

Aus dem Institut für Humangenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht über die Chirurgische Veterinärklinik – Kleintierchirurgie -  
der Justus-Liebig Universität Gießen

**Mutationen in den „fibroblast growth factor“  
(FGF) –Rezeptorgenen FGFR 1, 2 und 3  
bei primären Craniosynostosen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Yvonne Ehrenfels**

Gießen 2000

Aus dem Institut für Humangenetik der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. U. Müller

Eingereicht über die Chirurgische Veterinärklinik – Kleintierchirurgie -  
der Justus-Liebig Universität Gießen

im Fachbereich vertreten durch: Prof. Dr. E. Schimke

**Mutationen in den „fibroblast growth factor“  
(FGF) –Rezeptorgenen FGFR 1, 2 und 3  
bei primären Craniosynostosen**

Inaugural-Dissertation zur Erlangung des Doktorgrades  
beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von  
**Yvonne Ehrenfels**  
Tierärztin aus Sigmaringen

Gießen 2000

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. h.c. H. Bostedt

1. Berichterstatter: Prof. Dr. U. Müller
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Schimke

Tag der mündlichen Prüfung: 30.08.2000

Meinem Vater gewidmet

|                                                                                              | Seite |
|----------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| <b>1 Einleitung</b>                                                                          | 1     |
| <b>2 Literaturübersicht</b>                                                                  | 2     |
| 2.1 <i>Zytokine</i>                                                                          | 2     |
| 2.2 <i>Wachstumsfaktoren</i>                                                                 | 3     |
| 2.2.1 Die Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren ( „fibroblast growth factors“ = FGF's ) | 3     |
| 2.3 <i>Rezeptortyrosinkinasen</i>                                                            | 4     |
| 2.3.1 FGF-Rezeptoren ( „fibroblast growth factor receptors“ = FGFR's )                       | 5     |
| 2.3.1.1 Aufbau der FGF-Rezeptoren                                                            | 6     |
| 2.4 <i>Signaltransduktion</i>                                                                | 7     |
| 2.5 <i>Skelettentwicklung</i>                                                                | 9     |
| 2.6 <i>Die FGF-Rezeptorgene</i>                                                              | 11    |
| 2.6.1 Physiologische Wachstumsregulation und Mutation                                        | 11    |
| 2.7 <i>Craniosynostosen-der Ablauf physiologischer Vorgänge zum falschen Zeitpunkt</i>       | 14    |
| 2.7.1 Apert-Syndrom                                                                          | 15    |
| 2.7.2 Crouzon-Syndrom                                                                        | 16    |
| 2.7.3 Pfeiffer-Syndrom                                                                       | 17    |
| 2.7.4 Jackson-Weiss-Syndrom                                                                  | 17    |
| 2.7.5 Beare-Stevenson-Syndrom                                                                | 18    |
| 2.7.6 Achondroplasie                                                                         | 18    |
| 2.7.7 Hypochondroplasie                                                                      | 19    |
| 2.7.8 Thanatophore Dysplasie                                                                 | 19    |
| 2.7.9 Saethre-Chotzen-Syndrom                                                                | 19    |
| 2.8 <i>Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit</i>                                          | 21    |
| <b>3 Material</b>                                                                            | 22    |
| 3.1 Geräte und Zubehör                                                                       | 22    |
| 3.2 Chemikalien                                                                              | 25    |
| 3.3 Enzyme                                                                                   | 27    |
| 3.4 Nukleotide und Radionukleotide                                                           | 27    |
| 3.5 Kits                                                                                     | 27    |
| 3.6 Lösungen und Puffer                                                                      | 28    |
| 3.7 Primertabelle                                                                            | 33    |
| <b>4 Methoden</b>                                                                            | 34    |
| 4.1 <i>DNA - Präparation aus Venenblut</i>                                                   | 34    |
| 4.1.1 Phenolextraktion                                                                       | 34    |
| 4.1.2 „ Mini Phenolextraktion“                                                               | 35    |
| 4.1.3 DNA Extraktion mit Kit                                                                 | 36    |
| 4.2 <i>Polymerasekettenreaktion (PCR)</i>                                                    | 37    |
| 4.2.1 Exon 7 von FGFR 2                                                                      | 40    |
| 4.2.2 Exon 9 von FGFR 2                                                                      | 41    |
| 4.2.3 Exon 5 von FGFR 1                                                                      | 41    |
| 4.2.4 Exon 7 von FGFR 3                                                                      | 42    |
| 4.2.5 Exon 9 von FGFR 3                                                                      | 43    |
| 4.2.6 Exon 10 von FGFR 3                                                                     | 43    |
| 4.2.7 Exon 1 von FGFR 2                                                                      | 44    |
| 4.2.8 Exon 2 von FGFR 2                                                                      | 44    |
| 4.2.9 Exon 8 von FGFR 2                                                                      | 44    |
| 4.2.10 „genestete PCR“                                                                       | 44    |
| 4.2.11 PCR mit radioaktiv markiertem Nukleotid-Mix ([ $\alpha$ - <sup>32</sup> -P] dCTP      | 45    |
| 4.2.12 Auswahl geeigneter Startersequenzen (Primer) zur Durchführung der PCR                 | 45    |
| 4.3 <i>Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren</i>                               | 46    |
| 4.3.1 Agarose-Gelelektrophorese                                                              | 46    |
| 4.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)                                                 | 48    |
| 4.3.3 Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP)                            | 51    |

|          |                                                                                                                                                           |     |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 4.3.4    | Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)                                                                                                       | 53  |
| 4.3.4.1  | Exon 1 von FGFR 2                                                                                                                                         | 60  |
| 4.3.4.2  | Exon 7 von FGFR 2                                                                                                                                         | 61  |
| 4.3.4.3  | Exon 9 von FGFR 2                                                                                                                                         | 61  |
| 4.3.4.4  | Exon 7 von FGFR 3                                                                                                                                         | 61  |
| 4.4      | <b>Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen</b>                                                                                               | 62  |
| 4.4.1    | Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen über Qiagen-Säulen                                                                                       | 62  |
| 4.4.2    | Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen über Macherey-Nagel-Säulen                                                                               | 63  |
| 4.5      | <b>Radioaktive Endmarkierung von Nukleinsäuren</b>                                                                                                        | 63  |
| 4.6      | <b>DNA-Sequenzierung</b>                                                                                                                                  | 64  |
| 4.6.1    | Zyklische Sequenzierung mit radioaktiv markierten Primern                                                                                                 | 65  |
| 4.6.2    | Zyklische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern                                                                                                 | 67  |
| 4.6.3    | Auswertung der Sequenzen                                                                                                                                  | 68  |
| 4.7      | <b>Autoradiographie</b>                                                                                                                                   | 70  |
| 4.8      | <b>Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen</b>                                                                                                       | 70  |
| <b>5</b> | <b>Ergebnisse</b>                                                                                                                                         | 73  |
| 5.1      | <b>Mutationsanalysen in verschiedenen Bereichen der FGF-Rezeptorgene</b>                                                                                  | 73  |
| 5.2      | <b>Mutationen in der Ig-IIIa Domäne von FGFR 2</b>                                                                                                        | 74  |
| 5.2.1    | Exon 7 von FGFR 2                                                                                                                                         | 74  |
| 5.3      | <b>Mutationen in der Ig IIIc-Domäne (BEK) von FGFR 2</b>                                                                                                  | 77  |
| 5.3.1    | Exon 9 von FGFR 2                                                                                                                                         | 77  |
| 5.4      | <b>Zusammenfassung der nachgewiesenen Mutationen in der Ig III-Domäne von FGFR 2</b>                                                                      | 79  |
| 5.5      | <b>Mutationen in FGFR 1</b>                                                                                                                               | 80  |
| 5.5.1    | Exon 5 von FGFR 1                                                                                                                                         | 80  |
| 5.6      | <b>Mutationen in FGFR 3</b>                                                                                                                               | 81  |
| 5.6.1    | Exon 7 von FGFR 3                                                                                                                                         | 81  |
| 5.6.2    | Exon 9 von FGFR 3                                                                                                                                         | 84  |
| 5.6.3    | Exon 10 von FGFR 3                                                                                                                                        | 84  |
| 5.6.3.1  | Die Mutation <b>Phe 384 Leu</b> : Ein Polymorphismus?                                                                                                     | 85  |
| 5.7      | <b>Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) –Eine neue Methode bei der Suche nach weiteren Mutationen in den FGF Rezeptorgen1, 2 und 3</b> | 87  |
| 5.7.1    | Erste Schritte                                                                                                                                            | 87  |
| 5.7.2    | Untersuchung weiterer Fragmente                                                                                                                           | 89  |
| 5.7.3    | Untersuchung von Exon 7 von FGFR 2 mit Hilfe der DGGE                                                                                                     | 91  |
| 5.7.4    | Untersuchung von Exon 7 von FGFR 3 mit Hilfe der DGGE                                                                                                     | 92  |
| 5.7.5    | Kritische Punkte bei der Durchführung der DGGE                                                                                                            | 93  |
| 5.8      | <b>Die Untersuchung neuer Bereiche der FGF-Rezeptorgene mit SSCP-Analyse und DGGE</b>                                                                     | 94  |
| 5.8.1    | Die Ig I-Domäne von FGFR 2                                                                                                                                | 94  |
| 5.8.1.1  | Exon 1 von FGFR 2                                                                                                                                         | 94  |
| 5.8.1.2  | Exon 2 von FGFR 2                                                                                                                                         | 95  |
| 5.9      | <b>Suche nach Mutationen in der Ig IIIb-Isoform von FGFR 2</b>                                                                                            | 96  |
| 5.10     | <b>Tabellarischer Überblick über die Häufigkeit einzelner Mutationen in der vorliegenden Arbeit</b>                                                       | 97  |
| <b>6</b> | <b>Diskussion</b>                                                                                                                                         | 98  |
| 6.1      | <b>Mutationen in den FGF-Rezeptorgen sind „gain of function“ Mutationen</b>                                                                               | 98  |
| 6.2      | <b>Die Mutationen im Einzelnen</b>                                                                                                                        | 100 |
| 6.2.1    | Exon 7 von FGFR 2                                                                                                                                         | 100 |
| 6.2.2    | Exon 9 von FGFR 2                                                                                                                                         | 103 |
| 6.2.3    | Exon 1 von FGFR 2                                                                                                                                         | 105 |
| 6.2.4    | Exon 8 von FGFR 2                                                                                                                                         | 106 |
| 6.2.5    | Exon 5 von FGFR 1                                                                                                                                         | 106 |
| 6.2.6    | Exon 7 von FGFR 3                                                                                                                                         | 107 |
| 6.2.7    | Exon 9 von FGFR 3                                                                                                                                         | 108 |
| 6.2.8    | Exon 10 von FGFR 3                                                                                                                                        | 109 |
| 6.3      | <b>Phänotypische Variabilität bei Craniosynostosen</b>                                                                                                    | 112 |
| 6.4      | <b>Die DGGE-eine geeignete Methode zur Mutationsanalyse bei FGF-Rezeptor assoziierten Craniosynostosen</b>                                                | 113 |

|      |                                                                               |     |
|------|-------------------------------------------------------------------------------|-----|
| 6.5  | <i>Craniosynostosen beim Tier</i>                                             | 115 |
| 6.6  | <i>Die Bedeutung genetisch bedingter Erkrankungen in der Veterinärmedizin</i> | 116 |
| 7    | <b>Zusammenfassung</b>                                                        | 118 |
| 8    | <b>Summary</b>                                                                | 119 |
| 9    | <b>Literaturverzeichnis</b>                                                   | 120 |
| 10   | <b>Anhang</b>                                                                 | 131 |
| 10.1 | Abkürzungen                                                                   | 131 |
| 10.2 | Danksagung                                                                    | 133 |

## **1 Einleitung**

Alle lebenden Organismen bestehen aus einer oder mehreren Zellen. Diese reagieren auf Informationen von außen oder tauschen Informationen untereinander aus. Das Empfangen bzw. der Austausch von Informationen ist damit die Grundlage eines jeden lebenden Systems. Damit Signale von außen ins Innere der Zelle gelangen können, muß zunächst die Zellmembran als äußere Begrenzung der Zelle überwunden werden. Der Transport durch die Zellmembran kann durch Diffusion, gerichteten Transport oder untereinander vernetzte Reaktionskaskaden ablaufen. Auf der Zelloberfläche befinden sich in die Membran integrierte Rezeptoren. Sie sind im Ruhezustand inaktiv und können durch Reize von außen aktiviert werden. Die Aktivierung erfolgt durch die Bindung eines Liganden nach dem „Schlüssel-Schloß-Prinzip“, das heißt, bestimmte Liganden binden an bestimmte Rezeptoren. Die Bindung des Liganden initiiert so den Beginn des Informationsflusses. Der aktivierte Rezeptor veranlasst die Regulation bestimmter Proteine im Zytoplasma, die das Signal dann bis hin zum Zellkern weiterleiten. Diese Weiterleitung geschieht durch die untereinander vernetzten Signaltransduktionskaskaden. Sie sind wesentlich bei der Vermittlung von Information vom Äußeren ins Innere der Zelle. Im Zellkern reagiert die Zelle mit Hilfe von spezifischer Genregulation auf die angekommene verarbeitete Information. Die Funktionen der Gesamtlebewesen werden so über den Informationsfluß in jeder einzelnen Zelle und zwischen den Zellen

## 2. Literaturübersicht

### 2.1 Zytokine

Zytokine sind regulatorische Proteine, die Überleben, Wachstum und Differenzierung von Gewebezellen kontrollieren. Zu den Zytokinen zählen **Wachstumsfaktoren**, koloniestimulierende Faktoren, Lymphokine, Monokine, Interleukine und Interferone. Alle Zytokine besitzen bestimmte gemeinsame Eigenschaften. Sie werden in geringen Konzentrationen von Zellen produziert, die als biologische Sensoren für die körperliche Verfassung von Mensch und Tier agieren. Die Produktionszellen überwachen unter anderem den Sauerstoffgehalt des Gewebes, Immunreaktionen des Körpers und die Anzahl der weißen und roten Blutkörperchen. Zytokine werden von den produzierenden Zellen jedoch nicht nur als Reaktion auf Messungen von Körperfunktionen ausgeschüttet, sondern auch in bestimmtem Maße zur ständigen Erneuerung und zum Überleben von Zellen. Sie dienen als Vermittler der Signaltransduktion, indem sie an spezifische Rezeptoren auf der Zelloberfläche binden und diese aktivieren. Die verantwortlichen Zellen bewirken daraufhin die entsprechende biologische Antwort, nach deren Erfolgen die Zytokine durch Proteasen zerstört werden (Nicola et al., 1994). Ein klassisches Merkmal der Zytokine ist, dass sie nicht wie andere Botenstoffe, z.B. Hormone, mit dem Blutstrom zum Wirkungsort transportiert werden, sondern in der Regel direkt auf die dem Sekretionsort benachbarten Zellen wirken. Sie sind außerdem durch ihre vielfältige Wirkung gekennzeichnet. Es gibt biologische Antworten, die nur durch ein bestimmtes Zytokin hervorgerufen werden und andere, welche als Reaktion auf verschiedene Zytokine erfolgen. Dabei können Funktionen einzelner Zytokine überlappen. Die Wirkung der Zytokine auf die Zelle ist abhängig von deren Identität (Rickwood et al., 1993).

## 2.2 Wachstumsfaktoren

Die Wachstumsfaktoren gehören zur Gruppe der Zytokine. In den 60er Jahren konnten erstmals Wachstumsfaktoren charakterisiert werden. Sie wurden ursprünglich durch ihre Fähigkeit, die Teilung von kultivierten Zellen anzuregen, entdeckt. Zur Familie der Wachstumsfaktoren gehören folgende Subfamilien:

- PDGF = *platelet-derived growth factors*
- EGF = *epidermal growth factors*
- IGF = *insulin-like growth factors*
- TGF = *transforming growth factors*
- FGF = *fibroblast growth factors*

### 2.2.1 Die Familie der Fibroblasten Wachstumsfaktoren („fibroblast growth factors“ = FGF's)

Wie der Name sagt, wurden die FGF's durch ihre Fähigkeit die Fibroblastenproliferation anzuregen *in vitro* entdeckt. Ihre mitogene Aktivität wurde vor 25 Jahren zunächst in Hypophysenpräparaten von Rindern nachgewiesen (Armelin, 1973), bis sie schließlich in reiner Form aus Rindergehirnen gewonnen werden konnten. Dabei wurden zunächst zwei nahe verwandte Proteine isoliert, saures aFGF („acidic“) oder FGF 1 und basisches bFGF („basic“) oder FGF 2 (Johnson et al., 1993; Nicola 1994; Rickwood 1993; Martin, 1998). Saures FGF kommt überwiegend in Zellen des zentralen und peripheren Nervensystems vor, während basisches FGF in nahezu allen Geweben des Körpers zu finden ist (Rickwood, 1993). Die Klonierung der c-DNA für aFGF und bFGF ergab 155 Aminosäuren, welche für je eines der beiden Proteine kodieren (Johnson et al., 1993). Bis heute sind 18 Gene bekannt, die für Fibroblasten Wachstumsfaktoren kodieren (Plotnikov et al., 1999). Die Proteine, welche von den 18 Genen kodiert werden, sind von unterschiedlicher Länge, besitzen aber eine übereinstimmende Kernregion, die ihnen eine bestimmte Tertiärstruktur verleiht und damit die Fähigkeit, Heparin oder Heparansulfatproteoglykane (HPSG) zu binden. Die Bindung der FGF's an Heparin bzw. an Heparansulfatproteoglykane erfolgt mit niedriger Affinität. An Heparin gebundene FGF's fungieren bei der Signaltransduktion als Liganden für

spezifische FGF-Rezeptoren mit hoher Affinität (Nicola et al., 1994; Rickwood et al., 1993; Plotnikov et al., 1999). Die FGF's erfahren durch Heparin eine Strukturveränderung, die die Bindung an die Rezeptoren ermöglicht. Sind FGF's an Heparin gebunden, sind sie immobilisiert, was beweist, dass sie, wie bereits erwähnt, nahe ihres Produktionsortes wirken. FGF's wirken mitogen auf Fibroblasten, Neuroektodermale Zellen, Kapillar- und Endothelzellen. Sie sind an Zellwachstum, Proliferation und Differenzierung beteiligt. Spezifische Mitglieder der FGF Familie sind interzelluläre Schlüsselmoleküle während der Embryogenese (Naski et al., 1998; Martin, 1998). Sie spielen außerdem eine entscheidende Rolle bei der Gliedmaßenentwicklung und sind darüber hinaus durch ihre Wirkung auf Endothelzellen wesentlich an der normalen Entwicklung des Gefäßsystems beteiligt (Johnson et al., 1993). Daher ist es wichtig, die mögliche Beteiligung der FGF's an der Blutversorgung von Tumoren (Nicola, 1994), an der Wundheilung und an Gefäßerkrankungen zu betrachten (Johnson et al., 1993).

### **2.3 Rezeptortyrosinkinasen**

Die Rezeptortyrosinkinasen stellen eine der beiden Hauptgruppen der Tyrosinkinasen dar und zeichnen sich als solche durch ihre Spezifität für Tyrosinreste als Substrat aus. Charakteristisch ist ihr Aufbau, bestehend aus einer extrazellulären Domäne, einer transmembranen Domäne und einer intrazellulären Tyrosinkinasedomäne. Sie überspannen die Zellmembran, bis auf den Insulinrezeptor, im inaktiven Zustand als Monomere. Durch ligandeninduzierte Dimerisierung werden zwei der inaktiven Monomere aktiviert. Sie sind dann in der Lage, sich gegenseitig zu phosphorylieren und die Phosphorylierung weiterer zytoplasmatischer Proteine anzuregen, welche für die Weiterleitung des Informationsflusses wichtig sind (Schlessinger, 1988). Zur Kanalisierung extrazellulärer Signale ins Zellinnere sind bislang 50 dieser Rezeptoren bekannt (Schlessinger, 1994). Sie lassen sich in vier Klassen unterteilen. Klasse I-Rezeptoren besitzen 2 Cysteinreiche Sequenzen im extrazellulären Teil. Beispielhaft für diese Klasse ist der „Epidermal Growth Factor Receptor (EGF-Rezeptor)“. Klasse II-Rezeptoren stellen die einzige Rezeptorklasse dar, welche immer als Dimer vorliegt. Sie bestehen aus je zwei  $\alpha$ - und zwei  $\beta$ -Untereinheiten, welche über extrazelluläre Disulfidbrücken zusammengehalten werden. Als Beispiel für diese Rezeptorklasse dient der Insulin-Rezeptor (siehe Abbildung 2.3.1). Charakteristisch für Rezeptoren der Klassen III und IV sind immunglobulinähnliche, extrazelluläre Domänen,

deren Struktur durch Disulfidbrücken zwischen Cysteinresten spezifischer Abfolge gewährleistet wird (Williams und Barclay, 1988). Klasse III-Rezeptoren besitzen fünf, Klasse IV-Rezeptoren drei dieser immunglobulinähnlichen Domänen. Beide Rezeptorklassen kennzeichnet außerdem ein sogenanntes „Kinase-Insert“, welches die Tyrosinkinasedomäne in zwei Teile unterteilt. Beispielhaft für Klasse III-Rezeptoren ist der „Platelet Derived Growth Factor Receptor (PDGF-Rezeptor)“, für Klasse IV-Rezeptoren der „Fibroblast Growth Factor Receptor (FGF-Rezeptor)“. Abbildung 2.3.1 zeigt den Aufbau der einzelnen Rezeptorklassen schematisch.

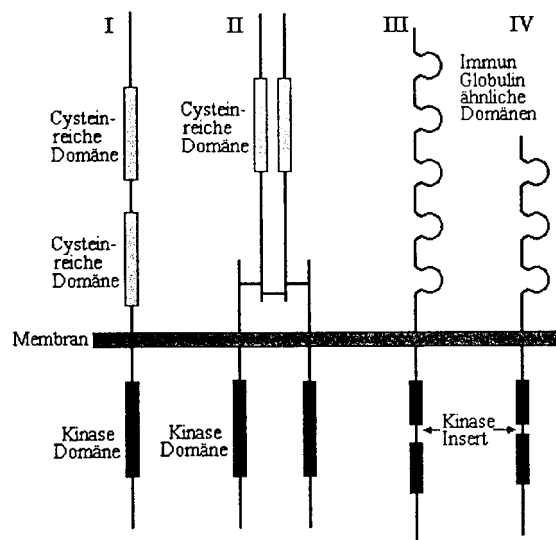


Abb. 2.3.1: Einteilung der Rezeptortyrosinkinasen (Ullrich und Schlessinger, 1990)

### 2.3.1 FGF-Rezeptoren („fibroblast growth factor receptors“ = FGFR's)

FGF-Rezeptoren dienen der Bindung von FGF und damit der Weiterleitung von Informationen ins Zellinnere.

Sie gehören zur Klasse IV der Familie der Rezeptortyrosinkinasen. Bislang sind 4 verschiedene FGF-Rezeptoren bekannt, die sich in ihrer Aminosäurestruktur streckenweise sehr ähnlich sind. Sie sind Rezeptoren mit hoher Affinität. FGF-Rezeptoren werden in zahlreichen Geweben exprimiert, wobei mehrere Rezeptoren im selben Gewebe vorkommen können. So befinden sich FGFR 1-Transkripte beispielsweise in Neuronen, Knochen, Niere, Haut, Lunge, Herz und Muskulatur, FGFR 2-Transkripte in den Glia-Zellen des Gehirns, Niere, Haut, Lunge und Leber, jedoch nicht in Herz, Muskulatur und Milz und FGFR 3-Transkripte in Gehirn, Niere, Haut, Lunge und Knorpelrudimenten, während FGFR 4 in Lunge, Leber und Niere exprimiert ist (Nicola, 1994).

### 2.3.1.1 Aufbau der FGF-Rezeptoren

Die FGF-Rezeptoren beginnen extrazellulär mit einem N-terminalen Signalpeptid. Der extrazelluläre Bereich beinhaltet weiterhin eine charakteristische Abfolge der Aminosäure Cystein. Diese Cysteine sind über Disulfidbrücken stabilisiert, was die Gestalt der 3 aufeinanderfolgenden sogenannten Immunglobulin-ähnlichen Domänen (Ig I-III) ausmacht. Jede der Ig-Domänen wird nämlich durch eine solche Disulfidbrücke stabilisiert. Zwischen Ig I und Ig II befindet sich die sogenannte „acid box“, eine Häufung der sauren Aminosäuren Asparaginsäure und Glutaminsäure, darüberhinaus liegen dort die drei Aminosäuren: Histidin, Alanin und Valin (HAV). Diese sogenannte HAV-Struktur wurde schon in den Zelladhäsionsmolekülen N-cam, L-cam und N-cadherin gefunden. Es wird vermutet, dass HAV eine Rolle bei der Bindung zwischen Molekülen spielt (Burke et al., 1998; Plotnikov et al., 1999). Den 3 Ig-Domänen folgt die aus hydrophoben Aminosäuren bestehende transmembrane Domäne (TM). Es schließt sich der zytoplasmatische Bereich an, bestehend aus der juxtamembranen Domäne, sowie der durch 14 Aminosäuren gespaltenen Tyrosinkinase Domäne (TK 1 und TK 2). Den abschließenden Teil stellt die carboxyterminale Region dar. Durch alternatives „splicing“ der m-RNA entstehen zusätzliche Formen der Rezeptoren. Dabei werden verschiedenste Rezeptorformen gebildet. So kann zum Beispiel die Ig I-Domäne mit oder ohne „acid box“ herausgeschnitten werden. Von der zweiten Hälfte der Ig III-Domäne sind 2 Isoformen bekannt, für die 2 verschiedene Exons kodieren. In FGFR 2 kodiert Ig IIIb für den Keratinocytenwachstumsfaktor („Keratinocyte Growth Factor Receptor = KGFR“) und bindet als Liganden FGF 1 und KGF („KGF = Keratinocyte Growth Factor“). Ig IIIc („bek = bacterial expressed kinase“) definiert den FGF-Rezeptor 2 und bindet FGF 1 und 2 mit gleich hoher Affinität, jedoch nicht KGF (Keratinocyte Growth Factor = FGF 7). Essenziell für die Bindung eines Liganden sind die Ig-Domänen II und III, während Ig I für die Bindung nicht erforderlich ist (Plotnikov et al., 1999).

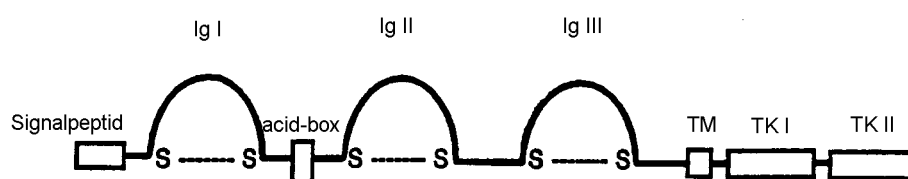


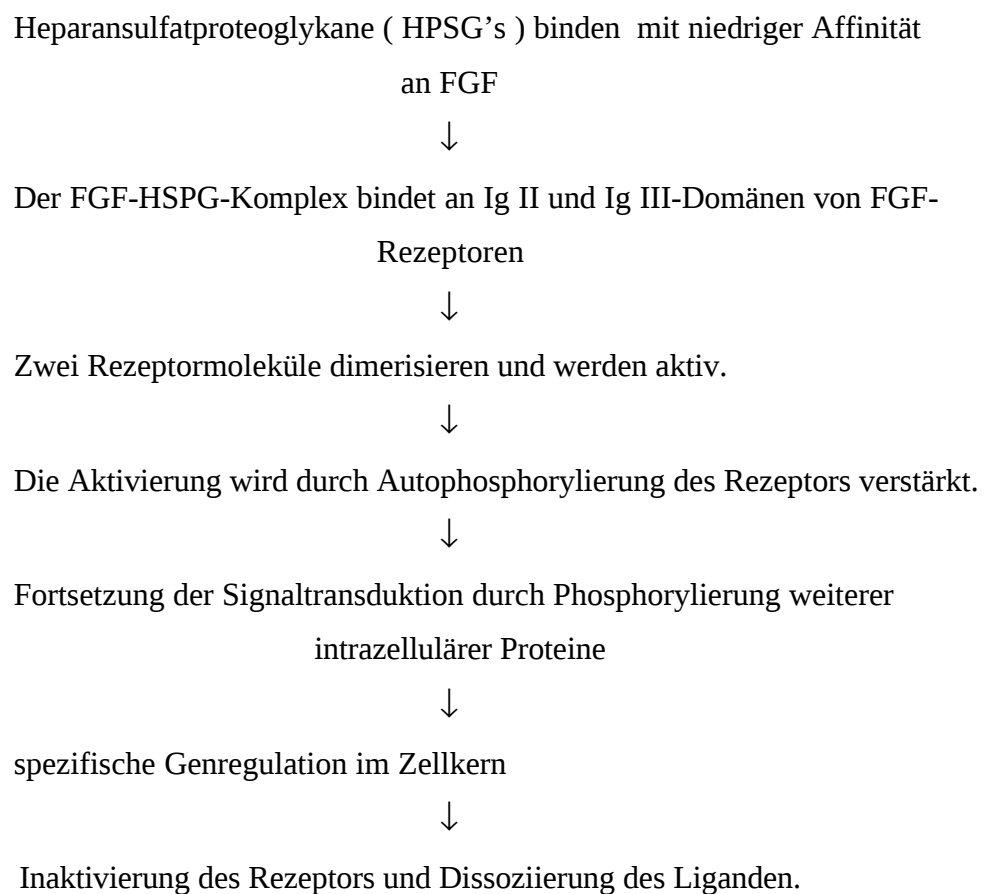
Abb. 2.3.1.1.1: Aufbau der FGF-Rezeptoren (modifiziert aus Johnson und Williams, 1993)

## **2.4 Signaltransduktion**

Das Zusammenspiel von FGF (Ligand), Rezeptor und Heparansulfatproteoglykanen (HPSG) ist verantwortlich für die Aktivierung und beginnende Signalübertragung. Die Ligand-Rezeptor-Bindung wurde von Plotnikov et al. (1999) am Beispiel von FGF 2-FGFR 2 dargestellt. Bestimmte Aminosäuren bilden im Liganden selbst und zwischen Ligand und Rezeptor Wasserstoffbrücken aus. Diese sorgen im Liganden für eine stabile Form und gewährleisten gleichzeitig die Bindung an den Rezeptor. Ist der Rezeptor durch Mutationen verändert, können diese Wasserstoffbrücken nur teilweise entstehen, so dass die Bindung reduziert ist. Desweiteren entstehen zwischen Ligand und Rezeptor hydrophobe Wechselwirkungen, und zwar hauptsächlich zwischen der Ig II-Domäne und dem Liganden. Die Bindung FGF-Ig III wird ebenfalls durch hydrophobe Wechselwirkungen, aber zusätzlich durch polare Bindung stabilisiert. Die hydrophobe Oberfläche auf dem Rezeptor wird von den Aminosäuren Alanin 167, Prolin 169 und Valin 248 geschaffen. In allen FGF-Rezeptoren herrscht in Bezug auf diese drei Aminosäuren große Übereinstimmung, so dass anzunehmen ist, dass diese eine Wechselwirkungsstelle für viele FGF's darstellen. Eine wichtige Rolle bei der Aktivierung des Rezeptors spielen Heparansulfatproteoglykane (HPSG). Sie bilden einen Komplex mit FGF, der die Bindung an den FGF-Rezeptor ermöglicht. Der FGF-Rezeptor 2 besitzt an der Innenseite der Ig II-Domäne positive Lysinreste, die den Heparinbindungsteil darstellen. In den übrigen 3 FGFR's können andere Aminosäurereste anstatt des Lysin an dieser Stelle an der Heparinbindung beteiligt sein. Die Sequenzunterschiede in den 4 FGFR's an dieser Stelle machen die unterschiedliche Spezifität in der Heparinbindung aus (Plotnikov et al., 1999). Wird Heparin vom Rezeptor an der spezifischen Heparinbindungsstelle ohne einen zusätzlichen Liganden gebunden, kann der Rezeptor ohne Ligand aktiviert werden. Um dies zu verhindern bindet die saure „acid box“ eines Rezeptors an die basische Heparinbindungsstelle und blockiert diese dadurch für Heparin. Diese Bindung wird als Autoinhibition bezeichnet (Plotnikov et al., 1999). Der Beweis für diesen Vorgang ist die höhere Bindungsaffinität zu Heparin bei Rezeptoren, denen durch alternatives „splicing“ die „acid box“ fehlt.

