenntnisse

## Preise

2007	<b>Jugend forscht, 2. Platz</b> Untersuchungen zur krankheitsspezifischen Lebensqualität junger Typ-1-Diabetiker
------	---

## Ehrenamtl. Tätigkeiten

seit 2007	<b>DAWN Youth Panel, Novo Nordisk</b> Youth Ambassador
2007 bis 2014	<b>Diabetes-Zentrale e.V.</b> Gründungs- und Vorstandsmitglied
2008 bis 2011	<b>Fachschaftratsrat Medizin</b> Stellvertretende Vorsitzende
seit 2011	<b>International Diabetes Federation</b> Young Leader in Diabetes, Medical Faculty
seit 2012	<b>DiabetesDE</b> Ressort Wissenschaft
seit 2014	<b>DDH-M Deutsche Diabetes Hilfe</b> Vorstandsmitglied LVMD, Jugendreferentin

## **Selbstständigkeitserklärung**

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Regeln zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis wurden beachtet (Amtsblatt der MLU Nr. 5, 02.07.09).

Ich versichere, dass ich für die inhaltliche Erstellung der vorliegenden Arbeit nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- und Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen habe. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Berlin, den 14.04.2016

Katarina Braune

## **Erklärung über frühere Promotionsversuche**

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.

Berlin, den 14.04.2016

Katarina Braune

# Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich während meiner Studienzeit und der Anfertigung dieser Doktorarbeit unterstützt haben.

Ich bedanke mich bei Herrn **Prof. Dr. Martin Staege** für die Möglichkeit, diese Arbeit am Forschungszentrum für krebskranke Kinder der Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg durchführen zu dürfen. Vielen Dank für die Überlassung des interessanten Dissertationsthemas, die ausgezeichnete Betreuung und Unterstützung während der gesamten Entstehungszeit dieser Arbeit.

Ein weiterer Dank geht an die gesamte **Arbeitsgruppe** des Forschungszentrums für krebskranke Kinder, insbesondere **Ines Volkmer** und **Dr. Stefanie Kewitz**, für die freundliche Aufnahme, die fröhlichen Stunden im Labor und die stetige Hilfsbereitschaft bei Fragen und Problemen. Weiterhin danke ich **Dr. Dorothea Darmer** vom Zentrum für Medizinische Grundlagenforschung ganz herzlich für die Unterstützung beim Sequenzierservice.

Ich danke außerdem dem Rare Diseases Team des **Children's Hospital in Birmingham** und dem pädiatrisch-endokrinologischen Team des **Great Ormond Street Hospital in London** für die Möglichkeit, während meines praktischen Jahres sowohl Patienten mit Alström-Syndrom, als auch pädiatrische Patienten mit Hodgkin-Lymphom ärztlich mitzubetreuen und somit einen Einblick in die klinische Relevanz des Forschungsthemas zu erlangen. Ich danke den betroffenen Kindern und ihren Familien für ihre Tapferkeit und Offenheit und wünsche ihnen für die Zukunft herzlichst alles Gute.

Meiner **Familie** und meinen **Freunden** danke ich dafür, dass sie in guten wie in schlechten Zeiten an mich geglaubt und mich stets unterstützt haben. Ganz besonders danke ich **Doreen William** und **Dr. Jan Teuber** für ihre konstruktiven Ratschläge und das unermüdlich mit mir geteilte Fachwissen. Weiterhin möchte ich meiner lieben Großmutter **Dr. Rita Hermann** gedenken, die meine Begeisterung für die Medizin weckte und mir stets eine Inspiration war. Natürlich danke ich auch meinen KommilitonInnen aus Halle (Saale) und Barcelona, die mein Studium zu einer besonderen und lebenswerten Zeit gemacht haben.