Nachdem der Ligand gebunden hat, dimerisieren 2 Rezeptormoleküle. Das Rezeptor-Rezeptor Dimer wird durch Aminosäurereste am Boden von Ig II stabil. Durch die Ähnlichkeit dieser

Reste in allen 4 FGF-Rezeptoren sind auch Heterodimere, z.B. zwischen FGFR 1 und 2 möglich (Webster et al., 1997). Die Bildung eines Dimers aktiviert den Rezeptor. Diese Aktivität wird durch Autophosphorylierung des Rezeptors an seinen Tyrosinresten weiter verstärkt (Johnson et al., 1993). Die Signaltransduktion wird durch die Phosphorylierung weiterer intrazellulärer Proteine, wie Phospholipase C $\gamma$ , Phosphoinositol 3-Kinase, und ras GAP fortgesetzt, indem diese Proteine mit dem phosphorylierten Rezeptor assoziieren (Rickwood, 1993). Durch Phosphorylierung der MAP-Kinasen wird das Signal vermutlich zum Zellkern gebracht. Durch Proteasen wird der Rezeptor wieder inaktiviert, der Ligand dissoziiert. Die Bindung ist in Abbildung 2.4.1 schrittweise dargestellt:



*Abb.2.4.1: schematische Darstellung der Signaltransduktion*

Alternativ dazu beschrieb Mason (1994) das Auftreten von FGF 1, 2 und 3 im Zellkern *in vitro*. Die FGF's traten jedoch nur in den Kernen der Zellen, die sie synthetisieren auf. Weitere Experimente zeigten das Auftreten von FGFR 1 in Nähe des Zellkerns nach Stimulation mit einem extrazellulären Liganden. Dies wies darauf hin, dass FGF's nicht nur Funktionen als Liganden an der Zelloberfläche besitzen, sondern eventuell zusätzlich

zellkernspezifische Funktionen ausüben. Diese Signalfunktion am Zellkern könnte parallel zur klassischen Tyrosinkinase-Transduktion verlaufen. Der aktivierte Rezeptor würde dann durch Endozytose ins Zellinnere gebracht, wo er durch den Transport seines Liganden zum Zellkern dessen direkten Einfluss auf die Genexpression steuert (Park et al., 1995).

## **2.5 Skelettentwicklung**

Bei der Bildung des Skelettes treten zunächst mesenchymale Vorläuferzellen auf. Aus ihnen gehen entweder Knorpelzellen hervor, die über die sogenannte endochondrale Ossifikation später verknöchern, oder aber sie verknöchern direkt durch desmale Ossifikation.

Über endochondrale Ossifikation läuft die prä- und postnatale Entwicklung von langen Röhrenknochen und Rippen ab. Wenn die Knorpelvorlagen festgelegt sind, beginnt die Knochenbildung von den Ossifikationszentren aus, die im Zentrum der Röhrenknochen liegen und sich wellenförmig zu den Enden hin ausbreiten. Der Prozess beginnt in den primären Zentren während der Embryogenese und wird postnatal in den Wachstumsfugen fortgesetzt und beendet. Während der endochondralen Ossifikation differenzieren die Chondrozyten in der Wachstumsfuge. Eine Proliferationszone gewährleistet einen erneuerungsfähigen Vorrat an Chondrozyten für das Knochenlängenwachstum. Nachdem der Zellzyklus angeregt wurde, sondern die reifen Chondrozyten eine Matrix ab, welche unter anderem aus Chondroitinsulfat Proteoglycanen und Typ II Collagen besteht. Umgeben von dieser Matrix hypertrophieren die Chondrozyten und bilden später Typ X Kollagen und alkalische Phosphatase. Hypertrophe Chondrozyten werden dort durch Apoptose (= programmierter Zelltod) abgebaut, während ihre umgebende Matrix mineralisiert und durch Knochentrabekel ersetzt wird.

Desmale Ossifikation findet vorwiegend am Schädel statt. Hier werden die Mesenchymvorläuferzellen durch Verdichtung und stärkere Durchblutung größer. Durch Zufuhr von Calcium- und Phosphationen setzt die Mineralisierung ein. Die Osteoblasten mauern sich ein und werden zu Osteozyten. Die Knochenbildung geht von einzelnen Ossifikationszentren aus und setzt sich in die Umgebung fort. Es entstehen Knochenbälkchen, die an ihrer Oberfläche in Reihen angeordnete Osteoblasten besitzen. Durch sie wird die Osteogenese fortgesetzt, indem sich die Bälkchen zu immer größeren Teilen verbinden (Schnorr, 1989).

In den Wachstumsfugen sind FGFR 1 und 3 exprimiert. FGFR 3 in proliferierenden und FGFR 1 in hypertrophierten Chondrozyten. FGFR 3 ist außerdem im Knorpel des sich entwickelnden Embryo vor der Bildung der Ossifikationszentren nachweisbar.

Ausdifferenzierte Chondrozyten scheinen kein FGF 2 zu binden. Dies könnte ein Hinweis darauf sein, dass FGF 2 entweder eine niedrige Affinität zu FGFR 1 hat, oder Kofaktoren fehlen, die die Bindung ermöglichen. In vitro bindet FGF 2 in Anwesenheit von Heparin an FGFR 1. FGF 2 verhindert die letzte Ausdifferenzierung zu hypertrophierten Chondrozyten. FGFR 3 vermittelt diesen inhibitorischen Effekt. Fällt das FGFR 3 Signal weg, ist die Chondrozytendifferenzierung beschleunigt. Mäuse ohne FGFR 3 haben normale und überlange Skelettanteile. Die primäre Rolle von FGFR 3 scheint also eine Hemmung der Chondrozytenproliferation zu sein (Deng et al., 1996). Zusätzlich sind Mäuse, bei denen FGF 2 im Übermaß vorhanden ist, minderwüchsig, was mit der Rolle von FGFR 3 als Hemmer der Chondrozytenproliferation übereinstimmt. Bei Mäusen ohne FGFR 3, wird eine Ausdehnung der hypertrophischen Zone beobachtet, bei solchen mit erhöhter Synthese von FGF 2 eine Reduktion. FGFR 3 ändert also den Anteil der Zellen, der in die hypertrophische Phase eintritt (Martin, 1998).

Physiologisches Schädelwachstum erfordert die Koordination der wachsenden Knochen und deren Anpassung an sich verändernde Vorgänge, wie z.B. das wachsende Gehirn (Jabs et al., 1993).

FGF's üben Effekte auf Lebensdauer, Proliferation und Differenzierung der Osteoblasten und ihrer Vorläufer aus. Apoptose der Osteoblasten wird durch FGF verhindert. Mutationen in FGF-Rezeptorgenen sind sogenannte „gain of function“ Mutationen, d.h. die Aktivität des Produktes ist gesteigert. Das beweist, dass die FGF-Rezeptoren innerhalb der cranialen Suturen ein anaboles Signal zur Differenzierung von Osteoblasten aussenden. Osteoblastendifferenzierung und Expression von FGFR 2 scheinen miteinander verbunden zu sein. FGFR 2 ist im präosteoblastischen Mesenchym lokalisiert. Im Stadium der Osteoblastendifferenzierung sind hohe Konzentrationen an FGF 2 messbar, einem möglichen Liganden für FGFR 2.

Während alle in FGFR 1 und 2 gefundenen Mutationen die craniofaciale Entwicklung betreffen, verursachen die meisten Mutationen in FGFR 3, neben craniofacialen Veränderungen, Minderwuchs, was ihre Rolle im endochondralen Knochenwachstum unterstreicht. Craniofaciale Veränderungen durch Mutationen in FGFR 3 kommen vermutlich dadurch zustande, dass Heterodimere zwischen FGFR 2 und 3 gebildet werden, die dann den Signalweg von FGFR 2 einschlagen. Mutationen im FGF-Rezeptor 3 betreffen immer, wenn auch nicht ausschließlich, Knochen, die aus endochondraler Ossifikation hervorgehen, während Mutationen in den Rezeptoren 1 und 2 solche betreffen, die aus desmaler Ossifikation hervorgehen (Deng et al., 1996).

## **2.6 Die FGF-Rezeptorgene**

Vier Gene kodieren für die 4 bekannten FGF-Rezeptoren. Jedes dieser Gene ist auf einem anderen Chromosom lokalisiert: FGFR 1 auf Chromosom 8 (8p11.2-p11.1; Wood et al., 1995), FGFR 2 auf Chromosom 10 (10q26; Mattei et al., 1991; Dionne et al., 1992), FGFR 3 auf Chromosom 4 (4p16.3; Thompson et al., 1991) und FGFR 4 auf Chromosom 5 (5q35.1q-ter; Warrington et al., 1992; Kostrzewa et al., 1998). Die Aminosäuresequenz der einzelnen Rezeptoren ist über weite Strecken konserviert. Zwischen FGFR 1 und 2 ist die Homologie mit 72 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz am größten, weniger stark dagegen zwischen FGFR 1 und 3 und mit 55 % am schwächsten zwischen FGFR 1 und 4 (Kostrzewa und Müller, 1998). Außerdem finden sich ebenfalls große Homologien zwischen verschiedenen Spezies. Beim Vergleich des FGF-Rezeptors 1 von Mensch und Maus fanden Johnson und Williams (1993) 98 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz, bei Mensch und Huhn 91 % und bei Mensch und Krallenfrosch (*Xenopus laevis*) 78 %. Daneben wiesen Usha et al. (1997) 89 % Übereinstimmung zwischen dem FGFR 3 des Menschen und dem des Rindes nach.

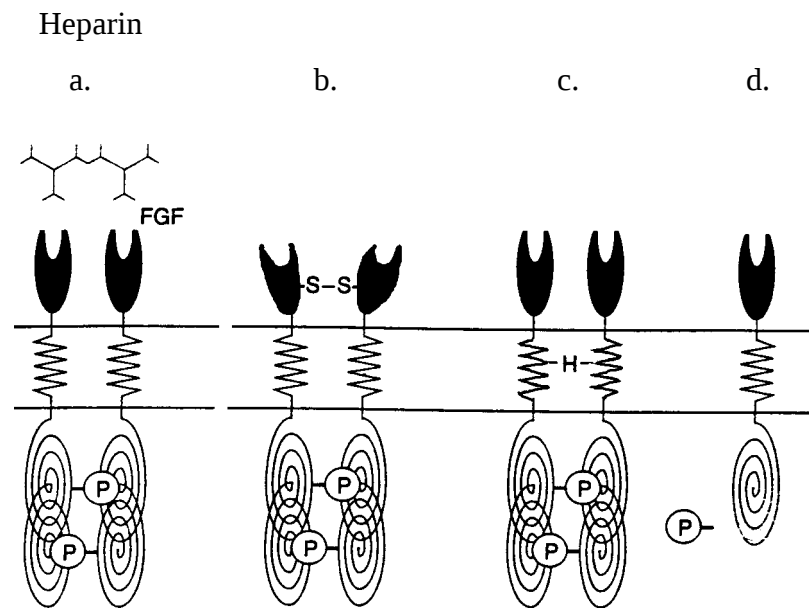
### **2.6.1 Physiologische Wachstumsregulation und Mutation**

Die FGF-Rezeptorgene regulieren den bereits beschriebenen Aufbau der Rezeptoren und damit den gesteuerten Ablauf von Wachstum und Differenzierung von Zellen. Der Rezeptor wird dabei aktiviert, wenn ein Ligand gebunden hat. Erst dann leitet er das Signal ins Zellinnere weiter und übt so seine physiologische Funktion aus. Liegt in einem Rezeptorgen eine Mutation in Form eines Basenaustauschs, einer Deletion oder Insertion vor, kann die physiologische Struktur des Rezeptors nicht mehr gewährleistet werden. Dies hat verschiedene Effekte, wobei nicht nur Art, sondern auch Lokalisation der Mutation eine Rolle spielen.

- Alle FGF-Rezeptoren besitzen mindestens 6 Cysteinreste, die paarweise durch Bildung von **intramolekularen** Disulfidbrücken die 3 Ig-Domänen stabilisieren: In FGFR 2 stabilisieren die Reste C62-C107 die Ig-Domäne I, C179-C231 die Ig-Domäne II und C278-C342 die Ig-Domäne III. Mutationen, die den Austausch eines Cysteins bedingen, haben immer ein übriges ungepaartes Cystein gegenüber zur Folge. Dieses freie Cystein sucht den ebenfalls freien Cysteinrest eines anderen Rezeptormoleküls zur

**intermolekularen** Ausbildung einer Disulfidbrücke (Robertson et al., 1998; Wilkie, 1997; Bellus et al., 1996; Burke et al., 1998). Auf diese Weise können 2 Rezeptormoleküle dimerisieren und die weitere Signalkaskade in Gang setzen, *ohne* dass zuvor ein Ligand gebunden hat. Diese ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors führt damit zur Weiterleitung des Signals zum falschen Zeitpunkt. Es wird also ein physiologischer Vorgang zur falschen Zeit angeregt (Webster et al., 1997). Mutationen, die nicht die Cysteinreste selbst, sondern direkt benachbarte Aminosäuren betreffen, können ebenfalls die Disulfidbrücke zwischen 2 Cysteinmolekülen zerstören und so zur ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors führen.

- Mutationen in der Ig III-Domäne destabilisieren vermutlich die Struktur dieser Domäne und führen so zur ligandenunabhängigen Dimerbildung von Rezeptormolekülen (Webster et al., 1997).
- Mutationen in der Verbindungsregion zwischen Ig II und Ig III heben die Bindung von FGF's scheinbar nicht auf. Es ist nicht geklärt, ob sie die Bindungsspezifität des Rezeptors verändern, oder seine Sensitivität auf geringe Ligandenkonzentrationen steigern (Webster et al., 1997). Die Beobachtung einer Sensitivitätssteigerung wurde 1998 von Anderson et al. für die Ig II-Ig III-Strecke von FGFR 2 im Beisein von FGF 2 beschrieben. Die Autoren wiesen nach, dass der Rezeptor schon bei niedrigen FGF 2 Konzentrationen besetzt wurde und zusätzlich die Bindungsdauer beim mutierten Rezeptor im Gegensatz zum Wildtyp verlängert war, was dann zu einem länger anhaltenden Signal führte. Die Veränderung der Rezeptorfunktion ließ sich auf die Anwesenheit von Aminosäuren in diesem Bereich zurückführen, die umfangreiche Seitenketten aufweisen (z.B. Trp, Phe). In der Verbindungsregion zwischen Ig II und Ig III sind an der gleichen Stelle Mutationen in 3 FGF-Rezeptorgenen nachweisbar.
- Mutationen in der transmembranen Domäne sind bisher für FGFR 2 und 3 bekannt. Sie verursachen dort die ligandenunabhängige Rezeptoraktivierung, indem in die hydrophobe transmembrane Domäne durch Mutation Aminosäuren eingeführt werden, welche Wasserstoffbrücken zwischen 2 Rezeptormolekülen ausbilden können. So kann eine gesteigerte Rezeptortyrosinkinase-Aktivität nachgewiesen werden (Webster et al., 1997)
- Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne aktivieren den Rezeptor sogar als monomer, indem sie die Autophosphorylierung an den Tyrosinresten des Rezeptors nachahmen, ohne dass sich zuvor ein Dimer aus zwei Rezeptormolekülen gebildet hat (Webster et al., 1997). Sogar eine mutierte Rezeptor-Isoform ohne extrazelluläre und transmembrane Domäne war im Experiment durch Autophosphorylierung aktiv.



**Abb. 2.6.1.1 Effekte von Punktmutationen auf die Funktion von FGF-Rezeptoren.** (a) Ligandenabhängige Aktivierung führt zu einem regulierten Signal zur Proliferation und Differenzierung von Knochen. (b) Verschiedene Mutationen in der extrazellulären Domäne führen zur Bildung intermolekularer Disulfidbrücken zwischen freien Cysteinen (S-S) und so zur ligandenunabhängigen Dimerisierung zweier Rezeptormoleküle. (c) Mutationen in der transmembranen Domäne führen zur ligandenunabhängigen Rezeptoraktivierung durch Bildung von Wasserstoffbrücken zwischen zwei Rezeptormolekülen. (d) Mutationen in den Tyrosinkinase-Domänen verursachen Konformationsänderungen des Rezeptormoleküls, welche seine Aktivierung durch Autophosphorylierung an Tyrosinresten zur Folge haben. (modifiziert nach Webster und Donoghue, 1997)

Mutationen, welche bisher in FGFR 1, 2 und 3 nachgewiesen wurden, sind an verschiedenen Erkrankungen, die das Knochenwachstum von Mensch und Tier betreffen, beteiligt (Park et al., 1995; Muenke et al., 1994; Webster et al., 1997). Sie verursachen dann z.B. Achondroplasie und/oder Craniosynostosen. In FGFR 4 konnten bislang keine Mutationen nachgewiesen werden (Kostrzewa und Müller, 1998).

## 2.7 Craniosynostosen -der Ablauf physiologischer Vorgänge zum falschen Zeitpunkt

Die Bezeichnung Craniosynostose beschreibt Formveränderungen am Schädel, die durch den vorzeitigen Verschluss einer oder mehrerer Suturen des Schädels bedingt sind. Es sind bislang etwa 100 Syndrome bekannt, die mit einer Craniosynostose einhergehen (Mulvihill, 1995; Fragale et al., 1999). Craniosynostosen können jedoch auch isoliert auftreten, ohne dass sie einem Syndrom zuzuordnen sind (Fragale et al., 1999). Sie treten mit einer Häufigkeit von 1:3000 bei Menschen aller ethnischen Gruppen auf und können durch Umweltfaktoren, wie z.B. Erkrankungen des Uterus, oder genetische Ursachen bedingt sein (Jabs, 1998). Der Schweregrad der Erkrankung hängt davon ab, ob eine oder mehrere Nähte des Schädels verschlossen sind. Je nach verschlossener Suture können folgende Schädelformen entstehen:

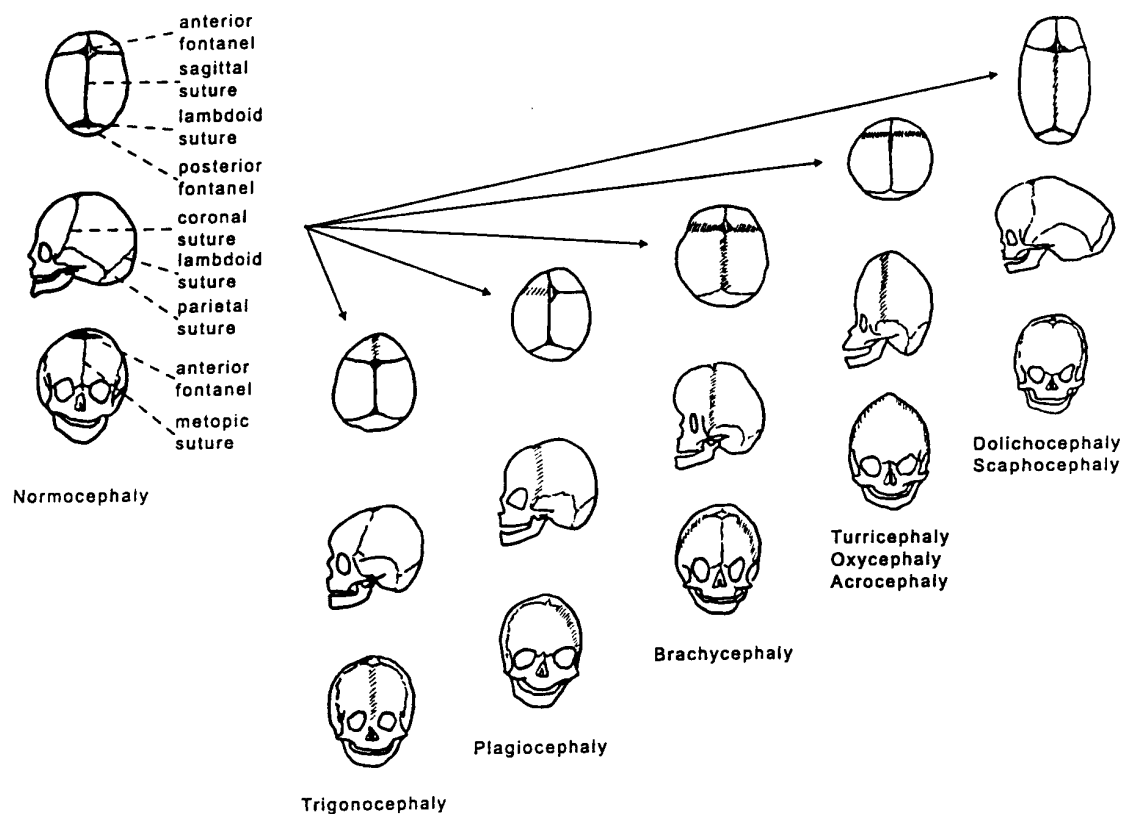


Abbildung aus Müller et al., 1997.

Bislang konnten 5 Gene identifiziert werden, die bei autosomal-dominant vererbten Craniosynostosen eine Rolle spielen (Müller et al., 1997). Zu diesen Genen gehört MSX2 auf Chromosom 5 (5q35.1), die FGF-Rezeptorgene 1, 2 und 3 auf den bereits genannten Chromosomen und das TWIST-Gen auf Chromosom 7 (7p21-p22.1). Ein Großteil der Craniosynostosen ist auf autosomal-dominante Mutationen in den FGF-Rezeptorgenen 1 bis 3 zurückzuführen. Die bekanntesten autosomal-dominant vererbten Syndrome sind das Apert-Syndrom (Wilkie et al., 1995; Anderson et al., 1998), das Crouzon-Syndrom (Reardon et al., 1994; Steinberger et al., 1996), das Pfeiffer-Syndrom (Muenke et al., 1994; Rutland et al., 1995) das Jackson-Weiss-Syndrom (Jabs et al., 1994), sowie das Saethre-Chotzen-Syndrom (Paznekas et al., 1998; El Ghouzzi et al., 1997,1999; Rose et al., 1997). Die Syndrom-Bezeichnungen beschreiben bestimmte phänotypische Merkmale, lassen jedoch bis auf wenige Ausnahmen nicht unbedingt auf eine bestimmte Mutation schließen. Im Folgenden sollen die charakteristischen phänotypischen Merkmale der genannten Syndrome aufgezeigt werden:

### **2.7.1 Apert-Syndrom**

Das Apert-Syndrom wurde erstmals 1906 von Apert beschrieben und nach ihm benannt. Es umschreibt einen meist bilateralen Verschluss der Coronarnaht und gegebenenfalls der Sagittalnaht, der häufig zu Brachycephalie führt. Zusätzliche Charakteristika beim Apert-Syndrom sind knöcherne oder häutige Syndaktylien an Händen und Füßen. Je nach Art der Syndaktylien erfolgt die Einteilung in Schweregrade I-III (Cohen et al., 1995):

- Grad I = häutige/knöcherne Syndaktylie der Phalangen II-IV an Hand und Fuß
- Grad II = häutige/knöcherne Syndaktylie der Phalangen II-V an Hand und Fuß
- Grad III = häutige/knöcherne Syndaktylie der Phalangen I-V an Hand und Fuß

Grad I tritt an den Händen, Grad III an den Füßen am häufigsten auf. Dazu kommen oft kardiovaskuläre Defekte und, bei 70 % aller Fälle, Acne vulgaris. Auch können Schulter, Ellbogen, Hüfte und Knie durch Ankylosen häufig nur eingeschränkt bewegt werden (Gorlin et al., 1990). Im Gegensatz zu den meisten anderen Craniosynostosen ist das Apert-Syndrom in 98 % der Fälle auf 2 Mutationen in der Verbindungsregion zwischen Ig II und Ig III von FGFR 2 zurückzuführen (Wilkie et al., 1995). Es handelt sich dabei um den Aminosäureaustausch zweier benachbarter Aminosäuren an Stelle 252 und 253. Im ersten Fall wird Serin an Stelle 252 gegen Tryptophan ausgetauscht, im zweiten Prolin an Stelle 253

gegen Arginin. Verschiedene Beobachtungen zeigten, dass diese beiden Mutationen unterschiedlich häufig vorkommen. Ser 252 Trp tritt doppelt so häufig auf wie Pro 253 Arg (Moloney et al., 1996). Außerdem sind die Syndaktylien beim Pro 253 Arg Austausch deutlich schwerer einzustufen, als bei Ser 252 Trp (Mulvihill, 1995). Das Apert-Syndrom ist eine der wenigen Craniosynostosen, die sich durch phänotypische Merkmale relativ eindeutig diagnostizieren lässt. Apert-Mutationen treten mit einer Häufigkeit von 1:65000 auf.

### **2.7.2 Crouzon-Syndrom:**

Das Crouzon-Syndrom (Crouzon, 1912; Atkinson, 1937) zeichnet sich durch craniale Synostose unterschiedlicher Nähte und Mittelgesichtshypoplasie aus (Steinberger et al., 1995). Es tritt mit einer Häufigkeit von 1:25000 auf (Cohen et al., 1995). Desweiteren werden flache Orbitae und Exorbitismus beobachtet, woraus ein häufiges Auftreten von Konjunktividen und Keratitiden resultiert (Gorlin et al., 1990). Bei 55 % aller Crouzon-Patienten ist außerdem die Hörfähigkeit reduziert. Mit diesem Syndrom gehen mehrere Mutationen in FGFR 2 und eine Mutation in FGFR 3 einher. Eine genaue Diagnose lässt sich nach den phänotypischen Erscheinungen kaum stellen, da diese mit den beim Pfeiffer-und Jackson-Weiss-Syndrom gefundenen zum Teil überlappen (Tartaglia et al., 1997; Rutland et al., 1995) Charakteristisch für das Crouzon-Syndrom ist jedoch das fehlende Auftreten von Gliedmaßenveränderungen (Reardon et al., 1994). Mentale Retardierung wird bei nur 3 % aller Patienten beobachtet (Cohen et al., 1995).



*Abb. 2.7.2.1: Patient mit Crouzon-Syndrom*

Eine charakteristische Mutation, die mit diesem Syndrom korreliert, ist die Mutation Ala 391Glu in FGFR 3. Die Besonderheit dieses Aminosäureaustauschs liegt in der mit ihr einhergehenden Acanthosis nigricans (Meyers et al., 1995; Wilkes et al., 1996).

Anhand dieser Hautveränderungen in Kombination mit einer Craniosynostose kann eine weitgehend sichere klinische Diagnose gestellt werden.

### **2.7.3 Pfeiffer-Syndrom:**

Pfeiffer beschrieb 1964 ein Syndrom, welches durch Craniosynostose in Verbindung mit Syndaktylien an Händen und Füßen gekennzeichnet ist. Die Expressivität ist dabei sehr variabel. Eine Besonderheit im Unterschied zu dem unten beschriebenen Jackson-Weiss-Syndrom sind die breiten Füße in Verbindung mit breiten großen Zehen (Cohen, 1995). Die Einteilung erfolgt je nach phänotypischen Merkmalen in drei Typen (Plomp et al., 1998). Typ 1 wird als das „klassischer“ von Pfeiffer beschriebener Typ bezeichnet. Die Prognose bei diesem Typ ist gut, die Intelligenz der Patienten normal. Typ 2 wird durch Kleeblattschädel, Exorbitismus, Ankylose der Ellbogen und Anomalien an Händen und Füßen charakterisiert. Typ 3 schließlich zeigt den gleichen Phänotyp wie Typ 2, allerdings ohne Kleeblattschädel (Plomp et al., 1998). Mit dem Pfeiffer-Syndrom korrelieren mehrere Mutationen in FGFR 2 und der einzige bislang in FGFR 1 nachgewiesene Aminosäureaustausch von Prolin an Stelle 252 zu Arginin. An der gleichen Stelle befindet sich in FGFR 2 und 3 ebenfalls dieser Aminosäureaustausch. In FGFR 2 geht die Mutation mit dem Apert-Syndrom einher, in FGFR 3 mit einem nicht klassifizierbaren Craniosynostosesyndrom (Bellus et al., 1996; Graham et al., 1998; Golla et al., 1997; Muenke et al., 1997).

### **2.7.4 Jackson-Weiss-Syndrom:**

Das Jackson-Weiss-Syndrom (Jackson et al., 1976) ist charakterisiert durch eine Craniosynostose, die von Brachycephalie bis Acrocephalie variieren kann. Zusätzliche phänotypische Merkmale sind ein breiter großer Zeh, der nach medial abgespreizt ist und knöcherne tarsale-metatarsale Verschmelzungen. Der gesamte Fuß ist dabei jedoch im Gegensatz zum Pfeiffer-Syndrom nicht verbreitert (Cohen, 1995; Jabs et al., 1994; Tartaglia et al., 1999). Mit dieser Form der Craniosynostose gehen verschiedene Mutationen in der Ig III-Domäne einher (Tartaglia et al., 1999). Sie tritt extrem selten auf.

### **2.7.5 Beare-Stevenson-Syndrom:**

Beare-Stevenson cutis gyrata kennzeichnet ein selten vorkommendes Craniosynostosesyndrom, dessen Hauptcharakteristikum neben den craniofacialen und digitalen Anomalien eine Furchung der Haut in Kombination mit zusätzlich auftretenden Acanthosen im Achselhöhlen-, Gesichts-, Perianal- und Genitalbereich ist. Außerdem kommen Hypertelorismus, Strabismus, Palpebralfissuren, Ohranomalien und choanale Atresien vor. Die Veränderungen der Haut erlauben eine relativ sichere Diagnose nach dem äußeren Erscheinungsbild. Es sind bisher 2 Mutationen nachgewiesen worden, die mit dem beschriebenen Phänotyp einhergehen. Beide liegen in der transmembranen Domäne von FGFR 2. Der Aminosäureaustausch Tyr 375 Cys wurde von Przylepa et al. (1996) bei zwei Patienten mit Kleeblattschädel und Hydrocephalus zusätzlich zu den genannten Hautveränderungen detektiert. Ein weiterer Patient mit einem übereinstimmenden Phänotyp wurde 1998 von Krepelova' et al. beschrieben. Der Aminosäureaustausch liegt in der transmembranen Domäne N-terminal. Ein weiterer carboxyterminal liegender Austausch wurde von Przylepa et al. (1996) bei einem Patienten nachgewiesen, der keinen Kleeblattschädel, Hydrocephalus oder digitale Anomalien zeigte. Es handelte sich um den Austausch Ser 372 Cys.

Das gleichzeitige Auftreten von Craniosynostosen und Hautveränderungen lässt sich dadurch erklären, dass die Mutationen, welche beide in Exon 10, also hinter der Ig III-Domäne liegen, sowohl in der BEK, als auch in der KGFR Isoform vorkommen. KGFR ist vorwiegend in Zellen epithelialer Herkunft exprimiert, BEK dagegen in Knochenvorläuferzellen.

Der Phänotyp beim Beare-Stevenson-Syndrom zeigt Überlappungen mit dem viel milderen Crouzon-Syndrom in Verbindung mit Acanthosis nigricans. Dies ist darauf zurückzuführen, dass die Mutationen für beide Syndrome in der gleichen funktionellen Domäne in unterschiedlichen Rezeptoren liegen. Außerdem ist die Tatsache bekannt, dass FGFR's untereinander Heterodimere bilden können und FGFR 2 und 3 die gleichen Liganden binden. Beide sind darüberhinaus in Haut und Knochen gleichermaßen exprimiert.

### **2.7.6 Achondroplasie:**

Mutationen in der transmembranen Domäne von FGFR 3 verursachen die häufigste Form von Minderwuchs, die Achondroplasie (Shiang et al., 1994). Wie in 2.5 bereits erwähnt, steuert

der FGF-Rezeptor 3 das Längenwachstum der Röhrenknochen negativ, d.h. er bremst die Chondrozytenproliferation und verhindert so, dass die Knochen überlang werden (Deng et al., 1996). Wird der Rezeptor nun durch eine Mutation zum falschen Zeitpunkt aktiviert, übt er seine negativ regulierende Funktion im Übermaß aus. Das physiologische Längenwachstum der Knochen wird also zu stark gebremst, so dass daraus ein Minderwuchs resultiert. Die häufigste mit Achondroplasie einhergehende Mutation ist der Aminosäureaustausch von Glycin an Stelle 380 zu Arginin (Bellus et al., 1995).

### **2.7.7 Hypochondroplasie:**

Die Hypochondroplasie ist die mildeste Form des Minderwuchses und tritt autosomal-dominant ausschließlich in der Tyrosinkinase-Domäne I von FGFR 3 auf. Sie ist auf den Aminosäureaustausch von Asparaginsäure an Stelle 540 zu Lysin oder Threonin zurückzuführen (Deutz-Terlouw et al., 1998; Bellus et al., 1995).

### **2.7.8 Thanatophore Dysplasie:**

Die Thanatophore Dysplasie ist die schwerste Form von Minderwuchs. Sie wird durch zwei Typen klassifiziert, beide sind letal. Typ I wird durch Mutationen in der Ig II-Ig III Verbindungsregion, durch Mutationen in der transmembranen Domäne und durch die einzige Mutation im Stop-Codon von FGFR 3 verursacht. Klinisch ist dieser Typ vor allem durch kurze krumme Femora gekennzeichnet. Die Thanatophore Dysplasie vom Typ II geht ausschließlich mit Mutationen in der Tyrosinkinase-Domäne II einher und ist durch gerade Femura, sowie schwere Kleeblattschädel charakterisiert.

### **2.7.9 Saethre-Chotzen-Syndrom:**

Im Gegensatz zu den oben beschriebenen Syndromen gehört das Saethre-Chotzen-Syndrom (Saethre, 1931; Chotzen, 1932) nicht zu den FGF-Rezeptor assoziierten Craniosynostosesyndromen. Es korreliert vielmehr mit mehreren Mutationen im Gen, welches für den Transkriptionsfaktor TWIST auf Chromosom 7 (7p21-p22.1) kodiert. Dieses Syndrom wird ebenfalls autosomal-dominant vererbt. Phänotypische Merkmale sind eine Craniosynostose unterschiedlicher Ausprägung, tiefer Haaransatz, Gesichtasymmetrie, Ohranomalien, Brachydaktylie und cutane Syndaktylien vor allem des zweiten und dritten

Fingers (Gorlin et al., 1990). Obwohl bei Patienten, die klinisch als Seathre-Chatzen-Patienten klassifiziert wurden, häufig eine Mutation im TWIST-Gen nachgewiesen werden konnte, wurde bei einigen ein Nukleotidaustausch in FGFR 2 oder 3 detektiert. Dies ist ein weiterer Beweis für die Variabilität des Phänotyps bei dieser Erkrankung (Paznekas et al., 1998; El Ghouzzi et al., 1999; Escobar et al., 1977; Rose et al., 1997; Johnson et al., 1998).

Eine Mutation im MSX2-Gen wurde bisher bei einer einzigen großen Familie detektiert (Jabs et al., 1993). Der Aminosäureaustausch Pro 7 His in Exon 2 des Gens verändert seine Tertiärstruktur und damit seine Funktion. Die daraus resultierende Craniosynostose wird als Craniosynostose vom Boston-Typ bezeichnet und kann in Form einer Mittelgesichtshypoplasie bis hin zum Kleeblattschädel vorkommen (Warman et al., 1993; Müller et al., 1993; Jabs et al., 1993; Wilkie et al., 1995).

Bei FGF-Rezeptor assoziierten Craniosynostosen korreliert der Phänotyp selten mit dem Genotyp. Es wurden identische Mutationen bei Patienten mit klinischem Pfeiffer-, Crouzon-, und Jackson-Weiss-Syndrom nachgewiesen. Diese große Variabilität des Phänotyps tritt sogar bei Familienmitgliedern derselben Familie auf (Jabs, 1998). Desweiteren können Mutationen in unterschiedlichen FGF-Rezeptorgenen den gleichen Phänotyp zeigen. Bis auf die oben beschriebenen Ausnahmen kann vom Phänotyp daher kein Rückschluß auf den Genotyp erfolgen. Besonders erwähnenswert ist der Aminosäureaustausch Pro 250 Arg in Exon 7 von FGFR 3, der zu einem extrem variablen Phänotyp führt. Patienten mit dieser Mutation können leichte bis schwere Craniosynostosen in Verbindung mit Syndaktylien der Extremitäten zeigen und gegebenenfalls sogar ein reduziertes Hörvermögen haben (Moloney et al., 1997; Bellus et al., 1996; Muenke et al., 1997; Reardon et al., 1997). Auch die Mutation Ala 344 Ala in FGFR 2 wurde bei einer Familie mit stark variierendem Phänotyp nachgewiesen (Steinberger et al., 1996).

Die Folgen einer Craniosynostose sind unter anderem: erhöhter intracranialer Druck, Verengung der Luftwege, Beeinträchtigung von Hören und Sehen und in schweren Fällen geistige Retardierung (Wilkie, 1997). Die moderne Craniofaciale Chirurgie ermöglicht es heutzutage jedoch, die Folgen einer Craniosynostose weitgehend einzudämmen (Wilkie, 1997; Fragale et al., 1999).

## **2.8 Aufgabenstellung der vorliegenden Arbeit**

1. Fortführung der Mutationsanalysen in Exon 7 von FGFR 1, Exon 7 und 9 von FGFR 2 und Exon 7, 9 und 10 von FGFR 3.
2. Erkenntnisse über die Häufigkeit bestimmter Mutationen.
3. Untersuchung neuer, bislang nicht untersuchter Teilbereiche der Rezeptorgene auf eventuelle weitere Mutationen.
4. Etablierung einer neuen Methode, welche die Möglichkeit schafft, Fragmente über 300 bp zu untersuchen, und dabei sensitiver ist als die SSCP-Analyse.

### 3 Material

#### 3.1 Geräte und Zubehör

| Gerät            | Typ                          | Hersteller           |
|------------------|------------------------------|----------------------|
| Autoklav         | Vakulab S 3000               | MMM                  |
| DNA-Sequencer    | Model 4000 L                 | Licor                |
| Eismaschine      | Icematic                     | Castel MAC           |
| Heizblock        | DB-3                         | Techne               |
| Heizrührplatte   | MEA II                       | IDL                  |
| Mischwippe       | M 261 25                     | Thermolyne           |
| Parafilm M       | H666.1                       | Roth                 |
| Pasteurpipetten  | 4522.1                       | Roth                 |
| pH-Meter         | pH-Meter 761 Callimatic      | Knick                |
| Photometer       | GeneQuantII                  | Pharmacia<br>Biotech |
| Röntgenfilme     | Cronex® Medical X-Ray Film   | Du Pont              |
| Röntgenkassetten | Cronex® Intensifying Screens | Du Pont              |
| Vortex           | Heidolph Reax 2000           | Heidolph             |
| Wasserbäder      |                              | Köttermann           |

#### Gefrierschränke:

|                  |                       |         |
|------------------|-----------------------|---------|
| Gefrierschrank 1 | bis - 20°C            | Bosch   |
| Gefrierschrank 2 | B 31400 ( bis – 80°C) | Heraeus |

#### Geiger-Müller-Zähler:

|                        |                        |                           |
|------------------------|------------------------|---------------------------|
| Geiger-Müller-Zähler 1 | Mini Monitor Series 90 | American<br>Bioanalytical |
| Geiger-Müller-Zähler 2 | LB1210 B               | Berthold                  |

Geltrockner:

|                |         |        |
|----------------|---------|--------|
| Gel-Trockner 1 | SE 1160 | Hoefer |
| Gel-Trockner 2 | GT 3    | Keutz  |

DGGE-Zubehör:

|                      |           |        |
|----------------------|-----------|--------|
| D – Code™-System     | 170 9090  | BioRad |
| Gradient Former      | Model 385 | BioRad |
| Glasplatte 16 x 20   | 1709215   | BioRad |
| Glasplatte 18,5 x 20 | 1709216   | BioRad |

Horizontale Gel-elektrophoresekammern:

|                               |                    |           |
|-------------------------------|--------------------|-----------|
| Kammer 1                      | Horizon 58 (25 ml) | Gibco BRL |
| Kammer 2                      | (100 ml)           | Keutz     |
| Kammer 3                      | H 5 (100 ml)       | Gibco BRL |
| Vertikalelektrophorese-Kammer | Model S2           | BRL       |

Zentrifugen:Tischzentrifugen:

|              |                 |           |
|--------------|-----------------|-----------|
| Zentrifuge 1 | Biofuge A       | Heraeus   |
| Zentrifuge 2 | Biofuge pico    | Heraeus   |
| Zentrifuge 3 | Centrifuge 5415 | Eppendorf |

Kühlzentrifugen:

|              |                                         |         |
|--------------|-----------------------------------------|---------|
| Zentrifuge 1 | Biofuge 13 R (13000 min <sup>-1</sup> ) | Heraeus |
| Zentrifuge 2 | RC 2-B (20000 min <sup>-1</sup> )       | Sorvall |
| Zentrifuge 3 | Cryofuge 5000                           | Heraeus |

Reaktionsgefäße:

|                   |                  |           |
|-------------------|------------------|-----------|
| Safe-Lock 2ml     | 0030120.094      | Eppendorf |
| Microtubes 1,5 ml | 0030102.002      | Eppendorf |
| Safe-Lock 1,5 ml  | 0030102.086      | Eppendorf |
| Safe-Lock 0,5 ml  |                  | Eppendorf |
| Thermo-Fast® 24   | AB-0624 (200 µl) | Advanced  |

## Biotechnologies

|                       |              |                             |
|-----------------------|--------------|-----------------------------|
| Micro-Caps            | AB-0602      | Advanced<br>Biotechnologies |
| Thermowell™           | Model C 6510 | Costar                      |
| Lid for Thermowell C™ | 6520         | Costar                      |
| Falcon Tubes 50 ml    | q227261      | Greiner                     |

Spannungsquellen:

|                   |                      |          |
|-------------------|----------------------|----------|
| Spannungsquelle 1 | Mini Power Pack P 20 | Biometra |
| Spannungsquelle 2 | 2297 Macrodrive 5    | LKB      |
| Spannungsquelle 3 | Model 4000           | BRL      |

Thermocycler:

|                |                      |                  |
|----------------|----------------------|------------------|
| Thermocycler 1 | Uno Thermoblock      | Biometra         |
| Thermocycler 2 | Hybaid Omni Gene     | Hybaid Ltd. (UK) |
| Thermocycler 3 | Techne Progene       | Thermo Dux       |
| Thermocycler 4 | Perkin Elmer Cetus I | Perkin-Elmer     |
| Thermocycler 5 | Gene Amp 2400        | Perkin-Elmer     |

UV-Iluminator, Kameraund Thermodrucker

|            |                               |                      |
|------------|-------------------------------|----------------------|
| Iluminator | Macro Vue UV 25               | Hoefer               |
| Kamera     | 4722                          | COHU                 |
| Monitor    | E1491A                        | Mitsubishi           |
| Drucker    | P68E                          | Mitsubishi           |
| Papier     | Mitsubishi K 65M WI/97M009277 | Diagramm-<br>Halbach |

Waagen:

|         |                     |         |
|---------|---------------------|---------|
| Waage 1 | PM 4800 Delta Range | Mettler |
| Waage 2 | PM 400              | Mettler |

### **3.2 Chemikalien**

| <u>Stoff</u>                       | <u>Bestellnummer</u> | <u>Hersteller</u> |
|------------------------------------|----------------------|-------------------|
| Acrylamid-Stammlösung              | 3030.1               | Roth              |
| Acrylease®                         | 300132               | Stratagene        |
| <u>Agarose:</u>                    |                      |                   |
| Resophor high resolution           | 9470915              | Eurobio           |
| Genagarose                         | P1805Ga              | Genaxis           |
|                                    |                      | Biotechnology     |
| Serva high EEO                     | 11397                | Serva             |
| Agepon Super (Netzmittel)          | 1.18050              | Agfa              |
| Ammoniumpersulfat                  | 13375                | Serva             |
| Betaine                            | B-2754               | Sigma             |
| Borsäure                           | 112015               | Merck             |
| Bromphenolblau                     | 15375                | Serva             |
| Chloroform                         | 822265.100050        | Merck             |
| Dimethylsulfoxid<br>(DMSO)         | D-8418               | Sigma             |
| Essigsäure                         | 100056               | Merck             |
| Ethanol absolut                    | 100983               | Merck             |
| Ethidiumbromid                     | 21238                | Serva             |
| Ethylendiamintetraacetat<br>(EDTA) | E-5134               | Sigma             |
| Ficoll                             | 21373                | Serva             |
| Formamid                           | 47670                | Fluka             |
| Glycerin                           | 1.04094              | Merck             |
| Harnstoff                          | 1.08486.5000         | Merck             |

## Hank's-Puffer-Salz-Lösung

|                                                   |              |                         |
|---------------------------------------------------|--------------|-------------------------|
| (HBSS)                                            | 14180-038    | Gibco BRL               |
| Isopropanol                                       | 109634       | Merck                   |
| 100 bp Ladder                                     | R310-01      | Invitrogen              |
| Magnesiumchlorid                                  | 104-20       | Sigma                   |
| MDE Gellösung                                     | 830620       | Biozym                  |
| Mineralöl                                         | M-3516       | Sigma                   |
| Natriumdodecylsulfat (SDS)                        | 20760        | Serva                   |
| Natriumhydroxid                                   | 1.06498.1000 | Merck                   |
| N, N,N', N'-Tetramethyldiamin<br>(TEMED)          | 35925        | Serva                   |
| Perfect Match                                     | 600129       | Stratagene              |
| Phenol                                            | 100200       | Merck                   |
| pUC/DdeI (DNA-Größenstandard)                     |              | selbst präpariert       |
| Rotiphorese® Gel 40                               | A515.1       | Roth                    |
| D(+)-Saccharose                                   | 9097.1       | Roth                    |
| Serdogel                                          | 10690.02     | Serva                   |
| Sigmacote®                                        | SL-2         | Sigma                   |
| Silikon-Fett                                      | 1.07746.0020 | Merck                   |
| Spermidin                                         | 35285        | Serva                   |
| Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan<br>(Trizma®Base) | T-1503       | Sigma                   |
| Triton X-100                                      | 37240        | Serva                   |
| Vaseline                                          | 1-2075       | Neolab                  |
| Whatmann Papier                                   | #426693      | Schleicher &<br>Schuell |
| Xylencyanol                                       | 10590.0005   | Merck                   |

### **3.3 Enzyme**

| <u>Enzym</u>                     | <u>Bestellnummer</u> | <u>Hersteller</u>      |
|----------------------------------|----------------------|------------------------|
| Nci I (Restriktionsendonuclease) | #196 S               | New England<br>Biolabs |
| Taq-Polymerase                   | 1146165              | Boehringer<br>Mannheim |
| Taq-Polymerase                   | 201203               | Qiagen                 |
| T4-Polynukleotidkinase           | E70031Y              | USB                    |
| Proteinase K (Lyse-Enzym)        | 745723               | Boehringer<br>Mannheim |

### **3.4 Nukleotide und Radionukleotide**

| <u>Nukleotid</u>                               | <u>Bestellnummer</u> | <u>Hersteller</u>             |
|------------------------------------------------|----------------------|-------------------------------|
| Desoxyribonukleotide                           | U1240                | Promega                       |
| $\alpha$ - <sup>32</sup> P-dCTP (3000 Ci/mmol) | AA0005               | Amersham                      |
| $\gamma$ - <sup>32</sup> P-ATP (3000 Ci/mmol)  | AA0068               | Amersham                      |
| Oligonukleotide                                |                      | MWG Biotech<br>oder Gibco BRL |

### **3.5 Kits**

| <u>Kit</u>             | <u>Bestellnummer</u> | <u>Hersteller</u>  |
|------------------------|----------------------|--------------------|
| Gel Extraction Kit     | 28704                | Qiagen             |
| NucleoSpin Extract Kit | 740590               | Macherey-<br>Nagel |
| Nucleon BACC 2         | RPN8502              | Amersham           |
| Thermosequenase        |                      |                    |
| Cycle Sequencing Kit   | US78500              | Amersham           |

Thermosequenase

flourescent labeled

primer cycle sequencing Kit

RPN2436

Amersham

### **3.6 Lösungen und Puffer**

Auftragspuffer für Agarosegele (TBE-Gele)

2 M Harnstoff

50 % Saccharose

0,1 M EDTA

0,1 % Bromphenolblau

0,1 % Xylencyanol

10x TBE

Auftragspuffer für Agarosegele (TAE-Gele)

200 µl 50x TAE

500 µl Glycerin

300 µl dd H<sub>2</sub>O

+ 1 Spatelspitze

Bromphenolblau

+ 1 Spatelspitze

Xylencyanol

Auftragspuffer für DGGE Gele

0,5 % Bromphenolblau

0,5 % Xylencyanol

1x TAE

DNA-Extraktionspuffer

40 ml 1M Tris pH 8

40 ml 0,5 M EDTA pH 8

20 ml 5M NaCl

sterilfiltrieren, bei 4°C lagern

|                    |                                                                                               |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 0,5 M EDTA, pH 8,0 | 186,12 g EDTA<br>ad 1 L dd H <sub>2</sub> O<br>mit NaOH auf pH 8<br>einstellen, autoklavieren |
|--------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|

|                            |                                     |
|----------------------------|-------------------------------------|
| Ethidiumbromid-Stammlösung | 100 mg in 250 ml<br>A. bidest lösen |
|----------------------------|-------------------------------------|

Gellösungen für DGGE Gele

**8 % Acrylamid**

|                           |                                                                       |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------|
| 0 % denaturierende Lösung | 20 ml 40 % Acrylamid/Bis<br>2 ml 50x TAE<br>78 ml dd H <sub>2</sub> O |
|---------------------------|-----------------------------------------------------------------------|

|                             |                                                                                                              |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 100 % denaturierende Lösung | 20 ml 40 % Acrylamid/Bis<br>2ml 50x TAE<br>40 ml Formamid<br>42 g Harnstoff<br>ad 100 ml dd H <sub>2</sub> O |
|-----------------------------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

---

**6,5 % Acrylamid**

|                           |                                                                        |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------|
| 0 % denaturierende Lösung | 15 ml 40 % Acrylamid/Bis<br>10 ml 10x TAE<br>75 ml dd H <sub>2</sub> O |
|---------------------------|------------------------------------------------------------------------|

|                            |                                                                                                                  |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 80 % denaturierende Lösung | 15 ml 40 % Acrylamid/Bis<br>10 ml 10x TAE<br>32 ml Formamid<br>33,6 g Harnstoff<br>ad 100 ml dd H <sub>2</sub> O |
|----------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

---

|                              |                                                                                                                                                               |
|------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Gellösung für SSCP Gele      | 20 ml Serdogellösung oder<br>MDE Gellösung<br>4,8 ml 10x TBE<br>55,2 ml dd H <sub>2</sub> O                                                                   |
| Gellösung für Sequenziergele | 100 ml 40 % Acrylamid/Bis<br>350 ml Harnstoff 10 M<br>50 ml 10x TBE                                                                                           |
| Heiß-Mix für Heiß PCR        | 50 µl ddATP (10 mM)<br>50 µl ddGTP (10 mM)<br>50 µl ddTTP (10 mM)<br>4 µl ddCTP (10 mM)<br>246 µl dd H <sub>2</sub> O                                         |
| Kalt-Mix für Kalt PCR        | 50 µl ddATP (10 mM)<br>50 µl ddCTP (10 mM)<br>50 µl ddGTP (10 mM)<br>50 µl ddTTP (10 mM)<br>200 µl dd H <sub>2</sub> O                                        |
| Kernextraktionspuffer        | 109,5 g Saccharose<br>5 ml 1M MgCl <sub>2</sub><br>10 ml Triton X-100<br>10 ml 1M Tris pH 8<br>ad 1 L dd H <sub>2</sub> O<br>sterilfiltrieren, bei 4°C lagern |
| "Long-Run"-Puffer (10 x TBE) | 1340 mM Tris-Base<br>45 mM Borsäure<br>25 mM EDTA<br>ad 1 L dd H <sub>2</sub> O                                                                               |

|                         |                                                                                                    |
|-------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Phenol/Chloroform       | Chloroform wird mit<br>trisgesättigtem Phenol<br>im Verhältnis 1:1 gemischt<br>Lagerung bei 4 °C   |
| STE-Extraktionspuffer   | 2 ml 5 M NaCl<br>5 ml 1 M Tris HCl pH 7,6<br>0,2 ml 0,5 M EDTA pH 8<br>92,8 ml dd H <sub>2</sub> O |
| Stoppuffer für Heiß PCR | 80 % Formamid<br>10 mM NaOH<br>1 mM EDTA<br>0,1 % Bromphenolblau<br>0,1 % Xylencyanol              |
| 10 x Taq-Puffer         | 100 mM Tris-HCl pH 8,3<br>500 mM KCl<br>15 mM MgCl <sub>2</sub><br>0,1 % Gelatine                  |
| 10x TBE                 | 0,9 M Tris<br>0,9 M Borsäure<br>0,025 M EDTA<br>Dinatriumsalz<br>pH 8,2-8,5                        |

|                   |                                                                                           |
|-------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1x TE             | 10 mM Tris/HCl, pH 7,6<br>1 mM EDTA Dinatriumsalz                                         |
| 1 x TE + Rnase    | 10 mM Tris/HCl, pH 7,6<br>1 mM EDTA Dinatriumsalz<br>0,04 µg/ml Rnase                     |
| 50x TAE           | 2 M Tris (242 g/l)<br>50mM<br>EDTA Dinatriumsalz<br>mit Essigsäure auf<br>pH 8 einstellen |
| Ethanol/Na-Acetat | Ethanol absolut +<br>1/20 3M NaAc                                                         |

### 3.7 Primertabelle (Nomenklatur nach Givol und Yayon, 1992)

| Amplifiziertes Exon      | Primer 5' – 3'                                                                                                          | Annealing-Temp. (°C) | PCR-Produkt (bp) |
|--------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------|------------------|
| FGFR 1 exon 5            | GGA ATT CCA TCT TCC ACA GAG CGG<br>GGA ATT CCT CAA GAT CTG GAC ATA AGG CAG                                              | 64                   | 216              |
| FGFR 2 exon 1            | CTG TCT CCG TCT TCT CTC<br>ATC TCA CTA CCT TTT CAC TTG                                                                  | 56                   | 381              |
| FGFR 2 exon 2            | TCC ATG GAA TAT GTT CTT TTG<br>CCC TCC ATG CTC CTC TC                                                                   | 55                   | 155              |
| FGFR 2 exon 7 (1.Hälfte) | TGA CAG CCC TCT GGA CAA CAC AAC<br>TTT CCA CGT GCT TGA TCC                                                              | 59                   | 222              |
| FGFR 2 exon 7 (gesamt)   | GTC TCT CAT TCT CCC ATC CC<br>GAA GGA GAC CCC AGT TGT G                                                                 | 61                   | 288              |
| FGFR 2 exon 8            | TTG GCC GTT ATA TTG TTC TC<br>TAT CCA GCT TTT CTT TTT AA                                                                | 58                   | 230              |
| FGFR 2 exon 9            | CCC TCC ACA ATC ATT CCT<br>CCC AGA GAG AAA GAA CAG TA                                                                   | 63                   | 228              |
| FGFR 3 exon 7 (1.Hälfte) | GCC CCT GAG CGT CAT CTG<br>CTG GAT GTG GGG CTG TGC                                                                      | 66,7                 | 146              |
| FGFR 3 exon 7 (2.Hälfte) | TGC AAG GTG TAC AGT GAC<br>CAA ATC CTC ACG CAA CCC                                                                      | 60                   | 198              |
| FGFR 3 exon 7 (gesamt)   | GTG GCG GTG GTG GTG AGG<br>CAA ATC CTC ACG CAA CCC                                                                      | 61                   | 335              |
| FGFR 3 exon 7 (gesamt)   | CGG CAG TGA CGG TGG TGG TGA<br>CCA AAT CCT CAC GCA ACC C                                                                | 62                   | 341              |
| FGFR 3 exon 7 (Verdau)   | CGG CAA CTA CAC CTG CGT CGT G<br>CTT GAG CAC GGT AAC GTA GGG                                                            | 58                   | 351              |
| FGFR 3 exon 9            | TCG CCT ATC GCT CTG CTC TCT<br>GCG TCC CCC AGA CAG TGC                                                                  | 67                   | 221              |
| FGFR 3 exon 10           | GCC TCA ACG CCC ATG TCT TT<br>GGG CAG GCA GCT CAG AAC                                                                   | 66                   | 240              |
| Amplifiziertes Exon      | DGGE - Primer 5' – 3' mit GC – clamp                                                                                    | Annealing-Temp. (°C) | PCR-Produkt (bp) |
| FGFR 2 exon 1            | gcg ccg ccg gcg ccc gcg ccc gcc ccg ccg ccc ccg ccc gCTG<br>TCT CCG TCT TCT CTC<br>ATC TCA CTA CCT TTT CAC TTG          | 56                   | 421              |
| FGFR 2 exon 7            | gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg gcg cgg cgg gcg ggg cgg<br>ggg gTC TCT CAT TCT CCC ATC CC<br>GAA GGA GAC CCC AGT TGT G  | 61                   | 336              |
| FGFR 2 exon 7            | GTC TCT CAT TCT CCC ATC CC<br>gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg gcg cgg cgg gcg ggg cgg<br>ggg gGA AGG AGA CCC CAG TTG TG | 61                   | 336              |
| FGFR 2 exon 9            | gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg gcg cgg cgg gcg ggg cgg<br>ggg gCC CTC CAC AAT CAT TCC T<br>CCC AGA GAG AAA GAA CAG TA  | 63                   | 307              |
| FGFR 3 exon 7            | gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg gcg cgg cgg gcg ggg cgg<br>ggg gTG GCG GTG GTG GTG AGG<br>CAA ATC CTC ACG CAA CCC       | 61                   | 382              |
| FGFR 3 exon 7            | GTG GCG GTG GTG GTG AGG<br>gcg ggc ggg gcg ggg gca cgg ggg gcg cgg cgg gcg ggg cgg<br>ggg gCA AAT CCT CAC GCA ACC C     | 61                   | 382              |

## **4 Methoden**

### **4.1 DNA - Präparation aus Venenblut**

Zur Präparation von DNA aus venösem Blut kamen 3 Methoden zur Anwendung, welche im Folgenden beschrieben werden.

#### **4.1.1 Phenolextraktion**

##### **Vorbemerkungen:**

Um DNA aus Blut zu extrahieren, müssen zunächst die kernhaltigen Lymphozyten von den kernlosen Erythrozyten getrennt werden. Die Trennung erfolgt durch Zentrifugation in physiologischem Puffer. Nach dem Entfernen der Erythrozyten müssen die Zellmembranen der Lymphozyten zerstört werden, um die DNA-haltigen Zellkerne zu isolieren. Ein hyperosmolarer Kernextraktionspuffer führt diesen Schritt aus, indem er die Zellmembranen aufplatzen läßt. Um nun an die DNA im Kerninneren zu gelangen, werden im nächsten Schritt die Kernmembranen durch einen Extraktionspuffer unter Zugabe von SDS zerstört. Durch die darauffolgende Phenol-Chloroform-Extraktion können Proteine aus Nukleinsäurelösungen entfernt werden, ohne die Nukleinsäuren selbst anzugreifen. Ist die DNA nach der Phenol-Chloroform-Extraktion von fremden Proteinen befreit, wird sie einer alkoholischen Fällung unterzogen. Dabei lagert sich ein Salz (Natriumacetat) an die Hydrathülle der DNA an, während Alkohol (100 % bzw. 70 % Ethanol) diese verdrängt. Durch die fehlende Hydrathülle fällt die DNA aus. Nach dem Entfernen des Alkohols kann das DNA-haltige Pellet resuspendiert werden (W.M.Strauss in Current Protocols in Molecular Biology, Vol 1).

##### **Durchführung:**

- 5 ml EDTA- Blut wurden in 50 ml Reaktionsgefäße verbracht, mit HBSS („Hank's Buffered Salt Solution“) auf 40 ml aufgefüllt, und 10 min bei 1500 U/min zentrifugiert. Der Überstand wurde kurz oberhalb der Interphase abgenommen und verworfen. Es folgte die Zugabe von 15 ml Kernextraktionspuffer und das dreimalige kräftige Schütteln

(„vortexen“) der Proben. Danach wurden die Ansätze auf Eis gestellt. Nach erneutem Zentrifugieren für 10 min bei 2500 U/min und Verwerfen des Überstandes wurde das verbleibende Pellet bei  $-80^{\circ}\text{C}$  über Nacht tiefgefroren. Nach dem Auftauen wurden je 237,5  $\mu\text{l}$  DNA- Extraktionspuffer und 12,5  $\mu\text{l}$  20% iges SDS zugegeben. Die Proben inkubierten für 3 h bei  $50^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad . Zum Denaturieren von Proteinen wurden die Gemische nach Zugabe von je 500  $\mu\text{l}$  (1Volumen) Phenol für 30 min auf der Mischwippe geschwenkt, der Überstand nach dem Zentrifugieren für 10 min bei 2500 U/min in mit 500  $\mu\text{l}$  Phenol-Chloroform gefüllte Reaktionsgefäße gegeben und die Gemische erneut für 20 min auf der Mischwippe geschwenkt. Nach Zentrifugation der Probengemische für 10 min bei 13000 U/min befanden sich die denaturierten Proteine zwischen der wässrigen und der Phenol-Chloroform-haltigen Interphase, während die DNA in der oberen wässrigen Phase gelöst war. Der abgenommene DNA-haltige Überstand wurde in je eines der mit 500  $\mu\text{l}$  Chloroform vorbereiteten Reaktionsgefäße verbracht, um Reste des Phenol zu entfernen, welche die Enzyme bei einer späteren Polymerase-Ketten-Reaktion stören könnten. Dann wurden die Proben für 20 min auf der Mischwippe geschwenkt und 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert. Anschließend wurden die Ansätze durch die im Folgenden beschriebenen Reagenzien einer alkoholischen Fällung unterzogen: Mit 1 ml eines Natriumacetat/Äthanol (100 %) – Gemisches („Zeitsparalkohol“) versetzt, fiel die DNA beim Schwenken in der Hand aus. Zentrifugieren und Dekantieren des Überstandes ergaben ein Pellet, welches mit 200  $\mu\text{l}$  70 %igem Ethanol gewaschen, 10 min bei 13000 U/min zentrifugiert und danach getrocknet wurde, bis das Äthanol sich verflüchtigt hatte. Das Pellet wurde nach Zugabe von 200  $\mu\text{l}$  1x TE + RNase über Nacht im  $50^{\circ}\text{C}$  Wasserbad resuspendiert.

#### 4.1.2 „Mini Phenolextraktion“

EDTA-Blut wurde bei 6000 U/min für 10 min zentrifugiert und je 200  $\mu\text{l}$  Buffy Coat in 2 ml Reaktionsgefäße gefüllt. Nach Zugabe von je 800  $\mu\text{l}$  STE-Extraktionspuffer, welchem zuvor 20% SDS (Endkonzentration 0,5%) und Proteinase K (Endkonzentration 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) zugesetzt wurde und wiederholtem Invertieren der Proben, inkubierten diese für 3 h bei  $80^{\circ}\text{C}$  im Wasserbad. Den auf Eis abgekühlten Proben wurden nun je 400  $\mu\text{l}$  Phenol zugegeben und diese wiederum invertiert. Nach kurzem Herunterzentrifugieren erfolgte die Zugabe von 400  $\mu\text{l}$  Chloroform und erneutes Invertieren. Die Proben wurden danach für 5 min bei 13000 U/min und  $4^{\circ}\text{C}$  zentrifugiert. Nach Abnahme der oberen DNA-haltigen Phase wurde diese mit

800 µl Chloroform reextrahiert und danach 10 min auf der Mischwippe geschwenkt. Die Proben wurden jetzt erneut für 5 min bei 4°C und 13000 U/min zentrifugiert und wiederum die obere DNA-haltige Phase abgenommen. Danach wurde die DNA einer alkoholischen Fällung unterzogen ( 4.1.1) und das erhaltene Pellet nach Trocknung in 1x TE über Nacht im 50°C Wasserbad resuspendiert.

#### 4.1.3 DNA Extraktion mit Kit

##### **Vorbemerkungen:**

Für diese Form der DNA-Extraktion wurde der Nucleon Extraktionskit BACC 2 (siehe Material) der Firma Amersham verwendet. Dieser Kit beinhaltet im Wesentlichen die Reagenzien, welche bei den beiden anderen Extraktionsmethoden verwendet wurden. Da die Haltbarkeit der DNA nach Extraktion mit einem Kit jedoch zweifelhaft erschien, wurde diese Extraktionsmethode nach einiger Zeit eingestellt. Die Durchführung folgte den Angaben des Herstellers.

##### **Durchführung:**

2,5 ml EDTA-Blut wurden in 50 ml Reaktionsgefäße verbracht und nach Zugabe von 4 Volumen Reagenz A für 4 min auf der Mischwippe geschwenkt. Nach dem Zentrifugieren für 5 min bei 6000 U/min wurde der Überstand bis auf das Pellet vorsichtig abgenommen und verworfen. Danach wurden dem Pellet je 2 ml Reagenz B zugegeben und die Proben kurz zum Lösen desselben kräftig geschüttelt („gevortext“). Der folgende Schritt, die Zugabe von 15 µl einer 50 µg/ml RNase-Lösung mit anschließender Inkubation im 37°C Wasserbad für 30 min, konnte nach Angaben des Herstellers wahlweise durchgeführt werden. Ein Weglassen führte zu keiner geringeren Ausbeute!

Den Probengemischen wurden nun je 500 µl Sodium Perchlorat zugegeben und diese mehrmals invertiert. Das Sodium Perchlorat zerstörte hierbei, ähnlich dem Phenol, störende Proteine. Der Zugabe von je 2 ml Chloroform mit erneutem Invertieren und je 300 µl Nucleon Resin folgte, ohne die Phasen zu mischen, ein Zentrifugationsschritt für 3 min bei 6000 U/min. Der abgenommene Überstand wurde wiederum einer alkoholischen Fällung unterzogen (4.1.1).

## 4.2 Polymerasekettenreaktion (PCR)

### **Vorbemerkungen:**

Die PCR (Saiki et al., 1988) ist mittlerweile eine Standardmethode in der Molekularbiologie. Sie wurde in der vorliegenden Arbeit als Methode für folgende weiterführende Untersuchungen verwendet:

- ◆ Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP)
- ◆ Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)
- ◆ Mutationsanalysen mittels Verdau durch spezifische Restriktionsendonucleasen
- ◆ Sequenzierung definierter DNA-Abschnitte

Die PCR dient der Amplifikation einer definierten DNA-Sequenz *in vitro*.

Grundvoraussetzung für die Anwendung dieser Methode ist das Vorhandensein bekannter Sequenzen, die antiparallel liegen und den zu amplifizierenden Bereich einschließen. Anhand der Nukleotidabfolge dieser Randsequenzen müssen einzelsträngige Oligonukleotide (15-30 Nukleotide) konstruiert werden, die der DNA-abhängigen-Polymerase als Startsequenz, sogenannte Amplimere oder Primer, für die Reaktion dienen. Diese Primer binden komplementär an den DNA- Abschnitt, der als Zielsequenz amplifiziert werden soll. Bei der Auswahl der Primer müssen bestimmte Kriterien berücksichtigt werden (Sambrook et al., 1989; Newton et al., 1994):

- Weitgehende Übereinstimmung der Dissoziationstemperatur beider Primer.
- Keine komplementären Basen am äußeren 3'-Ende beider Primer, da diese sonst Dimere untereinander bilden können.
- Keine umfangreichen tandemförmigen Wiederholungen von einem oder mehreren Nukleotiden.
- Keine Bildung von Sekundärstrukturen auf Grund sterischer Hemmung der Anlagerung.

DNA-Polymerasen besitzen die Fähigkeit, zu einem vorhandenen DNA-Einzelstrang einen komplementären Strang aufzubauen, wobei Voraussetzung ist, dass der Einzelstrang in

einem kurzen Bereich, dem Primerbereich, bereits doppelsträngig vorliegt. Die Ziel-DNA (Template) kann unterschiedlicher Herkunft sein und in Form genomischer DNA, cDNA oder klonierter DNA eingesetzt werden. Im ersten Schritt wird die doppelsträngige DNA durch Erhitzen bei etwa 93-95°C in ihre komplementären Einzelstränge aufgetrennt, die nun als Matrize dienen. Gleichzeitig dient dieser einmalige Denaturierungsschritt der Aktivierung der Taq-Polymerase. In einem zweiten Schritt lagern sich die Primer bei einer für jedes Primerpaar spezifisch ermittelten „Anlagerungstemperatur“ („annealing“-Temperatur) im Bereich zwischen 50 und 70°C an ihren komplementären Bereich der DNA-Einzelstränge antiparallel an. Die „annealing-Temperatur“ sollte unterhalb der Schmelztemperatur der Primer liegen, aber hoch genug sein, dass die Primer an ihre spezifische Zielsequenz binden. Dies ist der Schritt der Renaturierung. Eine thermostabile DNA-Polymerase, welche auch Temperaturen von 95°C für kurze Zeit übersteht, führt den dritten Schritt der DNA-Synthese durch, der in der Regel bei 70-75°C abläuft. Sie verlängert die Primer in 3'-Richtung komplementär zum DNA-Template. Somit entstehen zunächst zwei neue DNA-Stränge, deren 5'-Enden durch die Primer definiert werden, während die 3'-Enden eine variable Länge aufweisen. Diese neu synthetisierten Stränge werden als Template für einen nächsten Amplifikationszyklus eingesetzt. DNA-Polymerasen, deren Temperaturoptimum in den meisten Fällen zwischen 68 und 75°C liegt, entdeckte man in thermophilen Bakterien, die vorzugsweise in heißen Quellen leben. Die Standard-DNA-Polymerase, die auch heute noch am häufigsten für die PCR verwendet wird, ist die Taq-Polymerase aus *Thermophilus aquaticus* mit einem Temperaturoptimum von 72°C (Saiki et al. 1988). Der letzte Temperaturschritt des Zyklus sollte dem Temperaturoptimum der DNA-Polymerase entsprechen und der Größe der Ziel-Sequenz angepaßt sein (1 min/kb). Nach Vervollständigung der Stränge beginnt der Zyklus erneut.

Diesem PCR-Grundschemata wird häufig noch ein finaler Verlängerungsschritt (1 x 5-10 min) angehängt. Da die Aktivität der DNA-Polymerase mit zunehmender Reaktionsdauer nachläßt, kann trotz theoretischer Verdopplung der DNA pro Zyklus praktisch kein exponentieller Anstieg der DNA-Menge erreicht werden. Eine  $10^6$ - $10^7$  fache Anreicherung stellt im Allgemeinen die durchschnittliche Vermehrungsrate dar.

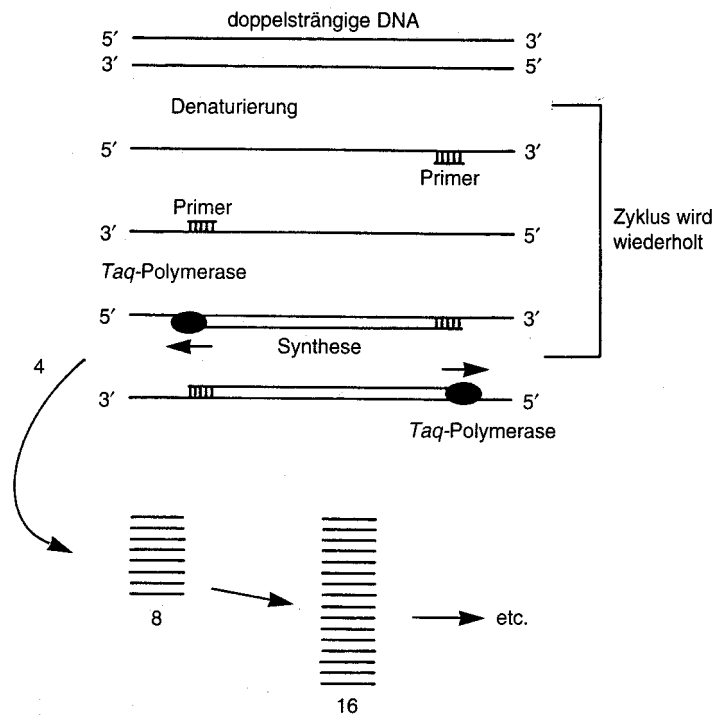


Abb. 4.2.1: Schematische Darstellung einer PCR-Reaktion (aus Nicholl, 1995)

### Durchführung:

Für einen PCR-Ansatz benötigt man neben einem Template, den Primern und der DNA-Polymerase auch einen auf das Enzym abgestimmten Puffer, sowie einen Nukleotidmix, der die vier verschiedenen Desoxynukleotridtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) enthält. Diese einzelnen Komponenten wurden in den für die Reaktion optimalen Konzentrationen in ein Reaktionsgefäß verbracht. Bei der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich 20- oder 100 µl-Ansätze für die PCR verwendet.

*Reaktionsansatz für 20 µl:*

1 µl DNA-Template(40µg/ml)  
4 µl Nukleotidmix = Kalt-Mix (je 1,25 mM dATP, dCTP, dGTP, dTTP)  
2 µl 10x *Taq*-Polymerase-Puffer  
1 µl Primer A (15 pmol/µl)  
1 µl Primer B (15 pmol/µl)  
0,1 µl *Taq*-Polymerase (bzw. nach Angaben des Herstellers)  
ad 20 µl ddH<sub>2</sub>O

Die Reaktion wurde entweder in speziellen PCR-Gefäßen oder in Mikrotiterplatten angesetzt. Die kommerziell bezogenen *Taq*-Polymerasen wurden den firmeneigenen Anleitungen entsprechend eingesetzt. Die Reaktion startete in einem "Thermocycler", der eine zyklische Abfolge der einzelnen Reaktionsschritte erlaubt. Bei Benutzung eines Thermocyclers ohne beheizbaren Deckel wurde der Reaktionsansatz mit Mineralöl überschichtet. Dies verhinderte die Verdunstung der Probe und gewährleistete ihren Verbleib im Reaktionsgefäß. Durch die Zugabe weiterer Chemikalien wie DMSO, MgCl<sub>2</sub> oder Betain konnte in einigen Fällen eine Erhöhung der PCR-Produktmenge erreicht, sowie die Synthese unspezifischer Amplifikate verhindert werden. Die optimalen Konzentrationen dieser Chemikalien mußten jedoch für jedes Primerpaar neu abgestimmt werden. Der Reaktionszyklus wurde ca. 25-35 mal wiederholt.

Nach Beendigung der PCR wurden pro Ansatz 2 µl 10 x TBE-Auftragspuffer zugegeben. Die Längen und Konzentrationen der PCR-Produkte wurden mittels Gelelektrophorese überprüft. Die dabei möglicherweise auftretenden zusätzlichen fehlerhaften Banden konnten auf eine zu hohe oder zu niedrige „annealing-Temperatur“ hinweisen. Dies konnte meist durch schrittweises Erhöhen oder Erniedrigen der Temperatur korrigiert werden. In einigen Fällen war die fehlerhafte Primergestaltung ein weiterer Grund für solche Banden.

4.2.1 Exon 7 von FGFR 2

Es wurden 20 µl Ansätze pipettiert. Das PCR-Programm für die Amplifikation des gesamten Exons bestand aus einem einmaligen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min, 35 Zyklen Denaturierung (30 sec bei 94 °C), „annealing“ (30 sec bei 61 °C) und Verlängerung (30 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (7 min bei 72 °C).

Für die Amplifikation des vorderen Teils von Exon 7 wurde den PCR-Ansätzen je 1 mM  $\text{MgCl}_2$  zugesetzt und das folgende Programm gewählt: Einmaliger Denaturierungsschritt für 3 min bei 94 °C, 35 Zyklen Denaturierung (1 min bei 94 °C), „annealing“ (1 min bei 59 °C) und Verlängerung (1 min bei 72 °C), gefolgt von einer finalen Verlängerung von 7 min bei 72 °C. Die zur Amplifikation verwendeten Primer wurden in 3.7 beschrieben.

Beide Fragmente wurden zunächst durch SSCP-Analyse untersucht (4.2.11 bzw. 4.3.3). Die Gelläufe wurden für die Dauer von 24 h bei 5°C und 450 Volt im Kühlraum durchgeführt.

#### 4.2.2 Exon 9 von FGFR 2

Zur Amplifikation dieses Exons wurden ausschließlich die von Steinberger et al. (1998) beschriebenen Primer verwendet (3.7). Die Amplifikation in der PCR erfolgte nach diesen Bedingungen (Steinberger et al., 1998):

Einmaliger Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min, 30 Zyklen Denaturierung (30 sec bei 94 °C), „annealing“ (1 min bei 63 °C) und Verlängerung (30 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (10 min bei 72 °C).

Den 20 µl PCR-Ansätzen wurde je 1mM  $\text{MgCl}_2$  zugesetzt.

Die Bedingungen für die SSCP-Analyse entsprechen denen von Exon 7 von FGFR 2.

#### 4.2.3 Exon 5 von FGFR 1

Die Amplifikation des Fragments erfolgte in 20 µl Ansätzen nach folgenden Bedingungen: Einmaliger Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min, 30 Zyklen Denaturierung (45 sec bei 92 °C), „annealing“ (1 min bei 64 °C) und Verlängerung (30 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (10 min bei 72 °C).

Die Primersequenzen (3.7), sowie die PCR-Bedingungen wurden bereits von Muenke et al., 1994 publiziert. Die Untersuchung des Fragments mit Hilfe der SSCP-Analyse erfolgte, wie bereits für die vorhergehenden Fragmente beschrieben.

#### 4.2.5 Exon 7 von FGFR 3

Für die PCR wurden zunächst die von Bellus et al. (1996) publizierten Primer verwendet (3.7). Die Amplifikation erfolgte leicht abweichend von den publizierten Bedingungen nach folgendem PCR-Programm:

Einmaliger Denaturierungsschritt bei 94 °C für 5 min, 35 Zyklen Denaturierung (30 sec bei 94 °C), „annealing“ (45 sec bei 62 °C) und Verlängerung (45 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (10 min bei 72 °C).

Zur Amplifikation wurden der Taq-Polymerase der Firma Qiagen 4 µl der mitgelieferten Q-Solution zugegeben. Generell konnten mit dieser Taq-Polymerase und den dazugehörigen Lösungen störende Zusatzbanden in der PCR häufig entfernt werden.

Da das Fragment für die SSCP-Analyse zu groß war, mußte es mit Hilfe neu entworfener Primer in zwei kleinere Hälften geteilt werden. Die neu entworfenen Primerpaare sind in 3.7 angegeben. Das Exon konnte so in zwei 146 bp bzw. 198 bp große Anteile geteilt werden. Die Amplifikation mit den neuen Primern wurde sowohl mit genomischer DNA, als auch als „genestete PCR“ durchgeführt (4.2.10), bei der das zunächst erhaltene Amplifikat als Template für zwei neue PCR-Reaktionen diente. Der Vergleich nach Austestung auf einem 1 %igen Agarosegel zeigte jedoch wesentlich bessere Ergebnisse bei der „genesteten PCR“. Die Amplifikation folgte diesen Bedingungen:

Für die erste Hälfte von Exon 7: Einmaliger Denaturierungsschritt bei 94 °C für 5 min, 35 Zyklen Denaturierung (30 sec bei 94 °C), „annealing“ (45 sec bei 66,7 °C) und Verlängerung (45 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (10 min bei 72 °C). Für die zweite Hälfte von Exon 7: Einmaliger Denaturierungsschritt bei 94 °C für 5 min, 30 Zyklen Denaturierung (30 sec bei 94 °C), „annealing“ (45 sec bei 60 °C) und Verlängerung (45 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (10 min bei 72 °C).

Die Teilfragmente wurden danach mit Hilfe der SSCP-Analyse (4.3.3) untersucht. Dabei wurden in beiden Fällen die gleichen Laufbedingungen gewählt: Die Elektrophoresedauer betrug 6,5 h bei Raumtemperatur und 650 Volt.

Für den Restriktionsverdau wurde das Fragment mit den von Reardon et al. (1997) publizierten Primern (3.7) in der PCR nach den in 4.8 beschriebenen Bedingungen amplifiziert.

Die Amplifikation wurde auch hier mit der Taq-Polymerase der Firma Qiagen unter Zusatz von 4 µl Q-Solution durchgeführt. Zur Bestätigung einer Mutation wurde das Fragment im

Anschluß an den Verdau sequenziert (4.3.2; 4.6). Für die Sequenzierung wurde das gesamte Fragment mit neu entworfenen Primern amplifiziert (3.7). Die Amplifikationsbedingungen waren: Einmaliger Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min, 35 Zyklen Denaturierung (30 sec bei 94 °C), „annealing“ (1 min bei 61 °C) und Verlängerung (15 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (5 min bei 72 °C).

Für die Amplifikation wurde die Taq-Polymerase der Firma Qiagen unter Zusatz von 2 µl Q-Solution verwendet. Die Sequenzierung wurde entweder radioaktiv (4.6.1) oder mit fluoreszierenden Primern (4.6.2) am automatischen Sequenziergerät durchgeführt.

#### 4.2.5 Exon 9 von FGFR 3

Zunächst erfolgte die Amplifikation des Fragments mit den in 3.7 angegebenen Primern. Das PCR-Programm bestand aus einem einmaligen Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min, 30 Zyklen Denaturierung (30 sec bei 94 °C), „annealing“ (30 sec bei 67 °C) und Verlängerung (30 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (5 min bei 72 °C).

Den 20 µl PCR-Ansätzen wurden jeweils 2 mM MgCl<sub>2</sub> und 10 % DMSO zugegeben. Es wurde die Taq-Polymerase der Firma Qiagen unter Zugabe von 4 µl Q-Solution und 1 mM MgCl<sub>2</sub> benutzt. Bei der Untersuchung mittels SSCP-Analyse wurden 24 h Elektrophoresedauer bei 450 Volt und 5 °C gewählt.

#### 4.2.6 Exon 10 von FGFR 3

Zur Amplifikation diente dieses PCR-Programm mit den in 3.9 angegebenen Primern: Einmaliger Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min, 35 Zyklen Denaturierung (30 sec bei 94 °C), „annealing“ (30 sec bei 66 °C) und Verlängerung (30 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (5 min bei 72 °C).

Für die Amplifikation wurde die Taq-Polymerase der Firma Qiagen unter Zusatz von 1 mM MgCl<sub>2</sub> und 2 µl Q-Solution verwendet.

Für die SSCP-Analyse betrug die Elektrophoresedauer 10 h bei Raumtemperatur und 650 Volt.

#### 4.2.7 Exon 1 von FGFR 2

Das Fragment wurde zu diesen Bedingungen mit den in 3.7 angegebenen Primern amplifiziert: Einmaliger Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min, 40 Zyklen Denaturierung (30 sec bei 94 °C), „annealing“ (30 sec bei 56 °C) und Verlängerung (30 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (7 min bei 72 °C).

#### 4.2.8 Exon 2 von FGFR 2

Das Fragment wurde in der PCR unter Zusatz von 10 % DMSO folgendermaßen amplifiziert: Einmaliger Denaturierungsschritt bei 94 °C für 5 min, 35 Zyklen Denaturierung (1 min bei 94 °C) und „annealing“ (1 min bei 55 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (7 min bei 72 °C).

Die weitere Untersuchung wurde mittels SSCP-Analyse (4.2.11; 4.3.3) durchgeführt. Die Elektrophoresedauer betrug 24 h bei 450 Volt und 5 °C.

#### 4.2.9 Exon 8 von FGFR 2

Die PCR konnte mit folgendem Programm optimiert werden:

Einmaliger Denaturierungsschritt bei 94 °C für 3 min, 30 Zyklen Denaturierung (30 sec bei 94 °C), „annealing“ (30 sec bei 58 °C) und Verlängerung (30 sec bei 72 °C), gefolgt von einem finalen Verlängerungsschritt (7 min bei 72 °C). Der Taq-Polymerase wurde 1mM  $MgCl_2$  zugesetzt. Die weitere Untersuchung erfolgte mittels SSCP-Analyse (4.2.11; 4.3.3) für die Dauer von 24 h bei 450 Volt und 5 °C.

#### 4.2.10 „genestete PCR“

Diese Weiterentwicklung der Standard-PCR wird angewendet, wenn in der PCR unspezifisch amplifizierte DNA-Fragmente nicht durch schrittweises Erhöhen oder Erniedrigen der „annealing“-Temperatur entfernt werden können. Störende fehlerhafte Amplifikate sollen bei Anwendung dieser Methode verschwinden. Hierfür wurde das durch die erste PCR erhaltene Amplifikat in verdünnter Form als Template für eine zweite PCR eingesetzt. Die für diese Reaktion neu konstruierten Primer sollten nun mit Sequenzen hybridisieren, die innerhalb des PCR-Produktes der ersten Reaktion lagen.

#### **4.2.11 PCR mit radioaktiv markiertem Nukleotid-Mix ([ $\alpha$ -<sup>32</sup>-P] dCTP)**

Bei dieser Form der PCR ändert sich, bis auf die Zusammensetzung des Nukleotid-Mixes und die Zugabe von radioaktivem [ $\alpha$ -<sup>32</sup>-P] dCTP, nichts. Das für die Kalt-PCR ausgetestete Programm, sowie die Primer, bleiben gleich. Nach Ablauf der PCR wurde das Amplifikat jedoch nicht auf einem Agarosegel aufgetrennt, sondern direkt auf ein Polyacrylamidgel (4.3.2) aufgetragen und anschließend der Autoradiographie (4.7) unterworfen. Diese Form der PCR wurde in der vorliegenden Arbeit zur Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP 4.3.3) angewendet.

*Reaktionsansatz für 20  $\mu$ l:*

1  $\mu$ l DNA-Template(40 $\mu$ g/ml)

4  $\mu$ l Nukleotidmix = Heiß-Mix (je 1,25 mM dATP, dGTP, dTTP, **0,1 mM dCTP**)

2  $\mu$ l 10x *Taq*-Polymerase-Puffer

1  $\mu$ l Primer A (15 pmol/ $\mu$ l)

1  $\mu$ l Primer B (15 pmol/ $\mu$ l)

0,5  $\mu$ l *Taq*-Polymerase

**0,1  $\mu$ l [ $\alpha$ -<sup>32</sup>-P] dCTP**

ad 20  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O

#### **4.2.12 Auswahl geeigneter Startersequenzen (Primer) zur Durchführung der PCR**

Die Primer, die in dieser Arbeit Verwendung fanden, wurden, sofern sie nicht bereits publiziert waren, mit Hilfe des Computerprogramms OLIGO™, bzw. mit dem Programm DNA-Star™, ausgewählt. Diese Programme sind speziell für die Primerkonstruktion entwickelt und berücksichtigen dementsprechend die bereits genannten Kriterien. DNA-Star™ wählt erfahrungsgemäß bessere Primer aus, gibt jedoch im Gegensatz zu OLIGO™ keine PCR-Bedingungen an.

### **4.3 Gelelektrophoretische Auftrennung von Nukleinsäuren**

Die Gelelektrophorese ermöglicht die Trennung unterschiedlich großer, geladener Moleküle im elektrischen Feld. DNA besteht aus Nukleotiden mit negativ geladenen Phosphatgruppen und wandert daher im elektrischen Feld von der Kathode zur Anode. Gelöste DNA-Moleküle unterschiedlicher Größe können so, dem Logarithmus ihrer Länge entsprechend, aufgetrennt werden. Als elektrisch neutrale dreidimensionale Trägermatrix dienen Agarose- oder Polyacrylamidgele unterschiedlicher Konzentration. Durch sie entsteht ein Porensystem, welches die DNA-Moleküle ihrer Größe entsprechend auftrennt.

Ihre Laufgeschwindigkeit wird dabei durch Molekülgröße, Gelkonzentration, Zusammensetzung des Laufpuffers, DNA-Konformation (supercoiled, ringförmig, linear) und die Höhe der angelegten Spannung beeinflusst.

In dieser Arbeit wurden die Agarosegel-, Polyacrylamidgel- und Denaturierende Gradienten Gelelektrophorese (DGGE) durchgeführt.

#### **4.3.1 Agarose-Gelelektrophorese**

##### **Vorbemerkungen:**

Mit der Agarose-Gelelektrophorese können DNA-Moleküle im Bereich von 50-20000 bp aufgetrennt werden. Größere Moleküle werden nicht aufgelöst und wandern in einer „Kompressionszone“.

Der prozentuale Anteil der Agarose bestimmt die Porengröße der Gelmatrix. Hochprozentige Gele dienen der Auftrennung besonders kleiner Fragmente. Um eine erfolgreiche Auftrennung zu detektieren, wird der Agaroselösung Ethidiumbromid zugefügt. Dies ist ein stark mutagener fluoreszierender Farbstoff, welcher sich durch seine aromatische Struktur bevorzugt parallel zwischen benachbarte Basen einlagert und so ausschließlich in die DNA interkaliert (Singer und Berg, 1992). Bei Bestrahlung mit UV-Licht (254 und 300 nm) emittiert der Ethidiumbromid-Nucleinsäure-Komplex orangefarbiges Licht im sichtbaren Bereich (500-590 nm). Die Intensität des emittierten Lichtes ist proportional zur Menge der in die DNA eingelagerten Ethidiumbromid-Moleküle.

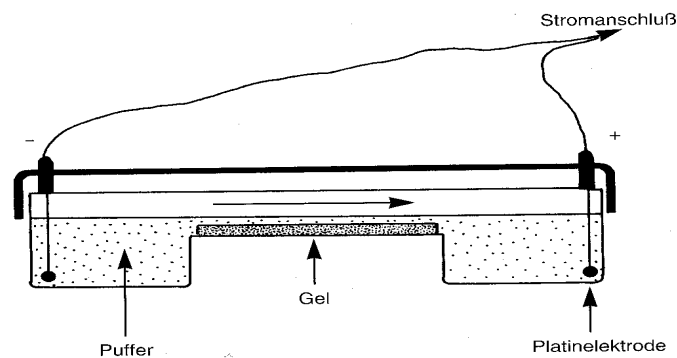
Sie läßt daher auf die DNA-Konzentration schließen. Zusätzlich im Gel aufgetrennte DNA-Größenstandards bekannter Konzentration dienen der Längen- und Konzentrationsabschätzung der einzelnen Fragmente. Unterschiedliche Agarosekonzentrationen ermöglichen eine besonders gute Auftrennung definierter DNA-Größenbereiche (Sambrook et al., 1989).

| Agarosekonzentration im Gel (%) | DNA-Molekülgröße (bp) |
|---------------------------------|-----------------------|
| 0,6                             | 1000-20000            |
| 1,2                             | 400-6000              |
| 1,5                             | 200-3000              |
| 2,0                             | 100-2000              |

*Tabelle 4.3.1.1*

Die Pufferlösung, in der die Elektrophorese stattfindet, sollte einen konstanten pH-Wert aufweisen. Hierfür eignen sich TBE oder TAE, welche Tris enthalten und einen pH-Wert von 8 besitzen. TBE eignet sich dabei auf Grund der höheren Pufferkapazität insbesondere für lange Gelläufe.

In der vorliegenden Arbeit wurden 1-2 %ige Gele verwendet. Die Größe der aufzutrennenden Fragmente lag überwiegend im Bereich zwischen 100 und 600 bp.



*Abb. 4.3.1.1: Agarosegelelektrophorese.*

**Durchführung:**

Die gewünschte Pufferkonzentration von 1x TBE (1x TAE) wurde aus 10x TBE (10x TAE) hergestellt und die eingewogene Agarose darin durch kurzes Aufkochen gelöst. Der noch flüssigen Agarose wurde nun zunächst 0,5-1 µg/ml Ethidiumbromid zugefügt, bevor sie in eine Flachbett-Gelapparatur, den sogenannten „Gelschlitten“ gegossen wurde. Durch Einstecken eines PVC-Kammes in die Agaroselösung entstanden kleine, gleichmäßig angeordnete Aussparungen, die Geltaschen. Die DNA-Proben wurden vor dem Einbringen in die Geltaschen mit 1/10 Vol blauem 10x TBE (TAE) Auftragspuffer versetzt. Die blaue Farbe ergab sich durch die Zugabe von Bromphenolblau und Xylencyanol zur Pufferlösung. Dadurch konnte einerseits der Verlauf der Gelelektrophorese überwacht werden, andererseits wurde ein Herausdiffundieren der Proben aus den Taschen verhindert. Bromphenolblau wandert mit doppelsträngiger DNA von 100 bp Länge, Xylencyanol mit DNA von 5000 bp Länge.

Die Elektrophorese wurde bei 70-90 Volt durchgeführt. Nach deren Abschluß wurden die Gele zur Dokumentation mit dem Bioprint-System auf dem UV-Transilluminator photographiert.

4.3.2 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)**Vorbemerkungen:**

Polyacrylamidgele werden vor allem bei der gelelektrophoretischen Auftrennung von besonders kleinen DNA-Fragmenten oder bei der Sequenzierung eingesetzt. Die Erklärungen zur Agarose-Gelelektrophorese treffen auch hier zu. Im Gegensatz zu Agarosegelen, bei denen nur die Agarosekonzentration die Porengröße angibt, wird diese bei der Polyacrylamid-Gelmatrix durch die Polyacrylamidkonzentration und den Vernetzungsgrad bestimmt. Dabei werden die beiden Komponenten der flüssigen Acrylamid/N,N'-Methylenbisacrylamidlösung ein Netzwerk ausbilden und durch freie Radikale, welche von Ammoniumpersulfat (APS) geliefert und von TEMED stabilisiert werden, polymerisieren. Die DNA wird außerdem durch den im Gel enthaltenen Harnstoff in einer Konzentration von 7 M denaturiert und an der Ausbildung von Sekundärstrukturen gehindert, so dass sie als entfalteter Einzelstrang durch

das elektrische Feld wandert. Der Harnstoff bewirkt dies durch seine Eigenschaft, Wasserstoffbrücken zu brechen. Die Auftrennung richtet sich damit nur noch nach der Fragmentgröße, nicht mehr nach der DNA-Konfiguration (supercoiled, ringförmig, linear). Das ist für die Sequenzierung besonders wichtig, da hier die Trennung von Fragmenten angestrebt wird, welche sich in der Länge um nur eine Base unterscheiden. Unterschiedliche Acrylamidkonzentrationen erlauben dabei eine besonders gute Auftrennung verschieden großer DNA-Moleküle (Sambrook et al., 1989).

| Acrylamidkonzentration im Gel (%) | DNA-Molekülgröße (bp) |
|-----------------------------------|-----------------------|
| 3,5                               | 1000-2000             |
| 5,0                               | 80-500                |
| 15                                | 25-150                |
| 20                                | 6-100                 |

*Tabelle 4.3.2.1*

In dieser Arbeit wurden 6-8 %ige Gele verwendet.

### **Durchführung:**

Die verwendeten Glasplatten wurden mit Detergenz, ddH<sub>2</sub>O und Ethanol gründlich gereinigt. Da sich das Gel nach erfolgter Gelelektrophorese von der kürzeren Platte lösen und an der längeren haften sollte, wurde die kürzere Platte mit Acrylease®, die längere mit Sigmacote® behandelt. Beide Substanzen sind wasserabweisend, Acrylease® jedoch stärker als Sigmacote®, damit sich das Gel später von der kürzeren Glasplatte löst. Danach wurden die Glasplatten, durch drei 0,4 mm-Abstandhalter („Spacer“) getrennt, aufeinandergelegt und mit mehreren Metallklammern fixiert. Zwei „Spacer“ begrenzten dabei das Gel vertikal, einer horizontal. Zu ca. 60-70 ml der vorbereiteten Gellösung wurden 400 µl 10 %iges APS und 30 µl TEMED pipettiert. Da die Polymerisierungsreaktion durch die Zugabe des TEMED gestartet wird, mußte das Gel nun zügig, mit Hilfe einer 25 ml Glaspipette, zwischen die schräggestellten Glasplatten gegossen werden. Um eine abschließende gerade Front am oberen Rand des Gels zu bekommen, wurden zwei "Haifischkämme" mit der geraden Rückseite zuerst zwischen die Glasplatten in die Gellösung gesteckt. Das Auspolymerisieren benötigte mindestens 2-3 Stunden, vorzugsweise eine Nacht. Das Gel wurde dazu in feuchte Tücher und Klarsichtfolie eingepackt, um Eintrocknen zu verhindern.

Vor der Elektrophorese wurden die Klammern und der untere horizontale "Spacer" entfernt, sowie die "Haifischkämme" gezogen, von Gelresten befreit und mit den Zacken voran in die gerade Gelfront gesteckt. In die dadurch gebildeten Zwischenräume ("slots") wurden später die Proben aufgetragen. Vorher sollte das Gel in die Elektrophoresekammer eingespannt und die beiden Puffertanks mit 1 x TBE bzw. 0,6 x TBE gefüllt werden. Es folgte ein ca. 30 minütiger Vorlauf bei 60 W Leistung, um das Gel zu erwärmen. In der Zwischenzeit wurden die Proben mit blauem Stop-Puffer versetzt und 2-5 min bei 94°C denaturiert. Die Slots konnten nun mit 1 x TBE (0,6 x TBE) ausgespült und mit den Proben beschickt werden. Die Gelelektrophorese, deren Verlauf anhand des Blaumarkers verfolgt werden konnte, dauerte je nach Größe der Fragmente ca. 3-4 Stunden bei 60 W Leistung, bzw. 24 h bei 450 Volt.

Nach Beendigung der Gelelektrophorese wurden die Glasplatten aus der Elektrophoresekammer genommen und voneinander getrennt. Das Gel wurde 2-5 min in 10 %iger Essigsäure von Harnstoff befreit und fixiert, auf Whatman-Papier transferiert, mit Klarsichtfolie abgedeckt und ca. 30-45 min auf dem Geltrockner bei 70°C getrocknet. Nach Ablauf dieser Zeit wurde die Folie entfernt und ein Röntgenfilm auf das getrocknete Gel gelegt, welches so der Autoradiographie unterzogen wurde.

Gele für das automatische Sequenziergerät („Sequencer“) unterschieden sich in ihrer Anfertigung nur durch den etwas höheren Arbeitsaufwand bei der Reinigung der Glasplatten von den Gelen für die radioaktive Sequenzierung. Außerdem wurden für diese Gele filtrierte Chemikalien verwendet, um eine Verschmutzung der Gellösung mit ungelösten Bestandteilen zu verhindern. Vor der Elektrophorese wurden hier die Glasplatten zusätzlich von aussen gereinigt, so dass beim Lesen durch den Laser keine Fehler durch Verschmutzung auftreten konnten.

### 4.3.3 Analyse von Einzelstrang-Konformationspolymorphismen (SSCP)

#### Vorbemerkungen:

Die SSCP bietet die Möglichkeit, Mutationen in definierten DNA-Abschnitten zu detektieren, wobei Art und Position der Mutation nicht angezeigt werden (Sheffield et al., 1993). Ein großer Vorteil dieser Methode ist die einfache Handhabung. Einzelsträngige DNA neigt zur Rückfaltung und Ausbildung von Sekundärstrukturen, welche durch Wasserstoffbrücken stabilisiert werden. Werden diese Einzelstränge auf ein nichtdenaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen, hängt das elektrophoretische Wanderungsverhalten nicht nur von der Länge der Molekülkette ab, sondern auch von deren Konformation (Orita et al., 1989; Strachan und Read, 1996). Diese wird von der DNA-Sequenz bestimmt. Mutierte DNA wird daher ein anderes Laufverhalten im Gel zeigen als die vergleichbare DNA vom Wildtyp. Wird die DNA vor dem Auftrag auf das Gel radioaktiv markiert und denaturiert, zeigt sich dieser Unterschied in der Mobilität auf dem Autoradiogramm als zusätzliche Bande („band-shift“). Die SSCP-Analyse weist eine Empfindlichkeit von ca. 70 % auf und eignet sich nicht für Fragmente >200 bp (Sheffield et al., 1993).

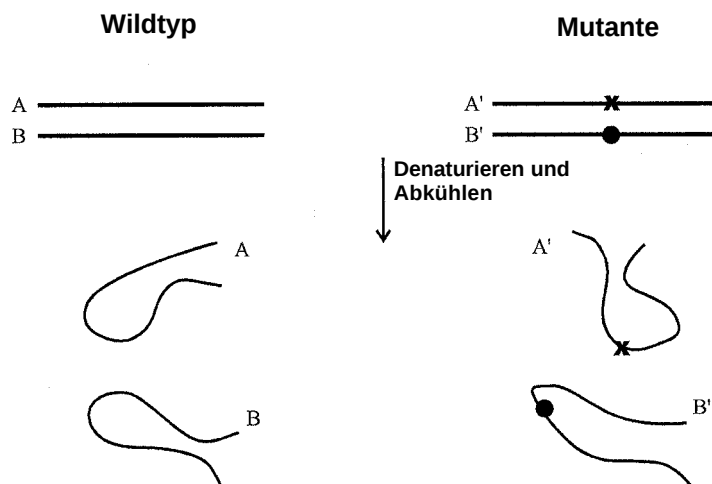


Abb. 4.3.3.1: Schematische Darstellung der SSCP-Analyse (modifiziert aus Cotton, 1997)

**Durchführung:**

Für die Vorbereitung der Proben wurde zunächst eine „Heiß-PCR“ für einen definierten DNA-Abschnitt durchgeführt (4.2.11). Dabei soll sich radioaktives [ $\alpha$ - $^{32}$ -P]dCTP (10  $\mu$ Ci/ $\mu$ l) in die DNA einbauen und diese so markieren. Die Reaktion wurde nach der PCR mit 1/3 Vol denaturierendem blauem Auftragspuffer gestoppt, 2-5 min bei 94°C denaturiert und danach auf Eis gestellt. Das Anfertigen des nichtdenaturierenden Polyacrylamidgels erfolgte wie in 4.3.2 beschrieben, als Gelmatrix wurde jedoch MDE®-Gellösung oder Serdo®-Gel verwendet. Außerdem handelte es sich bei dem hier verwendeten Laufpuffer um 0,6x TBE. Nach dem Einspannen des Gels in die Elektrophoresekammer und dem Spülen der Slots wurden die Proben aufgetragen und eine Spannung von 450-650 Volt angelegt. Ein Vorwärmen des Gels war nicht notwendig. Die Elektrophorese wurde entweder bei Raumtemperatur oder bei 5°C im Kühlraum durchgeführt und richtete sich nach folgenden Bedingungen:

| <b>Elektrophoresebedingungen bei 5°C</b> | <b>Elektrophoresebedingungen bei Raumtemperatur</b> |
|------------------------------------------|-----------------------------------------------------|
| 0,6x TBE                                 | 0,6x TBE                                            |
| 450 Volt                                 | 650 Volt                                            |
| 24-30 h Laufzeit                         | 6-10 h Laufzeit                                     |

Die optimalen Laufbedingungen wurden für jedes Fragment individuell ermittelt. Da es sich um nichtdenaturierende Gele handelte, welche keinen Harnstoff enthielten, entfiel die Fixation in 10 %iger Essigsäure. Das Gel wurde nach abgeschlossener Elektrophorese sofort auf ein Whatman-Filterpapier transferiert und auf dem Gelrockner getrocknet. Auf das getrocknete Gel wurde ein Röntgenfilm aufgebracht und beides in einer Röntgenkassette der Autoradiographie unterzogen.

#### 4.3.4 Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE)

##### Vorbemerkungen:

Die DGGE ist neben der SSCP eine weitere Methode zur Detektion von Mutationen (Fisher und Lerman, 1979). Wie bei der SSCP kann mit der DGGE nur festgestellt werden, ob eine Mutation vorliegt, jedoch keine Aussage über ihre Position oder Art gemacht werden (Sheffield et al., 1993). Das Prinzip der DGGE beruht darauf, doppelsträngige DNA in einem Elektrophoresegel wandern zu lassen, welches in wachsender Konzentration ein denaturierendes Agens enthält. Bei diesem Agens handelt es sich meist um Harnstoff, es kann jedoch auch eine leicht abgewandelte Form angewandt werden, die sogenannte Temperatur Gradienten Gelelektrophorese, bei der die Temperatur das denaturierende Agens darstellt. Die DNA-Moleküle wandern solange, bis sie eine Position im Gel erreichen, an der die Schwelle zwischen Doppel- und Einzelstrang unterschritten wird, und der Doppelstrang teilweise aufschmilzt. Der aufgeschmolzene Bereich variiert zwischen 25 und 100 bp und kann in der Mitte liegen, so dass eine Blase entsteht, oder am Ende.

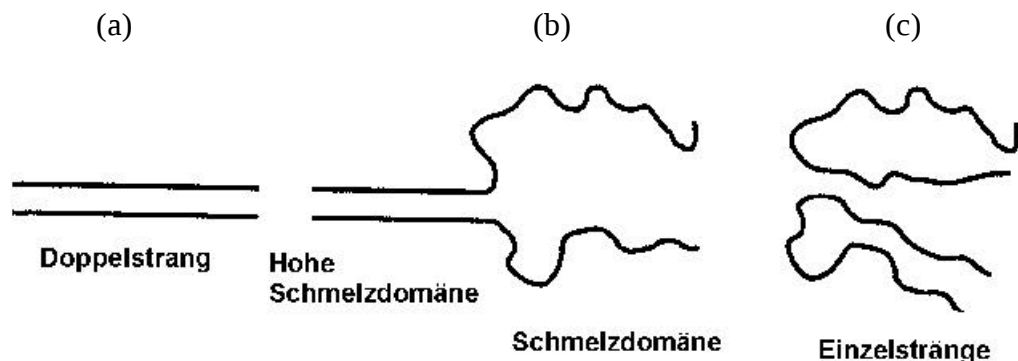


Abb. 4.3.4.1: Aufschmelzen der doppelsträngigen DNA im Gradientengel. (a). Zu Beginn der Elektrophorese liegt die DNA als Doppelstrang vor. (b) Steigt der denaturierende Gradient an, schmilzt die DNA teilweise in ihre Einzelstränge auf. (c) Bei weiter ansteigendem Gradienten werden die DNA-Stränge vollständig getrennt.

(modifiziert aus Cotton, 1997).

Ein mutierter DNA-Strang, welcher sich nur an einer einzelnen Basenposition unterscheidet, wird an eine andere Position wandern, als der vergleichbare Strang vom Wildtyp, da er ein

anderes Schmelzverhalten zeigt. Die dabei im Gel entstehende Bande wird somit auf anderer Höhe erscheinen als die des Wildtyps. Da die DNA sich nicht vollständig in ihre Einzelstränge trennt, können Mutationen, die im Bereich mit der höchsten Schmelzdomäne liegen, welche nicht aufschmilzt, nicht detektiert werden. Die Sensitivität dieser Methode läge daher bei nur ca. 50 %. Deshalb wird einem der beiden Primer eine GC-Klammer zugefügt, welche aus bis zu 40 G und C Nukleotiden besteht (Sheffield et al., 1989; Fodde und Losekoot, 1994; Muyzer et al., 1996). Die GC-Klammer stellt nun den Bereich mit der höchsten Schmelzdomäne dar, das gesamte Fragment kann also detektiert werden. Zusätzlich wird die Sensitivität durch Bildung von Heteroduplices gesteigert. Denaturiert man das Amplifikat im Anschluss an die PCR in seine Einzelstränge und erlaubt diesen dann in einem zweiten Schritt, sich erneut zu paaren, entstehen die Heteroduplices. Letztere haben immer eine niedrigere Schmelztemperatur, da ein Teil der DNA schon dissoziiert vorliegt (Zschocke und Hoffmann, 1997). Auf diese Weise kann die Sensitivität auf nahezu 100 % gesteigert werden (Sheffield et al., 1989; Muyzer et al., 1996; Macek et al., 1997). Welche der publizierten Klammern gewählt wird, ist nicht entscheidend, jedoch sollte die Auswahl des Primers, der mit der GC-Klammer versehen wird, sehr sorgfältig durchgeführt werden. MELT87™ (Lerman et al., 1987), ein eigens für diese Zwecke entwickeltes Computerprogramm ermöglicht dies, indem es die Schmelzkurve des jeweiligen Fragments nach dem Hinzufügen der GC-Klammer an den Primer anzeigt. So kann entschieden werden, welcher der beiden Primer die Klammer tragen soll. Dabei sollte darauf geachtet werden, daß der Bereich der Klammer immer derjenige mit der höchsten Schmelztemperatur ist. Der GC-Gehalt des Fragments selbst ist dabei entscheidend und gegebenenfalls auch limitierend. Neben der hohen Empfindlichkeit dieser Methode ist es möglich, Fragmente bis zu einer Größe von 800-1000 bp zu untersuchen (Sheffield et al., 1989). Der optimale Harnstoffgradient muß für jedes Fragment individuell ermittelt werden. Dies ist zum einen ebenfalls mit MELT87™ möglich, zum anderen auch mit einem Perpendikulargel, bei dem der Gradient senkrecht zur Elektrophoreserichtung ansteigt und einen möglichst weiten Bereich (0-80 % bzw. 0-100 %) umfaßt. Die Bestimmung des optimalen Gradienten mit dem Perpendikulargel ist hier erfahrungsgemäß die zuverlässigere Methode.

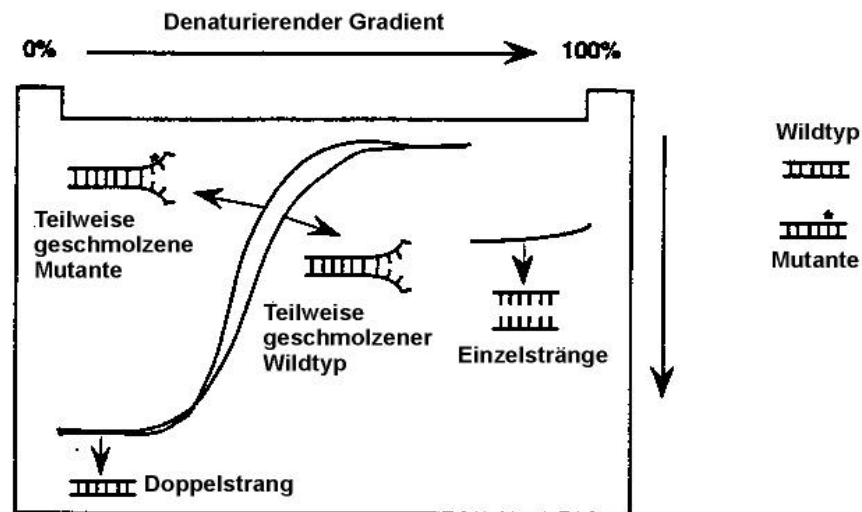


Abb. 4.3.4.2: Schmelzverhalten der DNA in einem Perpendikulargel. (modifiziert aus dem Users Manual der Firma BioRad).

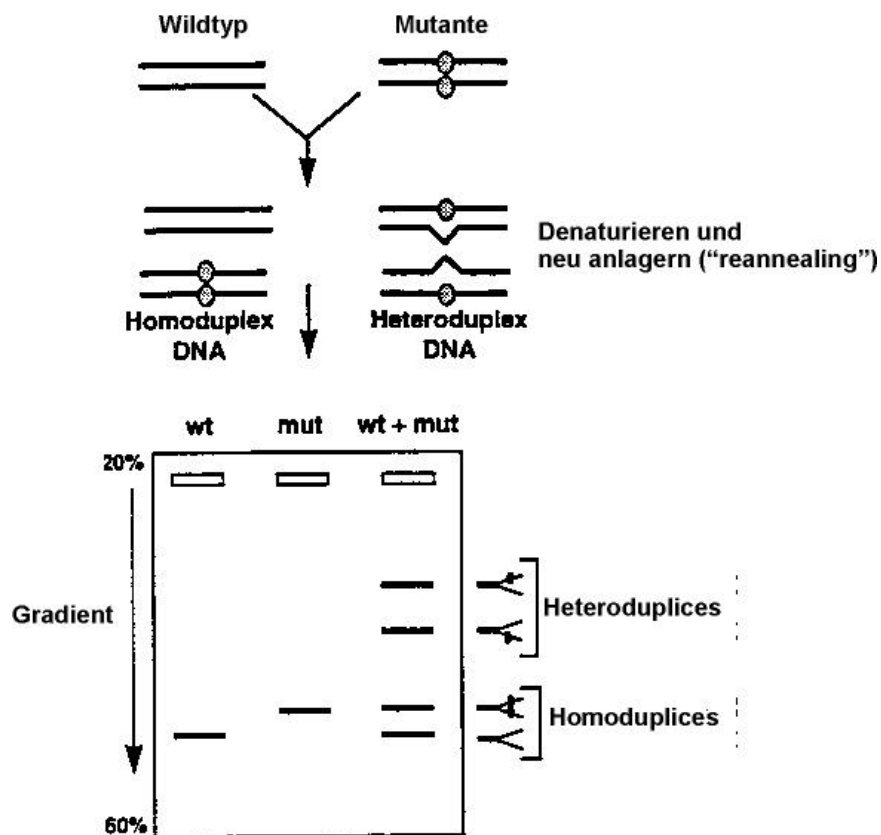


Abb. 4.3.4.3: Prinzip der parallelen DGGE. (modifiziert aus dem Users Manual der Firma BioRad)

**Durchführung:**

Die zunächst durchgeführte Amplifikation eines definierten DNA-Abschnitts in der PCR erfolgte nach den gleichen Bedingungen, welche für den Primer ohne GC-Klammer bereits ausgetestet wurden. Dem PCR-Programm wurden jedoch zusätzlich noch 2 weitere Schritte zugefügt, nämlich 30 min bei 65°C und 30 min bei 37°C. Diese zusätzlichen Schritte sollten die Bildung von Heteroduplices ermöglichen, so dass sich Wildtyp mit Wildtyp und Wildtyp mit Mutante, sowie Mutante mit Mutante paaren konnte. Von einem 20 bzw. 100 µl PCR-Produkt wurden 5µl auf einem 1%-igen Agarosegel ausgetestet. Dem übrigen Produkt wurde ½ Vol nichtdenaturierender Auftragspuffer zugegeben.

Vorbereitung der Glasplatten für parallele DGGE-Gele:

Zwei 20 x 16 cm bzw. 20 x 18,5 cm große Glasplatten wurden mit ddH<sub>2</sub>O und Ethanol gründlich gereinigt und mit einem Netzmittel (Agfa Agepon super) beschichtet. 2 Spacer von 1mm Dicke wurden an beiden Seiten der größeren Glasplatte plaziert, die kleinere Glasplatte auf die größere gelegt und beide mit zwei Klammern aufeinander fixiert. An der Unterseite der Klammern wurde zwischen Glasplatten und Klammern etwas Vaseline aufgetragen, um ein Auslaufen der Gellösung zu vermeiden. Die Platten wurden dann mit den Klammern in einen Gelgießstand eingespannt.

Gel gießen

Um ein Gradientengel für die DGGE zu gießen, ist ein Gradientenmischer nötig, welcher aus 2 Kammern besteht, die über einen Kanal verbunden sind. Der Kanal kann nach Bedarf geöffnet oder geschlossen werden. An einer der Kammern wird ein kleiner Hahn befestigt, von dem ein Schlauch abgeht. Es wurden zwei Lösungen benötigt. Eine mit hoher Harnstoffkonzentration, die stark denaturierende sogenannte „high-Lösung“ und eine sogenannte „low-Lösung“, die keinen Harnstoff enthielt. Beide Lösungen wurden in 2 getrennten 50 ml Reaktionsgefäßen so gemischt, dass der für das Fragment ermittelte optimale Gradient beim Gießen entstehen konnte. Zum Mischen standen entsprechend konzentrierte Stammlösungen von 80% (100 %) denaturierendem Agens und 0% denaturierendem Agens bereit. Die Polyacrylamidkonzentration betrug 6,5 bzw. 8 %. In

jedes der beiden Reaktionsgefäße wurden vor dem Gießen 100µl APS (10%-ig) und 10µl TEMED gegeben und die Gefäße vorsichtig invertiert. Die stärker denaturierende „high-Lösung“ wurde nun in die dem Hahn am nächsten gelegene Kammer gefüllt, da sie zuerst zwischen die Glasplatten laufen sollte, um einen von oben nach unten ansteigenden Gradienten zu gewähren. Die weniger stark denaturierende „low-Lösung“ wurde in die andere Kammer gefüllt. Die Verbindung zwischen den beiden Kammern blieb zunächst geschlossen. Der Gradientenmischer wurde zum Gießen des Gels auf einen Magnetrührer gestellt. In die rechte, weiter vom Hahn entfernte Kammer wurde ein kleines Magnetrührstäbchen gegeben und der Magnetrührer angestellt. Zunächst wurde die Verbindung zwischen den beiden Kammern geöffnet, schließlich auch der Hahn an dem der Schlauch befestigt war. Das andere Ende des Schlauches wurde mit einer Pipettenspitze versehen, durch die die Gellösung nun zwischen die Glasplatten floß. Dabei mischten sich nach und nach „high-“ und „low-Lösung“ im Gradientenmischer so, dass der Gradient von oben nach unten zunahm. Nachdem die Gellösung vollständig zwischen die Glasplatten gelaufen war, wurden Gradientenmischer und Schlauch umgehend mit Wasser gereinigt, um ein Auspolymerisieren der Gelreste im Mischer oder im Schlauch zu verhindern. Danach konnte der Kamm, in dessen Zwischenräume später die Proben aufgetragen wurden, zwischen die Platten gesteckt werden. Das Gel wurde über Nacht mit feuchten Tüchern und Haushaltsfolie eingeschlagen, um das Austrocknen zu verhindern und gleichzeitig das Auspolymerisieren zu ermöglichen.

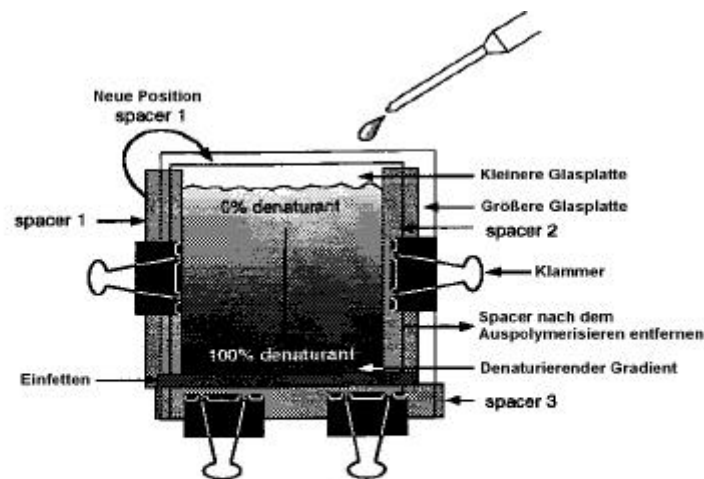


Abb. 4.3.4.4: Gießen eines Perpendikulargels

### Elektrophorese

Die untere Pufferkammer des DGGE-Gerätes wurde vor dem Gellauf mit 1x TAE gefüllt und der Puffer mit dem Temperaturmodul auf 60°C vorgeheizt. Der Kamm konnte nun vorsichtig entfernt, das Gel in die entsprechende Halterung eingespannt und in die untere Pufferkammer eingehängt werden. Nachdem die obere Pufferkammer ebenfalls mit 1x TAE gefüllt war, konnte das Gel bei 150-170 Volt für 30 min vorgewärmt werden. Anschließend wurden die Kammzwischenräume gründlich gespült und je 10 µl jeder Probe aufgetragen. Die angelegte Spannung betrug 150-170 Volt, die Puffertemperatur während des gesamten Gellaufes 60°C. Die Elektrophoresedauer richtete sich nach der Größe des jeweiligen Fragments.

### Vorbereitung der Glasplatten für perpendikulare DGGE-Gele:

Die Glasplatten wurden mit ddH<sub>2</sub>O und Ethanol gereinigt und mit Netzmittel beschichtet. Die Positionierung der Spacer und das Fixieren der Glasplatten aufeinander, erfolgte wie abgebildet. Dabei wurden die geschlossenen Seiten zusätzlich mit Tesafilm abgedichtet, um ein Auslaufen der Gellösung zu verhindern.

### Gel gießen:

Das Gießen des Gels erfolgte mit Hilfe des Gradientenmischers in der oben beschriebenen Weise. In die dem Auslaufhahn am nächsten gelegene Kammer wurde dabei grundsätzlich 80 %ige (100 %ige) Lösung gefüllt, während in die andere Kammer 0 %ige Lösung gegeben wurde. Das Stecken des Kamms entfiel, da die Probe bei Perpendikulargelen über die gesamte Fläche des Gels verteilt wurde. Das Gel wurde über Nacht verpackt und stehengelassen, um ein Auspolymerisieren zu ermöglichen.

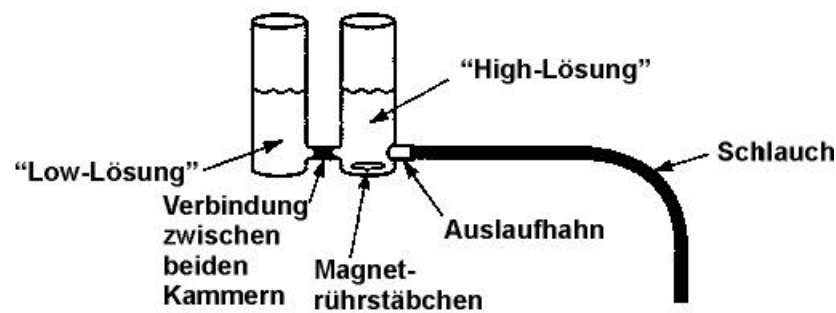


Abb.4.3.4.5: Schematische Darstellung eines Gradientenmischers. „High-“ und „Low-Lösung“ sind über einen verschließbaren Verbindungskanal miteinander verbunden. Die „High-Lösung“ befindet sich in der dem Auslauf am nächsten gelegenen Kammer. (modifiziert aus Myers et al., 1997)

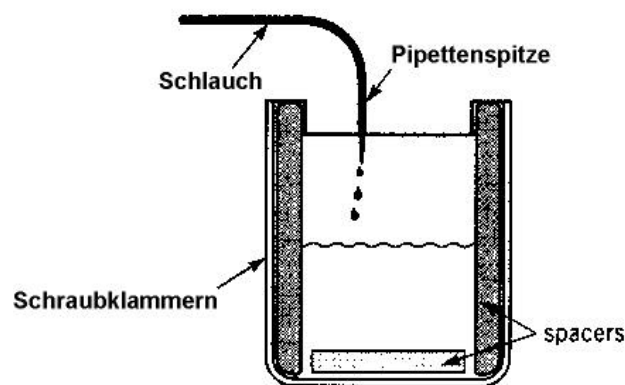


Abb. 4.3.4.6: Gießen eines parallelen Gradientengels. Der Gradient nimmt parallel zur Elektrophoreserichtung zu. (modifiziert aus Myers et al., 1997).

### Elektrophorese:

Für ein Perpendikulargel wurde dem 100 µl PCR-Ansatz  $\frac{1}{2}$  Vol Auftragspuffer zugegeben. Anschließend wurden die Klammern, sowie zwei der zum Gießen gesetzten Spacer, vom Gel entfernt. Einer der Spacer konnte jetzt umpositioniert werden (siehe Abb.). Die zwei Schraubklammern zur Fixation der Glasplatten wurden nun wie bei den parallelen Gelen

angebracht und das Gel in die entsprechende Vorrichtung eingespannt. Die gesamte Vorrichtung wurde jetzt in das auf 60°C vorgewärmte 1x TAE der unteren Pufferkammer eingehängt, die obere Kammer ebenfalls mit 1x TAE gefüllt, und das Gel bei 60°C und 150 Volt 30 min vorgewärmt. Nach dem Spülen der Auftragsfläche wurde die gesamte Probenmenge gleichmäßig über diese verteilt. Die Elektrophorese konnte nun bei 60°C und 150 Volt fortgesetzt werden. Die Dauer des Gellaufes richtete sich wieder nach der Größe des Fragments und folgte im Allgemeinen folgenden Bedingungen:

| <b>DNA-Molekülgröße (bp)</b> | <b>Laufzeit (h)</b> |
|------------------------------|---------------------|
| 50-150                       | 4                   |
| 150-300                      | 6                   |
| 300-500                      | 8                   |
| 500-1000                     | 11                  |

*Tabelle 4.3.4.1*

#### Gele färben:

Nach Beendigung der Elektrophorese wurde das Gel aus der Pufferkammer genommen, die Glasplatten voneinander getrennt, und das Gel auf der darunterliegenden Glasplatte in einem Ethidiumbromidbad (5µg/ml) für 15-30 min gefärbt. Anschließend konnte es auf dem UV-Transilluminator mit Hilfe des Bioprint-Systems photographiert werden.

#### 4.3.4.4 Exon 1 von FGFR 2

Für die Untersuchung mittels DGGE wurde der Primer für den Strang als GC-Primer gewählt (3.7).

Das Perpendikulargel ergab einen optimalen Harnstoffgradienten von 37,9 %. Das parallele Gradientengel wurde daraufhin im Bereich zwischen 20-50 % angefertigt (4.3.4). Die Acrylamidkonzentration betrug 6,5 %. Die Untersuchung wurde bei einer Elektrophoresedauer von 10,5 h bei 150 Volt in 60 °C warmem 1 x TAE durchgeführt.

#### 4.3.4.5 Exon 7 von FGFR 2

Für die Untersuchung mittels DGGE wurde zunächst der Primer für den Strang als GC-Primer gewählt (3.7). Später wurde die GC-Klammer an den Primer für den Gegenstrang gehängt. Die Berechnung des Gradienten ergab einen optimalen Harnstoffgradienten von 44,4 %. Das parallele Gradientengel wurde daraufhin im Bereich von 30-60 % angefertigt (Myers et al., 1997).

Die Acrylamidkonzentration betrug 6,5 %, die Elektrophoresedauer 6 h bei 60 °C Puffertemperatur und 150 Volt Spannung.

#### 4.3.4.6 Exon 9 von FGFR 2

Für die Untersuchung mittels DGGE wurde der Primer für den Strang als GC-Primer gewählt (3.7).

Bei dem für Exon 9 von FGFR 2 errechneten optimalen Harnstoffgehalt von 47,36 % wurde ein Gel mit einem Harnstoffgradienten zwischen 32 und 62 % angefertigt.

Die Elektrophoresedauer betrug 5 h in 60 °C warmem 1 x TAE bei 170 Volt.

#### 4.3.4.4 Exon 7 von FGFR 3

Zum GC-Primer wurde der Primer für den Strang bestimmt (3.7). Die Amplifikation erfolgte wie bereits geschildert.

Die Berechnung mittels Perpendikulargel ergab einen optimalen Harnstoffgradienten von 48,8 %. Das parallele Gradientengel wurde danach im Bereich zwischen 35-65 % gegossen.

Die Acrylamidkonzentration betrug 6,5 %, die Elektrophoresedauer 10,5 h bei 60 °C Puffertemperatur und 150 Volt Spannung.

#### **4.4 Isolierung von DNA-Fragmenten aus präparativen Gelen**

##### **Vorbemerkungen:**

Erfolgt nach Ablauf und Dokumentation der Gelelektrophorese die Weiterverarbeitung eines DNA-Fragmentes, so muß die DNA aus der Trägermatrix isoliert und gereinigt werden, bevor weitere Arbeitsschritte folgen können. Bei der Isolierung der DNA aus Agarosegelen wurden in dieser Arbeit die Reinigungskits der Firmen Qiagen und Macherey-Nagel verwendet. Beide ergaben ein zufriedenstellendes Ergebnis, was die gewonnene DNA-Konzentration, die Reinheit der DNA und den Zeitfaktor der Reaktion betraf. Der Macherey-Nagel Kit war jedoch etwas kostengünstiger.

##### **4.4.1 Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen über Qiagen-Säulen**

Nach erfolgter Elektrophorese wurden die Banden mit einem Skalpell aus dem Agarosegel ausgeschnitten und jedes ausgeschnittene Agaroseblöckchen in einem 1,5 ml Reaktionsgefäß gewogen. Die weiteren Schritte wurden nach Anleitung der Firma Qiagen mit den dem Kit beigefügten Reagenzien durchgeführt.

Das Agaroseblöckchen wurde für 10 Minuten bei 50°C in 3 Vol Puffer QX 1 gelöst. Dann wurde dem Ansatz das einfache Volumen (bezogen auf das Gewicht des Agaroseblocks) Isopropanol zugegeben und der Gesamtansatz auf eine Qiagen-Säule pipettiert. Durch einen einminütigen Zentrifugationsschritt bei 13000 U/min wurde die DNA an die polykationische Säulenmatrix gebunden. Nach erneuter Zugabe von 500 µl Puffer QX 1 wiederholte sich der einminütige Zentrifugationsschritt, um Agarosereste zu entfernen. Um unspezifisch an die Membran angelagerte Salze ebenfalls zu eliminieren, wurden 750 µl des ethanolhaltigen Waschpuffers PE hinzupipettiert und nach 5 min abzentrifugiert. Anschließend wurden die Ansätze ohne weitere Zugabe von Reagenzien 1 min zentrifugiert, um den Ethanol restlos zu entfernen, da dieser das Eluieren der DNA beeinträchtigen kann. Die Säulen wurden jetzt in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß gegeben. Nach Zugabe von 30-50 µl des Elutionspuffer EB auf die Matrix konnte die eluierte DNA durch erneute Zentrifugation gewonnen werden.

#### 4.4.2 Isolierung von DNA aus präparativen Agarosegelen über Macherey-Nagel-Säulen

Die ausgeschnittenen und abgewogenen Agaroseblöckchen wurden 10 min im 50°C Wasserbad in 3 Vol Puffer NT 1 gelöst. Nach dem kräftigen Schütteln („vortexen“) wurde jeder Ansatz auf eine Säule pipettiert und diese 1 min zentrifugiert. Danach konnten 700 µl des ethanolhaltigen Puffers NT 3 zugegeben und erneut zentrifugiert werden. Dieser Schritt wurde wiederholt. Wieder wurden die Ansätze danach ohne Zugabe weiterer Reagenzien zentrifugiert. Sobald die Säulen in ein neues Reaktionsgefäß verbracht waren, wurden 50 µl Elutionspuffer NE zugegeben und nach 1 min Zentrifugation die DNA im Reaktionsgefäß aufgefangen.

#### 4.5 Radioaktive Endmarkierung von Nukleinsäuren

##### **Vorbemerkungen:**

Bei der radioaktiven Markierung von Oligonukleotiden wird mit Hilfe des Enzyms T4-Polynukleotidkinase (T4-PNK) die endständige radioaktive Phosphatgruppe von  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP auf die freie 5'-Hydroxylgruppe der Nukleinsäure übertragen.

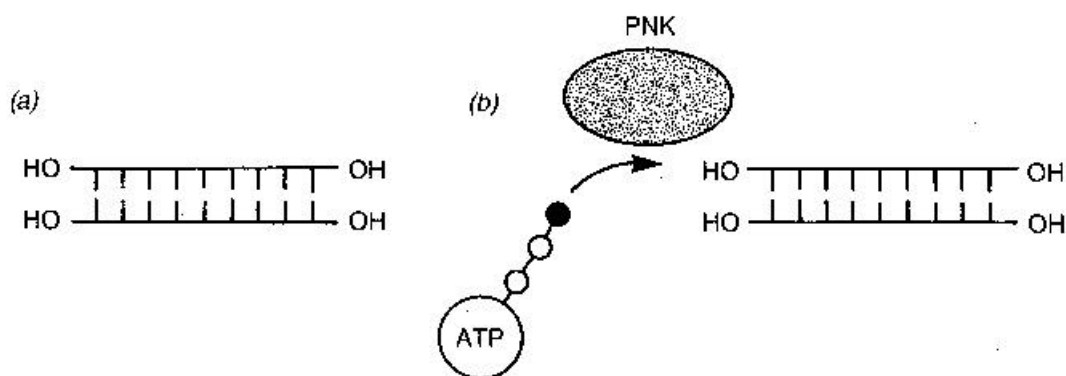


Abb. 4.5.1: Endmarkierung einer DNA mit Hilfe einer Polynukleotidkinase (PNK). (a) Man dephosphoryliert die DNA mit einer Phosphatase und erhält so 5' OH-Enden. (b) Die PNK überträgt das endständige Phosphat des  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP (schwarzer Punkt) auf das 5' Ende der DNA. (aus Nicholl, 1995).

**Durchführung:**

Die T4-PNK wurde vor der Anwendung mit ihrem spezifischen Verdünnungspuffer im Verhältnis 1:10 verdünnt.

*Markierungsansatz:*

1 µl Primer (15 pmol/µl)

1µl T4-PNK Puffer

2 µl  $\gamma$ -<sup>32</sup>P-ATP

2 µl T4-PNK (verdünnt)

4 µl ddH<sub>2</sub>O

Der Ansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert und die T4-PNK anschließend durch Erhitzen für 10 min bei 65°C inaktiviert. Anschließend wurden die Primer bei –20°C gelagert.

**4.6 DNA-Sequenzierung****Vorbemerkungen:**

Die verwendete modifizierte Methode basiert auf der Didesoxy-Methode nach Sanger (Sanger et al., 1977). Die Sequenzierung dient der Bestimmung der linearen Abfolge der Basen in einem definierten DNA-Bereich.

Bei der Kettenabbruchmethode nach Sanger mußte die DNA in denaturierter Form vorliegen. Dazu mußte sie früher in einzelsträngige Vektoren, wie z.B. M13 kloniert werden. Bei diesem Verfahren ließ man einen kurzen Oligonukleotid-Primer mit dem rekombinierten M13-Molekül hybridisieren. Dieser kurze Primer diente als Ausgangspunkt für die Synthese eines komplementären Stranges. Bei der nach Kretz (Kretz et al., 1994) modifizierten Form der zyklischen Sequenzierung (Cycle-Sequencing) macht man sich die zyklische Aufeinanderfolge von Erhitzen und Abkühlen einer PCR-Reaktion zunutze. Die Klonierung in Vektoren ist hier nicht mehr erforderlich. Ähnlich der gewöhnlichen PCR wird die DNA in einem Denaturierungsschritt bei hoher Temperatur in ihre Einzelstränge denaturiert. Im darauffolgenden Schritt erfolgt die Synthese eines komplementären DNA-Stranges in Anwesenheit von Nukleotidtriphosphaten, denen in geringer Konzentration Didesoxynukleotide, d.h. Nukleotide, deren 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose fehlt,

zugefügt wurden. Sobald ein Didesoxynukleotid in den neusynthetisierten Strang eingebaut wird, bricht die DNA-Synthese ab. Wegen der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose kann kein weiteres Nukleotid eingefügt werden. Vier getrennten Reaktionsansätzen wird jeweils ein anderes Didesoxynukleotid (ddA, ddC, ddG, ddT) beigelegt, so daß der Kettenabbruch immer nur nach einem spezifischen Nukleotid (A, C, G, T) erfolgt (Hennig, 1995). Der mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP radioaktiv markierte Primer bindet bei seiner gewöhnlichen Annealing-Temperatur  $-1^\circ\text{C}$ . Die Synthese wird durch hitzestabile Sequenase, eine modifizierte Form der DNA-Polymerase ermöglicht. Der Anstieg der Menge des gebildeten PCR-Produktes erfolgt linear, da nur ein Primer bei der Reaktion eingesetzt wird. Dies steht im Gegensatz zur exponentiellen Erhöhung der PCR-Produktmenge bei der gewöhnlichen PCR. Es entsteht eine Mischung von neusynthetisierten DNA-Strängen unterschiedlicher Länge, deren Größenbereich zwischen einem und mehreren hundert Nukleotiden liegt. Die vier Reaktionsgemische werden getrennt nebeneinander auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen, so dass die Basensequenz der DNA direkt abgelesen werden kann. Durch die radioaktive Markierung mit  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP können die Gele einer Autoradiographie unterworfen werden.

#### 4.6.1 Zyklische Sequenzierung mit radioaktiv markierten Primern

Für die Durchführung dieser Reaktion wurde der „Thermo Sequenase cycle sequencing kit“ der Firma Amersham benutzt.

Vor der zyklischen Sequenzierung mußte eine definierte DNA-Sequenz zunächst mittels PCR (4.2) amplifiziert werden. Anschließend wurde das Amplifikat durch Agarose-Gelelektrophorese (4.3.1) aufgetrennt, isoliert und über Säulen aufgereinigt (4.4).

Je 4  $\mu\text{l}$  der Didesoxynukleotide wurden je Proband auf acht unterschiedlich beschriftete Reaktionsgefäße verteilt. Dabei sind vier Reaktionen für den Hin-, vier für den Rückstrang vorgesehen, da immer nur ein DNA-Strang mit einem Primer sequenziert werden kann.

*Reaktionsansatz pro Strang:*

6-12 µl DNA (je nach Konzentration auf dem Agarosegel)

2 µl Reaktionspuffer

1 µl markierter Primer

2 µl Sequenase

ad 17,5 µl mit ddH<sub>2</sub>O

Je 3,8 µl Reaktionsansatz wurden auf die Gefäße mit den ddNTP's verteilt. Die Ansätze wurden mit Mineralöl überschichtet und die Reaktion im Thermo-Cycler gestartet.

*Reaktionsprogramm:*

94°C 3 min

94°C 30 sec

PCR-Primer-Annealing-Temperatur –1°C 30 sec

72°C 30sec

Der erste Denaturierungsschritt erfolgte einmal, die folgenden Reaktionsschritte wurden 30-35 x wiederholt. Nach erfolgter Reaktion wurden 4 µl blaue Stopplösung hinzupipettiert, es folgte ein finaler Denaturierungsschritt.

3 µl der einzelnen Sequenzieransätze wurden nebeneinander auf ein denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen und die Elektrophorese bei 60 W gestartet. Damit das gesamte Fragment analysiert werden konnte, mußten die Stränge je zweimal aufgetragen werden. Nach dem ersten Auftrag wurde die Elektrophorese für 2-2,5 h gestartet (langer Lauf), dann wurden die Stränge ein zweites Mal aufgetragen und die Elektrophorese für weitere 1,5-2 h fortgesetzt (kurzer Lauf). Der Gelabbau wurde bereits in 4.3.2 beschrieben.

#### 4.6.2 Zyklische Sequenzierung mit fluoreszenzmarkierten Primern

##### **Vorbemerkungen:**

Das Grundprinzip der zyklischen Sequenzierung bleibt bei dieser Methode unverändert. Die Unterschiede liegen in der Verwendung eines mit Fluoreszenzfarbstoff gekoppelten Primers, der als Startpunkt der Sequenase dient, und eines automatischen Sequenziergerätes (Sequencer der Firma Licor) zur Durchführung der Elektrophorese und zur Analyse der Sequenzdaten.

Die durch die Sequenzierreaktion entstandenen Fragmente wandern dabei während der Gelelektrophorese an einem Photodetektor vorbei, der die Fluoreszenzemission der verlängerten Primer detektiert. Die an die Primer gekoppelte fluoreszierende chemische Gruppe wird vorher von einem Laserstrahl im Sequenziergerät angeregt. Das durch den Photodetektor gemessene Signal wird gespeichert und mit einem geeigneten Computerprogramm sichtbar gemacht. Auf Grund der erhöhten Menge an Sequenzdaten, die hier ermittelt werden können und des Verzichts auf Radioaktivität, beinhaltet die Nutzung des automatischen Sequenziergerätes große Vorteile gegenüber der herkömmlichen Reaktion mit radioaktiver Markierung.

##### **Durchführung:**

Vor der zyklischen Sequenzierung mußte eine definierte DNA-Sequenz wieder mittels PCR (4.2) amplifiziert werden. Anschließend wurde das Amplifikat durch Agarose-Gelelektrophorese (4.3.1) aufgetrennt, isoliert und über Säulen aufgereinigt (4.4).

Fluoreszenzmarkierte Primer sind sehr lichtempfindlich. Sie sollten keiner längeren Lichtexposition ausgesetzt werden und in einer lichtgeschützten Verpackung gelagert werden. Für die Reaktion wurde der "Thermosequenase fluorescent labelled primer cycle sequencing kit" der Firma Amersham eingesetzt.

Je 4 x 1 µl des ddNTP-Mix (A, C, G, T) wurden in einer Mikrotiterplatte vorgelegt. Der ddNTP-Mix enthält die ddNTPs, die dNTPs, das Enzym und den Reaktionspuffer. In einem anderen Reaktionsgefäß wurden für jeden Strang folgende Reagenzien pipettiert:

*Reaktionsansatz für einen Strang:*

4 µl DNA

0,5 µl DMSO

1 µl Primer

ad 13 µl mit ddH<sub>2</sub>O

Je 3 µl von diesem Ansatz wurden auf die ddNTP-Aliquots verteilt und mit Mineralöl überschichtet. Die Reaktion wurde wieder in einem Thermo-Cycler durchgeführt.

*Reaktionsprogramm:*

95°C 2 min

95°C 15 sec

PCR-Primer-Annealing-Temperatur –1°C 15 sec

70°C 15 sec

Nach beendeter Reaktion wurden 3 µl Stopplösung zugegeben und die Ansätze 2 min bei 70°C denaturiert. Je 1 µl der einzelnen Reaktionsansätze wurden direkt nebeneinander auf dem denaturierenden PAGE-Gel aufgetragen und die Gelelektrophorese über den Computer gestartet.

4.6.3 Auswertung der Sequenzen

Nach Beendigung der Gelelektrophorese konnten die Sequenzen ausgewertet werden. Die Sequenz wurde, mit dem kleinsten Fragment beginnend, von unten nach oben gelesen. Bei der radioaktiven Sequenzierung geschah dies „per Auge“, am automatischen Sequenziergerät las der Computer die Sequenz, welche anschließend „per Auge“ überprüft werden mußte. Man erhielt die von 5' nach 3' orientierte Sequenz. Der Vergleich mit der bekannten Sequenz vom Wildtyp erfolgte mit Hilfe von Computerprogrammen (DNASIS und OLIGO™). Dabei gaben Zusatzbanden, welche auf gleicher Höhe lagen, Hinweise auf eine eventuell vorhandene Mutation. Die zusätzliche Bande mußte jedoch in beiden Strängen zu

sehen sein, da es sich ansonsten um Artefakte handeln konnte. Die Auswertung wird im Ergebnisteil ausführlicher beschrieben.

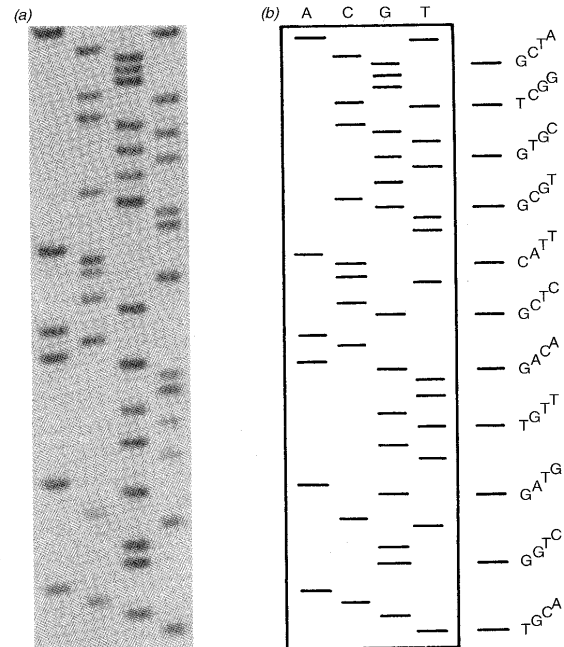


Abb. 4.6.3.1: Ablesen einer DNA-Sequenz. In jeder Spur wurde eines der Reaktionsgemische mit einem der vier ddNTP's aufgetragen. Man liest die Sequenz vom Ende des Gels aus. Jedes Fragment ist um ein Nukleotid länger als das vorige. (modifiziert aus Nicholl, 1995 ).

#### **4.7 Autoradiographie**

##### **Vorbemerkungen:**

Mit der Autoradiographie können Radionuklide über Filmschwärzung nachgewiesen werden. Der auf den Film einfallende Strahler, hier  $\gamma$ - $^{32}\text{P}$ -ATP, bewirkt über Ionisationsprozesse eine Freisetzung von Elektronen, die zur Reduktion von Silberionen zu atomarem Silber (schwarz) führen. Die entwickelten Filme bezeichnet man als Autoradiogramme. Bei  $^{32}\text{P}$  handelt es sich um energiereiche Strahlung, welche einen entsprechenden Schutz durch Plexiglasabschirmungen bzw. Schutzbrillen erfordert.

##### **Durchführung:**

Radioaktive, auf Whatman®-Papier getrocknete Gele wurden entweder in lichtgeschützte Mappen oder in handelsübliche Röntgenkassetten mit eingebauten Verstärkerfolien verbracht. Diese Verstärkerfolien arbeiten nach dem Szintillationsprinzip bei  $-80^\circ\text{C}$ . Lichtgeschützte Mappen besitzen keine Verstärkerfolien und wurden bei RT gelagert. Die radioaktiven Gele wurden in den Kassetten bzw. Mappen direkt mit einem Röntgenfilm in Kontakt gebracht, welcher 24 h oder länger auf dem Gel auflag. Die Filme wurden in der eigens dafür eingerichteten Dunkelkammer aufgelegt und nach ausreichender Exposition in der Entwicklungsmaschine entwickelt.

#### **4.8 Verdau von DNA mit Restriktionsendonucleasen**

##### **Vorbemerkungen:**

Restriktionsenzyme schneiden die DNA an bestimmten Erkennungsstellen, d.h., sie schneiden bestimmte Nukleotidmotive. Meist werden Restriktionsenzyme vom Typ II verwendet. Diese gehören zu den Endonucleasen, d.h. sie bauen die DNA nicht vom Ende her ab, sondern schneiden sie innerhalb des Stranges. Dabei erkennt jedes Enzym eine andere spezifische Basenabfolge von 4-8 bp oder mehr. Auf welche Länge ein Enzym ein DNA-Fragment zurechtschneidet, hängt von der Schnittstelle und deren Position ab. So können durch ein

Enzym aus einem langen Fragment mehrere kleinere entstehen, welche auf einem Agarosegel aufgetrennt werden, um die erfolgreiche Spaltung zu überprüfen. Die Enzymaktivität wird in Einheiten (U) angegeben. Eine Einheit ist die Enzymmenge, die in einer Stunde bei 37°C ein Mikrogramm DNA verdaut.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Restriktionsverdau ausschließlich zum Nachweis einer bestimmten Mutation verwendet, nämlich der Pro 250 Arg Mutation in FGFR 3. Als Restriktionsendonuclease wurde *Nci I* (*Neisseria cinerea*) verwendet. Dieses Enzym erkennt folgende Schnittstelle: 5'.....CC<sup>^</sup>CGG.....3'.

### **Durchführung:**

Das zu verdauende Fragment wurde zunächst in einer PCR amplifiziert. Dazu wurden folgende Primer verwendet (Reardon et al., 1997):

A: 5' CGG CAA CTA CAC CTG CGT CGT G 3'

B: 5' CTT GAG CAC GGT AAC GTA GGG 3'

*Reaktionsansatz für 100 µl:*

5 µl DNA (40 µg/ml)

20 µl Nukleotid-Mix

10 µl 10 x Taq-Polymerase-Puffer

5 µl Primer A

5 µl Primer B

20 µl Q-Solution (Firma Qiagen)

0,5 µl Qiagen-Taq-Polymerase

34,5 µl ddH<sub>2</sub>O

*Reaktionsprogramm:*

94°C 5 min

94°C 30 sec

58°C 30 sec

72°C 40 sec

72°C 10 min

Vom Amplifikat wurden 5 µl auf einem 1 %igen Agarosegel ausgetestet. Der verbleibende Rest wurde einer alkoholischen Fällung unterzogen (4.1.1). Das dadurch erhaltene gereinigte Pellet wurde über Nacht in 18 µl ddH<sub>2</sub>O im 50°C warmen Wasserbad gelöst.

Danach wurden jedem Ansatz 2 Einheiten *Nci I* (*Neisseria cinerea*) und 2 µl des entsprechenden Puffers (10 x NEBuffer 4) zugegeben. Die Ansätze wurden nun für 2 h bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Daraufhin erfolgte die wiederholte Zugabe von 1 Einheit Restriktionsenzym und 0,5 % Spermidin. Die Inkubation im 37°C warmen Wasserbad wurde für weitere 2,5-3 h fortgesetzt. Eine Inaktivierung des Enzyms nach dem Verdau war nicht erforderlich, da der gesamte Ansatz sofort auf einem Agarosegel aufgetrennt wurde.

Nach Beendigung des Verdaus wurden die Ansätze mit je 2 µl blauem Auftragspuffer für TAE-Gele versetzt und auf ein 2 %iges TAE-Agarosegel aufgetragen. Die Elektrophorese wurde in 1 x TAE bei ca 74 Volt durchgeführt. Die Elektrophoresedauer betrug 2-2,5 h.

## **5. Ergebnisse**

### **5.1 Mutationsanalysen in verschiedenen Bereichen der FGF-Rezeptorgene**

Vor Beginn dieser Arbeit waren bereits zahlreiche Mutationen in Teilbereichen der FGF-Rezeptorgene nachgewiesen worden. Untersucht wurden die „BEK-Isoform“ der Immunglobulin-like-Domäne III (Ig III) und die transmembrane Domäne der FGF-Rezeptorgene 2 und 3. Darüberhinaus wurden die geteilte Tyrosinkinase-Domäne von FGFR 3 sowie die erste Hälfte der Ig III-Domäne von FGFR 1 analysiert. Die Ig III-Domäne wird von zwei Exons kodiert. Exon 7 kodiert für einen Teil der Verbindungsstrecke zwischen der Immunglobulin-like Domäne II (Ig II) und III und für die erste Hälfte der Ig III-Domäne (Ig IIIa). Exon 9 kodiert für die „BEK-Isoform“ der Ig III und einen Teil der Verbindung zur transmembranen Domäne (TM), während Exon 8 die KGFR Variante der Ig III kodiert. Exon 10 kodiert für die TM- Domäne (Nomenklatur nach Givol und Yayon, 1992).

Eine weitere Mutation wurde außerdem in der Ig I Domäne von FGFR 2 beschrieben (Pulley et al., 1996; Robertson et al., 1998). Diese Domäne wird von den Exons 1 und 2 kodiert. Die meisten Mutationen konnten jedoch in den Exons 7 und 9 von FGFR 2 nachgewiesen werden (Steinberger et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit wurden Mutationsanalysen an 216 Craniosynostosepatienten durchgeführt. Dazu wurden Exon 7 von FGFR 1, 2 und 3, Exon 9 von FGFR 2 und 3, Exon 10 von FGFR 3 und Exon 1 und 2 von FGFR 2 untersucht. Hinzu kamen 66 Personen, die keine klinische Symptomatik zeigten, aber mit einem der Betroffenen verwandt waren. Diese 66 Personen stammten aus 25 verschiedenen Familien. Bei 59 Patienten mit klinischer Symptomatik (27 %) konnte eine Mutation in einem der untersuchten Teilbereiche nachgewiesen werden. Zusätzlich fanden sich bei 8 der 66 Familienangehörigen (13 %) ebenfalls Mutationen.

## 5.2 Mutationen in der Ig-IIIa Domäne von FGFR 2

### 5.2.1 Exon 7 von FGFR 2

Das Fragment wurde zunächst mit SSCP-Analyse (4.2.11 bzw. 4.3.3) untersucht.

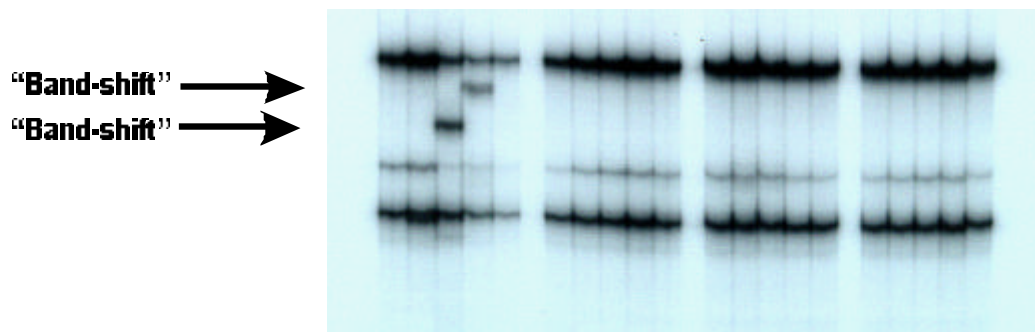


Abb. 5.2.1.1: SSCP-Analyse von Exon 7 von FGFR 2 mit zwei „band-shifts“.

Traten zusätzliche Banden („band-shifts“) auf, so wurde die DNA-Probe sequenziert, um eine eventuell vorhandene Mutation genau detektieren zu können (4.3.2, 4.6). Dazu wurden die genannten Primer (3.7) nach der in 4.5 beschriebenen Methode radioaktiv markiert.

Folgende Mutationen wurden in Exon 7 nachgewiesen:

- 1.) Der Nukleotidaustausch **A 866 C**, **CAG->CCG**, **Gln 289 Pro** bei einem Patienten. Phänotypisch war dieser Patient nach Beschreibung des Arztes „Crouzon verdächtig“.

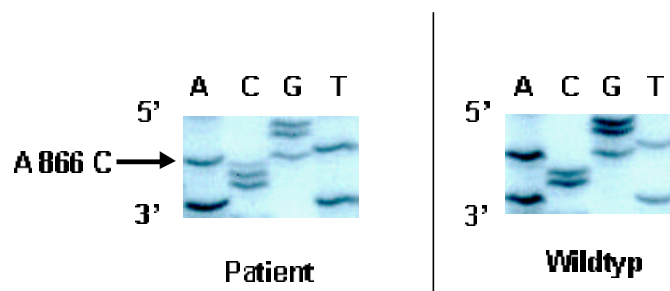


Abb. 5.2.1.2: Sequenz der Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch A 866 C, Gln 289 Pro im Vergleich zum Wildtyp.

2.) Der Nukleotidaustausch **C 758 G**, **CCT->CGT**, **Pro 253 Arg** bei 6 (2,7 %) der untersuchten Patienten, welche mit Verdacht auf Apert-Syndrom eingesandt wurden. Phänotypisch zeigten diese einen Verschuß der Coronarnaht beiderseits, Mittelgesichtshypoplasie und Hypertelorismus in Verbindung mit Syndaktylien vom Grad III an Händen und Füßen (Cohen et al., 1995). Patienten mit diesem Nukleotidaustausch zeigten trotz der schweren Syndaktylien an Händen und Füßen postoperativ eine mildere klinische Symptomatik mit leichter Mittelgesichtshypoplasie und normalen Dentalbefunden im Vergleich zu Patienten mit der Ser 252 Trp Mutation (v.Gernet et al., im Druck).

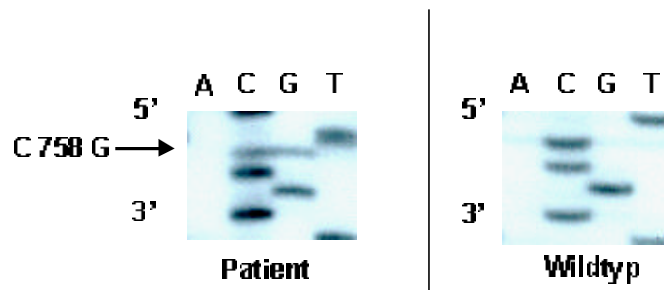


Abb. 5.2.1.3: Sequenz einer Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch C 758 G, Pro 253 Arg im Vergleich zum Wildtyp.



Abb. 5.2.1.4: Gesicht einer Patientin mit dem Aminosäureaustausch Pro 253 Arg und Syndaktylien der Hände und Füße vom Grad III bei einer Patientin.

3.) Der Nukleotidaustausch **C 755 G**, **TCG->TGG**, welcher zu einem Aminosäureaustausch von **Serin** an Stelle **252** zu **Tryptophan** führte bei 11 (5 %) der Patienten. Die DNA-Proben wurden ebenfalls mit Verdacht auf Apert-Syndrom eingesandt. Phänotypisch wurde bei den Patienten ein Verschuß der Coronarnaht beiderseits, Mittelgesichtshypoplasie, Hypertelorismus und Strabismus festgestellt. Syndaktylien vom Grad I und II traten an den Händen auf, an den Füßen solche vom Grad II, selten Grad III. Darüberhinaus wurde in 4 Fällen ein Hydrocephalus internus diagnostiziert. In einem Fall war die Mutation familiär bedingt. Alle Patienten mit diesem Nukleotidaustausch wiesen postoperativ einen gravierenderen Phänotyp auf, als Patienten mit dem Nukleotidaustausch Pro 253 Arg. Sie zeigten schwere dentale Malocclusion und Mittelgesichtshypoplasie. Dagegen wurden beim Ser 252 Trp Austausch präoperativ mildere Syndaktylien diagnostiziert (v.Gernet et al., im Druck).

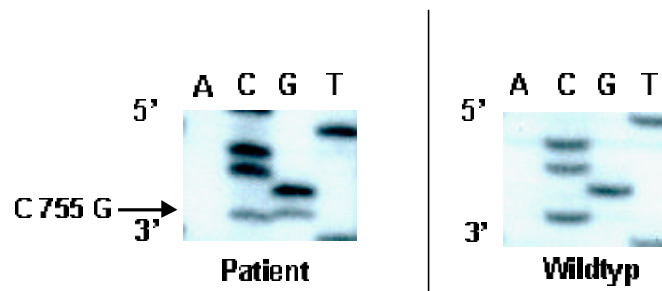


Abb. 5.2.1.5: Sequenz einer Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch C 755 G, Ser 252 Trp im Vergleich zum Wildtyp.

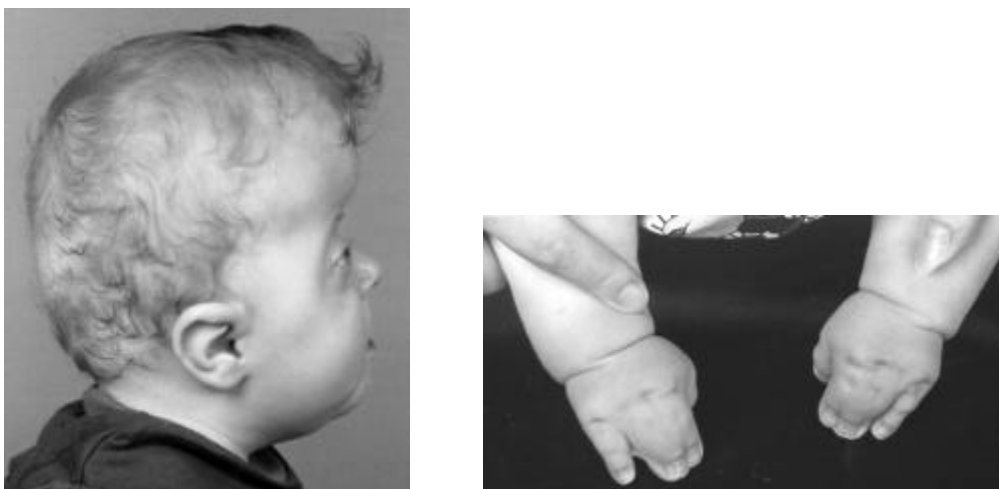


Abb. 5.2.1.6: Gesicht eines Patienten mit dem Aminosäureaustausch Ser 252 Trp und Syndaktylien der Hände vom Grad I.

### 5.3 Mutationen in der Ig IIIc-Domäne (BEK) von FGFR 2

#### 5.3.1 Exon 9 von FGFR 2

Das Fragment wurde zunächst mit der SSCP-Analyse untersucht. DNA-Proben, bei denen ein „band-shift“ zu sehen war wurden anschließend sequenziert, um die Lokalisation der Mutation ausmachen zu können (4.3.2, 4.5, 4.6).

In Exon 9 fanden sich folgende Mutationen:

- 1.) Der Nukleotidaustausch **G 1025 A**, TGC->TAC, der zu dem Aminosäureaustausch von **Cystein** an Stelle **342** zu **Tyrosin** führt, bei 3 miteinander nicht verwandten Patienten (1,4 %). Alle drei wiesen phänotypisch klassische „Crouzon-Symptome“ wie Exorbitismus und Hypertelorismus auf. Außerdem wurde eine Turricephalie beschrieben. Die beiden ebenfalls untersuchten Eltern des einen Patienten zeigten keine Mutation im untersuchten Fragment, so dass diese beim Patienten selbst offenbar *de novo* aufgetreten sein muss.

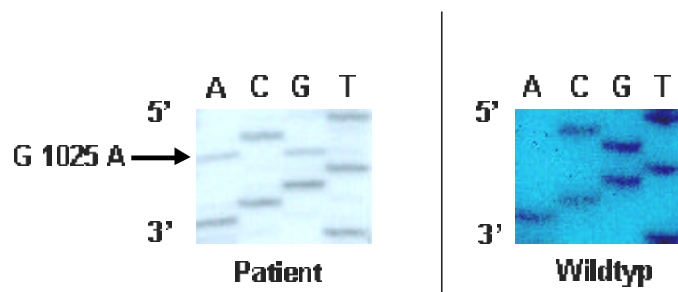


Abb. 5.3.1.1: Sequenz einer Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch G 1025 A, Cys 342 Tyr im Vergleich zum Wildtyp.

- 2.) Der Austausch **G 1025 C**, **TGC->TCC** mit dem daraus folgenden Aminosäureaustausch **Cystein** zu **Serin**, ebenfalls an Stelle **342** bei einem Patienten mit Verdacht auf Pfeiffer-Syndrom.

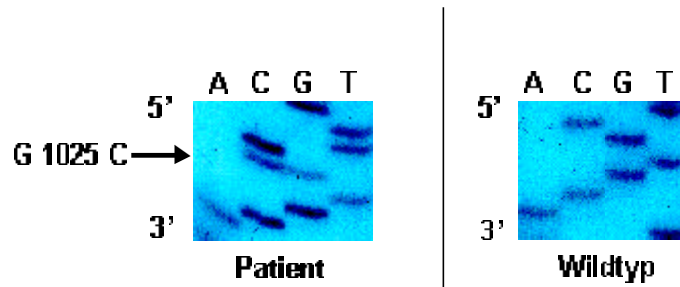


Abb. 5.3.1.2: Sequenz der Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch G 1025 C, Cys 342 Ser im Vergleich zum Wildtyp.

- 3.) Die Punktmutation **G 1032 A**, **GCG->GCA**, die zu dem synonymen Austausch **Ala 344 Ala** führt, bei 2 miteinander verwandten Patienten. Dieser synonyme Aminosäureaustausch führt zum alternativen „splicing“ des FGFR 2 Transkripts und dadurch zum Verlust von 17 Aminosäuren (Jabs et al., 1994; Reardon et al., 1994; Rutland et al., 1995; Steinberger et al., 1996b, 1998; Xiang et al., 1995). Beide untersuchten Patienten zeigten phänotypisch Merkmale, die auf ein Crouzon-Syndrom hinwiesen, wie Exorbitismus, leichte Stirnvorwölbung und Mittelgesichtshypoplasie. Bei einem der Beiden wurde eine unilaterale Synostose der Coronarnaht diagnostiziert.

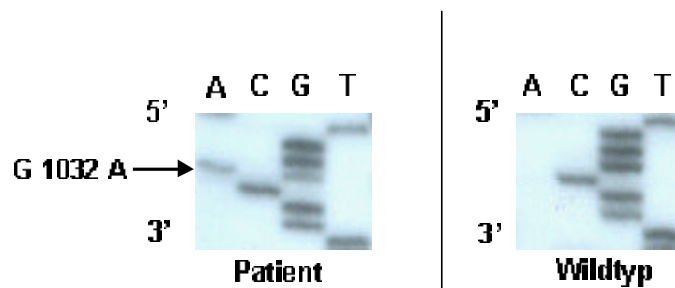


Abb. 5.3.1.3: Sequenz einer Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch G 1032 A, Ala 344 Ala im Vergleich zum Wildtyp.

- 3.) Der Nukleotidaustausch **C 1040 G**, TCT->TGT, **Ser 347 Cys** bei einem Patienten mit einem Pfeiffer-ähnlichen Phänotyp.

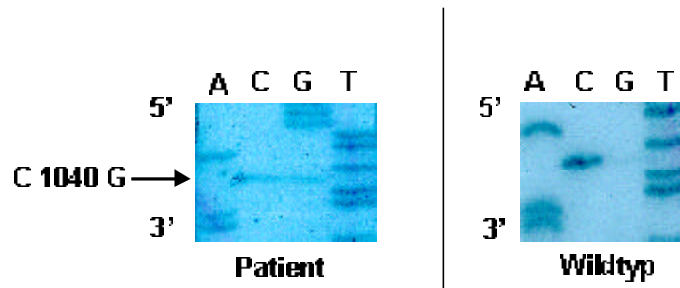


Abb. 5.3.1.4: Sequenz der Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch C 1040 G, Ser 347 Cys im Vergleich zum Wildtyp.

#### **5.4 Zusammenfassung der nachgewiesenen Mutationen in der Ig III-Domäne von FGFR 2**

In der Ig III Domäne von FGFR 2 konnte bei 25 von 216 Patienten eine Mutation nachgewiesen werden. Von diesen 25 Mutationen waren 2 familiär, die übrigen 23 traten *de novo* auf. 42 % der in der vorliegenden Arbeit nachgewiesenen Mutationen wurden damit in der Ig III-Domäne von FGFR 2 detektiert.

## 5.5 Mutationen in FGFR 1

### 5.5.1 Exon 5 von FGFR 1

Bisher ist in FGFR 1 nur eine einzige Mutation in Exon 5 nachgewiesen worden (Muenke et al., 1994). In der vorliegenden Arbeit wurde bei einem Patienten, sowie bei dessen ebenfalls auf den Defekt hin untersuchten Mutter der Nukleotidaustausch **C 758 G, CCT->CGT, Pro 253 Arg** nachgewiesen. Die Untersuchung des Fragments wurde zunächst mit Hilfe der SSCP-Analyse durchgeführt. Die beiden DNA-Proben, die einen „band-shift“ aufwiesen wurden im Anschluß an die SSCP-Analyse sequenziert (4.3.2, 4.6).

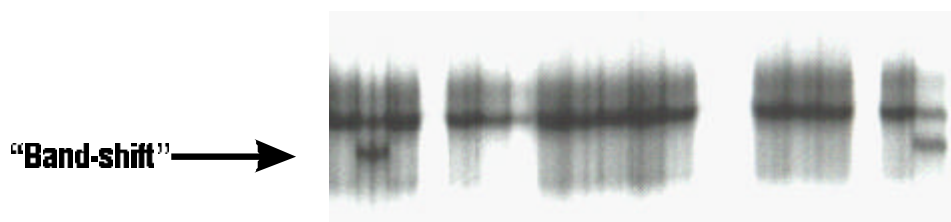


Abb. 5.5.1.1: SSCP-Analyse von Exon 5 von FGFR 1 mit zwei „band-shifts“.

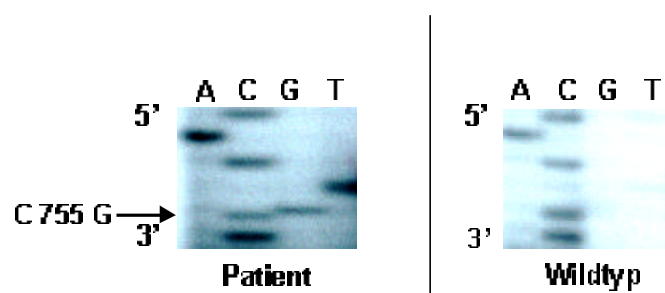
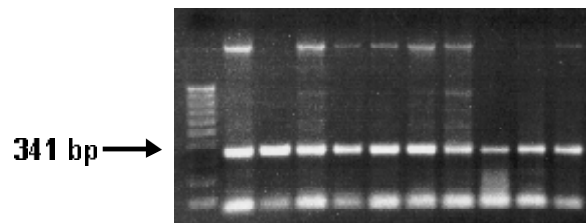


Abb. 5.5.1.2: Sequenz einer Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch C 755 G, Pro 252 Arg im Vergleich zum Wildtyp.

## 5.6 Mutationen in FGFR 3

### 5.6.1 Exon 7 von FGFR 3

Bis zum Beginn dieser Arbeit gab es keine akzeptable Methode, um dieses Exon vollständig zu untersuchen, was vorwiegend am hohen GC-Gehalt und der Größe des Fragments lag. Mit 341 bp überstieg das Exon den möglichen Detektionsbereich der SSCP-Analyse. Jeweils 5 µl der Amplifikate wurden auf einem 1 %-igen Agarose Gel ausgetestet:



*Abb. 5.6.1.1: Austestung von 5 µl PCR-Amplifikat auf dem Agarosegel.*

Da die Größe des Fragments eine Untersuchung mittels SSCP-Analyse unmöglich machte, wurden neue Primerpaare entworfen, welche das Exon in zwei Teile teilten (3.9).

Die Teilfragmente wurden danach mit Hilfe der SSCP-Analyse (4.3.3) untersucht.. Mit der zu untersuchenden Patienten-DNA wurde gleichzeitig eine Kontrollprobe aufgetragen, welche die genannte **Pro 250 Arg** Mutation trug. Diese Mutation liegt im vorderen Bereich des Exons, so dass bei der Amplifikation der zweiten Hälfte von Exon 7 kein „band-shift“ zu erwarten war. Die Positivkontrolle sollte Gewissheit über die Sensitivität der Untersuchung geben.



*Abb. 5.6.1.2: SSCP-Analyse der ersten Hälfte von Exon 7 von FGFR 3 mit zwei „band-shifts“.*

Die SSCP-Analyse erbrachte kein zufriedenstellendes Ergebnis, da die „band-shifts“ auch bei der Kontroll-DNA nicht deutlich zu sehen waren. Somit mußte zunächst eine Methode gefunden werden, mit der sowohl die bereits beschriebene Pro 250 Arg Mutation nachgewiesen werden konnte, als auch mögliche weitere Mutationen in diesem Fragment. Um die Patienten-DNA auf den Nukleotidaustausch C 749 G, der der Pro250 Arg Mutation zugrunde liegt, zu untersuchen, wurde zunächst der Verdau mit der Restriktionsendonuclease Nci I wie im Methodenteil beschrieben (4.8), gewählt (Muenke et al., 1997; Graham et al., 1998; Lajeunie et al., 1999; Reardon et al., 1997; Bellus et al., 1996).

Die Restriktionsendonuklease Nci I erkennt die Schnittstelle 5'.....CC <sup>^</sup> CGG....3'. Sie schneidet das unverdaut 351 bp große PCR-Produkt vom Wildtyp einmal in zwei 319 bp bzw. 32 bp große Anteile. Der Nukleotidaustausch C 749 G erzeugt eine weitere Schnittstelle, wodurch das 319 bp große Fragment in zwei weitere 168 bp bzw. 151 bp große Teile geschnitten wird (Reardon et al., 1997). Diese beiden Teile waren auf dem Agarosegel häufig nur als eine Bande erkennbar, da sich die Auflösung der dazwischenliegenden 17 bp als schwierig erwies.

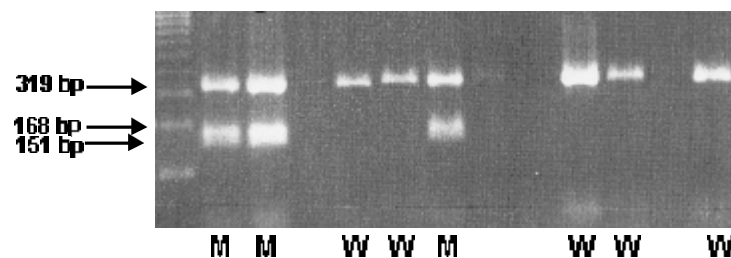


Abb. 5.6.1.3: Restriktionsverdau von Exon 7 von FGFR 3 mit Nci I.  
W = Wildtyp; M = Mutante.

Die Sequenzierung zur Bestätigung einer Mutation wurde radioaktiv (4.6.1) oder mit fluoreszierenden Primern (4.6.2) am automatischen Sequenziergerät durchgeführt. Da das Fragment größer als 300 bp ist, eignete sich die automatische Methode besser.

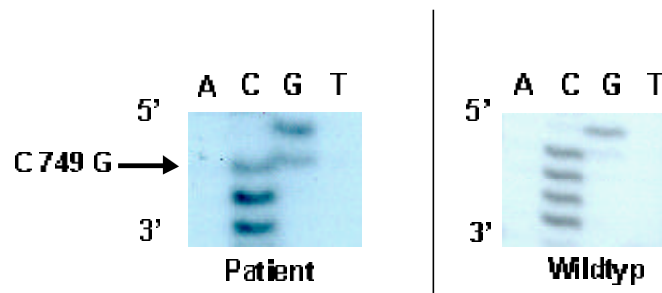


Abb. 5.6.1.4: Sequenz einer Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch C 749 G, Pro 250 Arg im Vergleich zum Wildtyp.

Mit Hilfe des Restriktionsverdaus konnte bei 25 nicht verwandten Patienten (12 %) und 3 vermeintlich nicht Betroffenen (5 %) der Nukleotidaustausch **C 749 G, CCG->CGG, Pro 250 Arg** nachgewiesen werden. 42 % aller nachgewiesenen Mutationen in dieser Arbeit entfielen auf diesen Nukleotidaustausch. Bei 17 Patienten war die Mutation familiär bedingt, bei einem trat sie sporadisch auf, bei den Übrigen konnte dazu keine Aussage gemacht werden. Phänotypisch zeigten 9 der Patienten ein unklares Craniosynostosesyndrom, 9 ein Crouzon Syndrom, 2 eine Plagiocephalie, und 3 einen Pfeiffer-ähnlichen Phänotyp. Bei den anderen Patienten wurden bei der Einsendung des Untersuchungsmaterials keine genauen Angaben zum Phänotyp gemacht.

### 5.6.2 Exon 9 von FGFR 3

In Exon 9 von FGFR 3 ist bisher keine Mutation beschrieben worden. Der Bereich wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der SSCP-Analyse untersucht. Bei 2 DNA-Proben trat ein „band-shift“ auf. Diese wurden daraufhin sequenziert. Es fanden sich bei jedem Patienten je 2 Intronmutationen, nämlich **C->T + 5 Intron 9 und + 8 Intron 9 insCT** (Nomenklatur nach Antorakakis et al., 1999). Einer von ihnen zeigte einen Pfeiffer-ähnlichen Phänotyp, bei dem anderen wurden keine Angaben zum Phänotyp gemacht. Die Testung gesunder Kontroll-DNA ergab dieselben Mutationen bei 2 Gesunden.

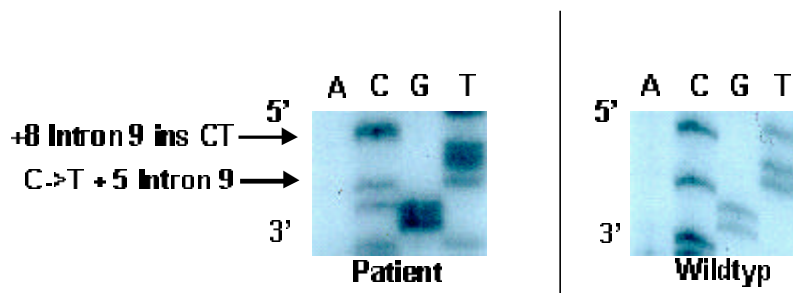


Abb. 5.6.2.1: Sequenz einer Patienten-DNA mit den beiden Intronmutationen +8 Intron 9 ins CT und C->T +5 Intron 9 im Vergleich zum Wildtyp.

### 5.6.4 Exon 10 von FGFR 3

In der vorliegenden Arbeit wurde bei einem Patienten der Nukleotidaustausch **C 1172 A, GCG->GAG, Ala 391 Glu** (Meyers et al., 1995; Wilkes et al., 1996) nachgewiesen. Der Patient zeigte phänotypisch ein Crouzon- Syndrom, sowie eine Acanthosis nigricans. Patienten-DNA, bei der ein „band-shift“ auftrat, wurde sequenziert. Dabei ließ sich die oben genannte Mutation nachweisen.

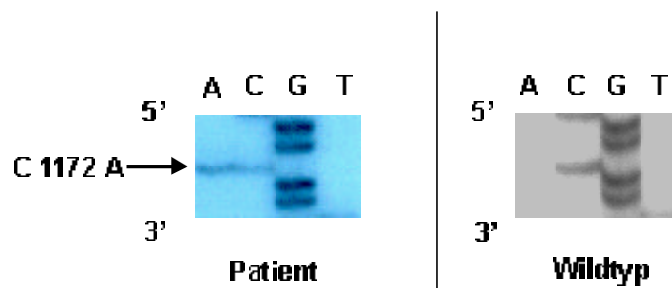
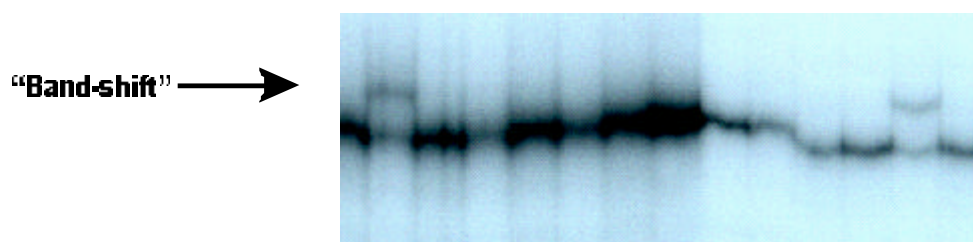


Abb. 5.6.3.1: Sequenz der Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch C 1172 A, Ala 391 Glu im Vergleich zum Wildtyp.

### 5.6.3.1 Die Mutation **Phe 384 Leu**: Ein Polymorphismus?

Bei der Untersuchung der transmembranen Domäne von FGFR 3 mittels SSCP-Analyse und anschließender Sequenzierung nach den oben beschriebenen Bedingungen, fand sich außer der Ala 391 Glu Mutation bei zwei weiteren nicht verwandten Patienten der Nukleotidaustausch **T 1150 C**, welcher zum Aminosäureaustausch von **Phenylalanin** an Stelle **384** zu **Leucin** führt. Dieser Austausch wurde von Golla et al. (1997) bei 3 Mitgliedern einer türkischen Familie beschrieben, wovon 2 phänotypisch unauffällig schienen, jedoch trat die Mutation bisher bei keinem Deutschen auf. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Mutation nun erstmals bei einer deutschen Familie und einem nicht mit ihr verwandten Schweizer nachgewiesen werden. Ein Kind der deutschen Familie zeigte eine Scaphocephalie.



*Abb. 5.6.3.1.1: SSCP-Analyse von Exon 10 von FGFR 3 mit zwei „band-shifts“.*

Desweiteren wurde die Mutation bei der nicht betroffenen Schwester sowie der Mutter der Patientin gefunden. Der Basenaustausch fand sich außerdem beim Vater der Mutter und bei zwei seiner Geschwister. Diese Personen waren phänotypisch ebenfalls unauffällig. Der zweite nicht mit der Familie verwandte Patient war als „Crouzon-Patient“ diagnostiziert. Diese Zuordnung erwies sich jedoch nach Analyse des Fotos als falsch. Der Patient war phänotypisch unauffällig. Offenbar handelte es sich entweder um eine Fehldiagnose, oder einen Übertragungsfehler bei der Beschriftung der uns zugegangenen Blutprobe.

Die DNA-Proben aller Personen, die den Nukleotidaustausch T 1150 C trugen, wurden in den bereits genannten Bereichen der FGF-Rezeptorgene 1, 2 und 3 getestet, es konnte jedoch kein anderer Nukleotidaustausch nachgewiesen werden.

Auffällig war auch, daß die Mutation weder bei einem weiteren der untersuchten 216 Patienten, noch bei einer der 106 gesunden Kontrollproben auszumachen war.

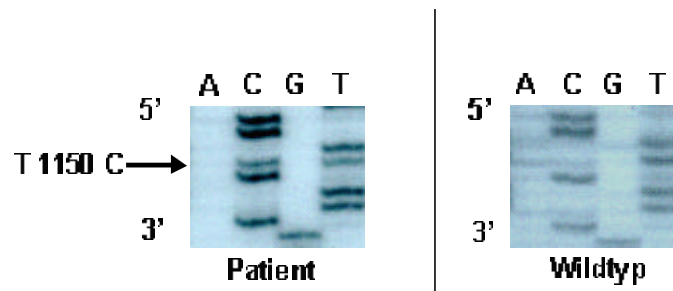


Abb. 5.6.3.1.2: Sequenz einer Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch T 1150 C, Phe 384 Leu im Vergleich zum Wildtyp.

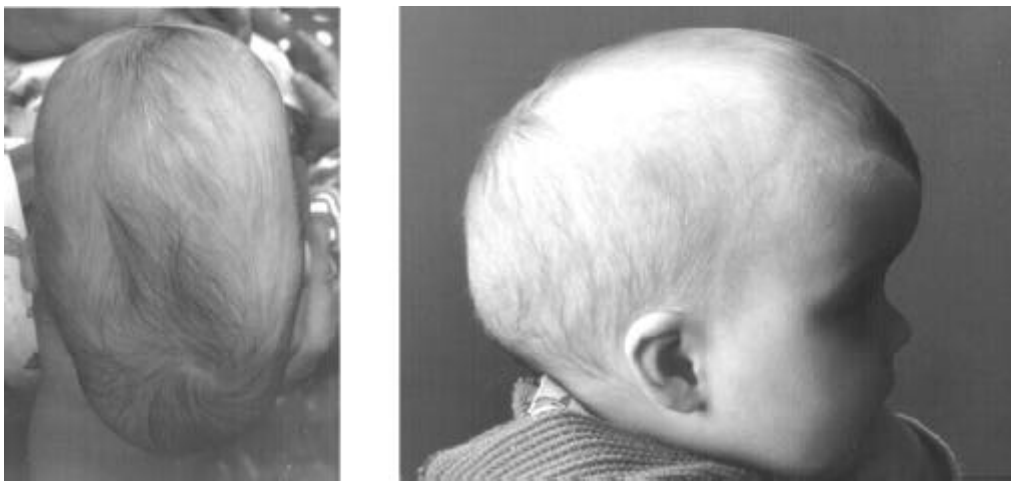


Abb. 5.6.3.1.3: Foto der Patientin mit Scaphocephalie.

## **5.7 Die Denaturierende Gradienten Gel Elektrophorese (DGGE) –Eine neue Methode bei der Suche nach weiteren Mutationen in den FGF Rezeptorgenen1, 2 und 3**

Die DGGE (4.3.4) bietet im Vergleich zur SSCP-Analyse (4.3.3) entscheidende Vorteile, die sie zur Methode der Wahl bei der weiteren Suche nach Mutationen in den FGF-Rezeptorgenen machte:

- 1.) Sie ermöglicht die Untersuchung großer Fragmente zwischen 800 und 1000 bp (Sheffield et al., 1989).
- 2.) Es ist kein Einsatz von Radioaktivität zur Markierung erforderlich, die Gele werden gefärbt (4.3.4).
- 3.) Die Sensitivität soll nahezu 100 % betragen (Sheffield et al., 1989; Muyzer et al., 1996; Macek et al., 1997).
- 4.) Der Unterschied zwischen Mutante und Wildtyp ist eindeutig zu erkennen.

Nachteile sind die komplizierte und teure Apparatur, sowie die Synthese teurer GC-Primer (Sheffield et al., 1989; Fodde und Losekoot, 1994; Muyzer et al., 1996).

### **5.7.1 Erste Schritte**

Um die DGGE nach den bisherigen Beschreibungen der Literatur für die FGF-Rezeptorgene etablieren zu können, wurde zunächst ein kleines Fragment, welches sich konsistent amplifizieren ließ, gewählt.

Hier bot sich Exon 9 von FGFR 2 an. Das Amplifikat war 228 bp groß und mit der SSCP problemlos zu untersuchen. Die Entscheidung, welcher der bereits vorhandenen Primer die GC-Klammer tragen sollte, wurde mit Hilfe des Computerprogramms MELT87™ (Lerman et al., 1987) getroffen. Mit diesem Programm kann die Klammer experimentell an den Primer für Strang oder Gegenstrang gehängt werden, um dann nach dem entstehenden Schmelzprofil zu entscheiden, welcher der beiden als GC-Primer geeigneter erscheint. Dabei muß darauf geachtet werden, dass die GC-Klammer den Bereich mit der höchsten Schmelztemperatur darstellt, und die übrige Kurve keinen plötzlichen Abfall in ihrem Verlauf oder am Ende

zeigt. Außerdem gibt die Schmelzkurve die mittlere Schmelztemperatur ( $T_m$ ) für das jeweilige Fragment an. Die  $T_m$  war zunächst wichtig, um den geeigneten Gradienten berechnen zu können. Die Sequenz der GC-Klammer ist willkürlich, ihre Platzierung nicht. Für Exon 9 wurde die GC-Klammer an den Primer für den Hin-Strang hinzugefügt. Die PCR folgte den für dieses Fragment üblichen Amplifikationsbedingungen mit den in 4.3.4 beschriebenen anschließenden Schritten zur Heteroduplexbildung.

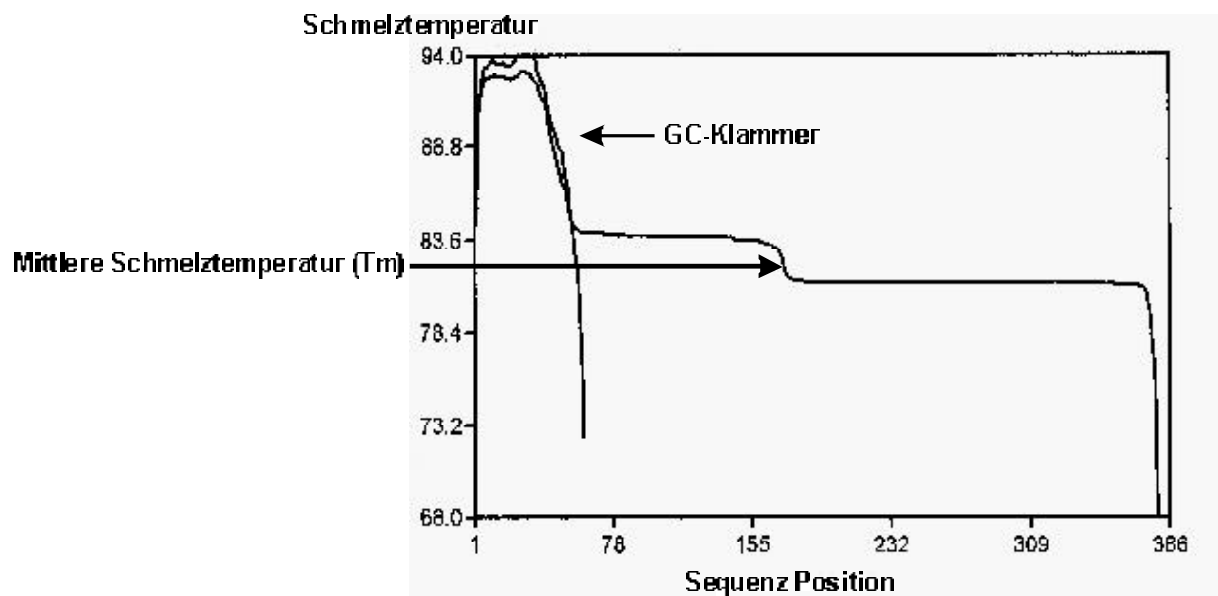


Abb. 5.7.1.1: Beispielkurve aus MELT87™.

Nach der Formel  $[(3,2 \times T_m) - 182,4 = \text{optimaler Harnstoffgehalt in \%}]$  wurde der entsprechende Gradient bestimmt. Das Ergebnis der Gleichung entspricht der Harnstoffkonzentration, bei der 50 % des Fragments aufgeschmolzen sind (Lerman et al., 1987; Fodde et al., 1994). Der Gradient für das parallele Gradientengel sollte immer im Bereich zwischen 15 % über und unter dem erhaltenen Wert liegen (Fodde et al., 1994). Die Formel gilt unter der Voraussetzung, dass Gelläufe bei einer Puffertemperatur von 60 °C durchgeführt werden. Bei dem für Exon 9 von FGFR 2 errechneten optimalen Harnstoffgehalt von 47,36 % bedeutete das ein Gel mit einem Harnstoffgradienten zwischen 32 und 62 %.

Für den ersten Gellauf wurden die von Zschocke et al. (1997) für das Phenylalanin-Hydroxylase-Gen beschriebenen Bedingungen gewählt, wobei der Gradient, welcher mit 0-80 % angegeben war, auf 0-100 % erweitert wurde, um ein maximales Gradientenspektrum zu erzielen. Nach den Angaben des Autors erschien ein Optimieren durch Einengung des

Gradienten nicht notwendig. Die Acrylamidkonzentration der beiden Stammlösungen betrug 8 %. Das Gießen des parallelen Gradientengels, sowie die Elektrophoresebedingungen wurden bereits in 4.3.4.3 beschrieben.

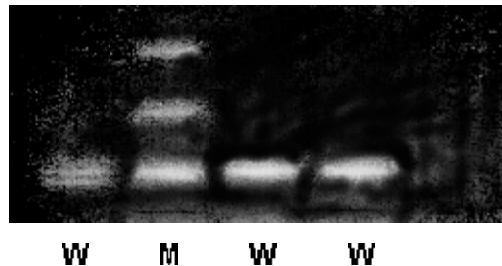
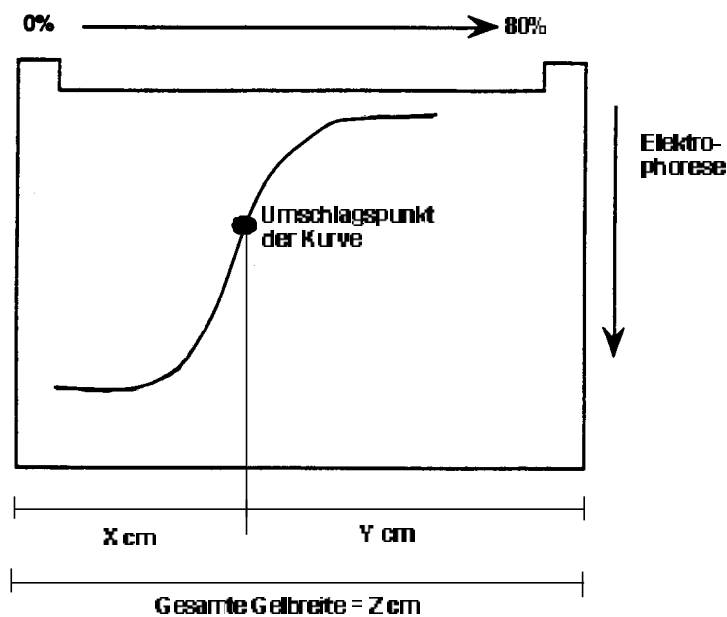


Abb. 5.7.1.2: Parallele DGGE von Exon 7 von FGFR 2. W = Wildtyp; M = Mutante.

#### 5.7.2 Untersuchung weiterer Fragmente

Nach dem obigen Verfahren erschien die Methode recht einfach. Der optimale Harnstoffgradient für Exon 7 von FGFR 2 und 3 wurde mit der Formel: [ optimaler Harnstoffgradient % =  $(3,2 \times T_m) - 182,4$  ] ebenfalls nach der Schmelzkurve im Computerprogramm bestimmt. Der Versuch, die parallelen Gele danach anzufertigen, scheiterte jedoch daran, dass keine scharfen Banden mehr zustande kamen. Daraufhin wurde das Gradientenspektrum von 0-100 % zur Optimierung in kleinere Bereiche, z.B von 0-30 %, 30-60 % und 60-100 % eingengt. Auch dies erbrachte nicht den gewünschten Effekt. Schließlich wurde der Versuch gemacht, den Harnstoffgradienten mittels Perpendikulargel (4.3.4) zu bestimmen. Dabei wurde grundsätzlich nach dem gleichen Prinzip verfahren. Der Gradient verlief senkrecht zur Elektrophoreserichtung und stieg immer von links nach rechts von 0-80 % an. Die Acrylamidkonzentration betrug dabei immer 6,5 % (Myers et al., 1997).



Der optimale Gradient wurde nach den Formeln:  $X \text{ cm} : Z \text{ cm} = W$

$W \times 80 \% = \text{optimaler Harnstoffgradient in \% berechnet.}$

Das Gradientengel wurde daraufhin im Bereich von 15 % über bis 15 % unter dem errechneten Wert gegossen.

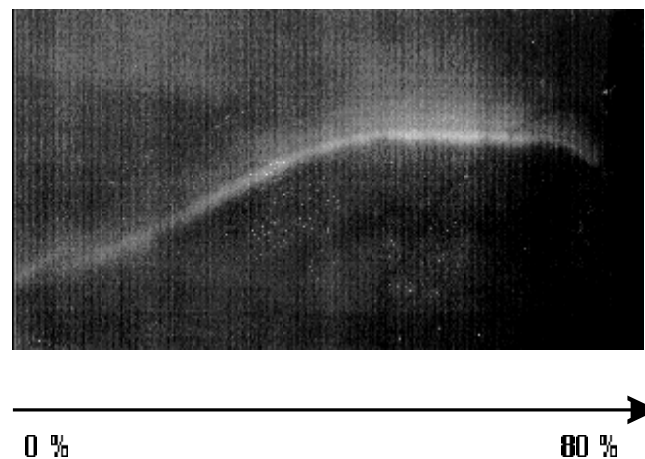
Wurde der Gradient mit dem Perpendikulargel ermittelt, konnten im parallelen DGGE-Gel scharfe Banden erzielt werden. Dies galt für alle getesteten Fragmente. Der Vergleich mit dem durch die Schmelzkurve in MELT87™ bestimmten Gradienten zeigte in allen Fällen, mit Ausnahme von Exon 9 von FGFR 2 erhebliche Differenzen (Tab.5.7.2.1). Wurde der Gradient mit MELT87™ bestimmt, war er in der Regel um 20-40 % höher als nach Bestimmung mittels Perpendikulargel. Einzige Ausnahme war Exon 9 von FGFR 2. Hier betrug der errechnete Gradient 47,36 %, der durch das Perpendikulargel ermittelte 41,14 %.

| Untersuchter Bereich        | Optimaler Harnstoffgradient<br>% nach MELT87™ | Optimaler Harnstoffgradient<br>% nach Perpendikulargel |
|-----------------------------|-----------------------------------------------|--------------------------------------------------------|
| FGFR 2 Exon 1               | 62,76 %                                       | 37,9 %                                                 |
| FGFR 2 Exon 7               | 61,44 %                                       | 44,4 %                                                 |
| <b><u>FGFR 2 Exon 9</u></b> | <b>47,36 %</b>                                | <b>41,14 %</b>                                         |
| <u>FGFR 3 Exon 7</u>        | 88,32 %                                       | 48,8 %                                                 |

*Tabelle 5.7.2.1 Ermittlung der optimalen Harnstoffgradienten auf unterschiedliche Weise.*

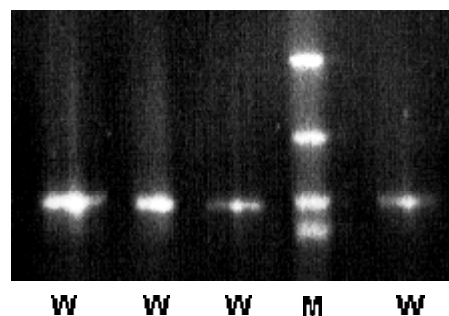
### 5.7.3 Untersuchung von Exon 7 von FGFR 2 mit Hilfe der DGGE

Zunächst wurden die Bereiche, welche bereits mit der SSCP-Analyse untersucht worden waren auf die DGGE Methode umgestellt, um eine höhere Sensitivität zu erzielen. Hier bot sich zunächst Exon 7 von FGFR 2 an. Der entsprechende GC-Primer wurde über MELT87™ ausgewählt ( 3.7 ). Die Amplifikationsbedingungen für dieses Fragment unter Zusatz der Schritte zur Heteroduplexbildung, sowie die Anfertigung des Perpendikulargels sind im Methodenteil beschrieben. (4.3.4 ).



*Abb. 5.7.3.1: Perpendikulargel von Exon 7 von FGFR 2.*

Die Berechnung des Gradienten nach der oben genannten Formel ergab einen optimalen Harnstoffgradienten von 44,4 %. Das parallele Gradientengel wurde daraufhin im Bereich von 30-60 % angefertigt (Myers et al., 1997; 4.3.4).



*Abb.5.7.3.2: Parallele DGGE von Exon 7 von FGFR 2. W = Wildtyp; M = Mutante.*

Durch Analyse auf dem parallelen Gel konnten alle Mutationen, mit Ausnahme der beiden Apert-Mutationen Ser 252 Trp und Pro 253 Arg, detektiert werden. Es wurde jetzt die GC-Klammer zunächst an den Primer für den Gegenstrang gehängt (3.7). Dieser wies die gleiche Perpendikulargelkurve und damit den gleichen Gradienten auf wie der zuerst verwendete GC-Primer. Trotzdem konnten keine scharfen Banden erzielt werden. Ein Vergleich der beiden MELT87™ -Kurven miteinander zeigte einen steilen Abfall der Kurve nach Hinzufügen des GC-Primers an den Gegenstrang. Dieser steile Kurvenabfall schien damit ein limitierender Faktor zu sein. Es wurde nun ein komplett neuer Primer konstruiert, der weiter im Intron lag als der bisher verwendete. Dieser konnte jedoch im Rahmen dieser Arbeit nicht mehr getestet werden.

#### 5.7.4 Untersuchung von Exon 7 von FGFR 3 mit Hilfe der DGGE

Die DGGE sollte die Möglichkeit schaffen, Exon 7 von FGFR 3 komplett untersuchen zu können. Zum GC-Primer wurde der Primer für den Strang bestimmt (3.7). Die Amplifikation erfolgte wie bereits geschildert.

Die Berechnung mittels Perpendikulargel ergab einen optimalen Harnstoffgradienten von 48,8 %. Das parallele Gradientengel wurde danach im Bereich zwischen 35-65 % gegossen.



*Abb.5.7.4.1: Perpendikulargel von Exon 7 von FGFR 3.*

Die aufgetragenen Kontroll-DNA-Proben als Träger der Pro 250 Arg Mutation ergaben keinen „band-shift“ im Gel, so dass hier das gleiche Phänomen auftrat wie bei Exon 7 von

FGFR 2. Die Pro 250 Arg Mutation liegt wenige Basenpaare von der Intron/Exon Grenze entfernt. Der vordere Teil des Fragments kann also auch hier bei Verwendung des beschriebenen Primers als GC-Primer nicht untersucht werden. Im Gegensatz zu FGFR 2, wo der Gegenstrang-Primer als GC-Primer ungeeignet war, konnte die Klammer in diesem Fall mit Erfolg an das 3'-Ende des anderen Primers gehängt werden (3.7). Durch diese Maßnahme konnte nun unter wechselnder Verwendung beider Primer als GC-Primer das gesamte Exon untersucht werden. Im Verlaufe dieser Arbeit wurden jedoch keine weiteren Mutationen außer der beschriebenen Pro 250 Arg gefunden.

#### 5.7.5 Kritische Punkte bei der Durchführung der DGGE

1. Jedes Fragment sollte zunächst mit MELT87™ analysiert werden, um den idealen GC-Primer ermitteln zu können.
2. Der GC-Primer muß der Bereich mit der höchsten Schmelztemperatur sein.
3. Die Schmelzkurve darf keinen spontanen Abfall beinhalten und muss möglichst gleichmäßig verlaufen.
4. Es empfiehlt sich, die Ermittlung des optimalen Harnstoffgradienten über ein Perpendikulargel vorzunehmen und den in 5.7.2 beschriebenen Berechnungen zufolge danach das parallele Gradientengel zu giessen. Tabelle 5.7.2.1 zeigt die Unterschiede in der Gradientenberechnung nach dem Perpendikulargel und der Schmelzkurve in MELT87™ auf.
5. Beim Lauf eines parallelen Gels sollten nach Möglichkeit 2 positive Kontrollproben und 2 negative Kontrollproben mit aufgetragen werden, um den erfolgreichen Gellauf zu überprüfen.
6. Die in 4.3.4.1 aufgezeigte Tabelle gilt als Richtlinie für die Elektrophoresedauer. Beim ersten Lauf eines parallelen Gels empfiehlt es sich trotzdem, zunächst wenige Testproben zeitlich versetzt aufzutragen, um die ideale Elektrophoresedauer feststellen zu können.
7. Um sicherzugehen, dass das gesamte Fragment detektiert wird, muß bei der Auswahl der Primer darauf geachtet werden, dass sie möglichst weit entfernt von der Intron/Exon Grenze liegen. Ist dies nicht möglich, werden beide Primer abwechselnd als GC-Primer eingesetzt. Dies erfordert allerdings die 2-malige Testung aller Patienten.

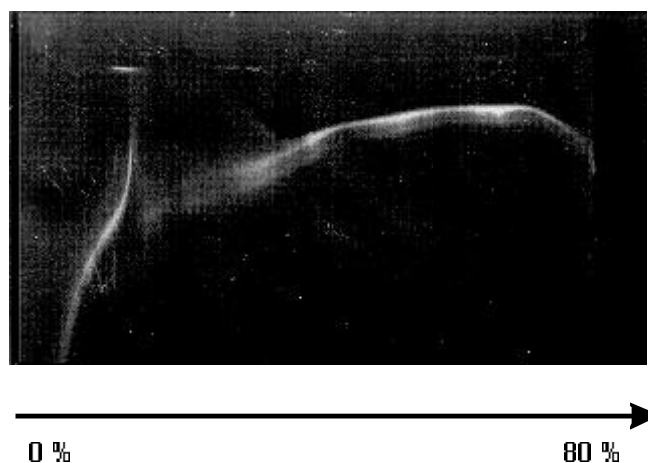
## **5.8 Die Untersuchung neuer Bereiche der FGF-Rezeptorgene mit SSCP-Analyse und DGGE**

### **5.8.1 Die Ig I-Domäne von FGFR 2**

Wie die beiden anderen Ig-Domänen wird auch die Ig I-Domäne von 2 Exons kodiert. Das Amplifikat von Exon 1 war nach den ausgewählten Primern 381 bp groß, das von Exon 2 155 bp. Die Untersuchung von Exon 1 wurde mit DGGE durchgeführt, jene von Exon 2 durch SSCP-Analyse.

#### **5.8.1.1 Exon 1 von FGFR 2**

Die Amplifikationsbedingungen für dieses Fragment sind im Methodenteil beschrieben. Das Perpendikulargel ergab einen optimalen Harnstoffgradienten von 37,9 %. Das parallele Gradientengel wurde daraufhin im Bereich zwischen 20-50 % angefertigt (4.3.4). Die Patientin zeigte phänotypisch ein Crouzon-Syndrom. Die darauffolgende Sequenzierung ergab den Nukleotidaustausch **G 294 A, ACG->ACA**, welcher zu dem synonymen Aminosäureaustausch **Thr 98 Thr** führt. Dieser Austausch konnte bei keinem der weiteren 106 untersuchten Patienten nachgewiesen werden, jedoch bei 4 von 114 Kontrollpersonen und bei dem nicht betroffenen Vater der Patientin.



*Abb.5.8.1.1.1: Perpendikulargel von Exon 1 von FGFR 2.*

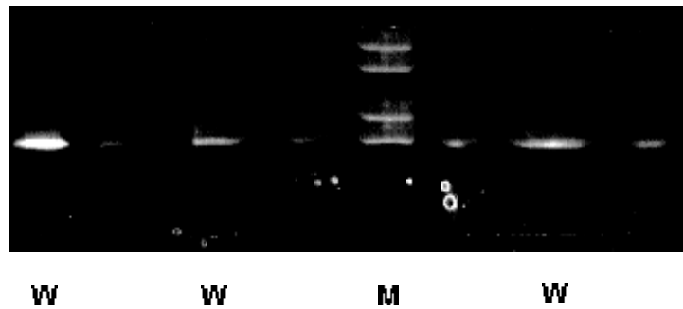


Abb.5.8.1.1.2: Parallele DGGE von Exon 1 von FGFR 2. W = Wildtyp; M = Mutante.

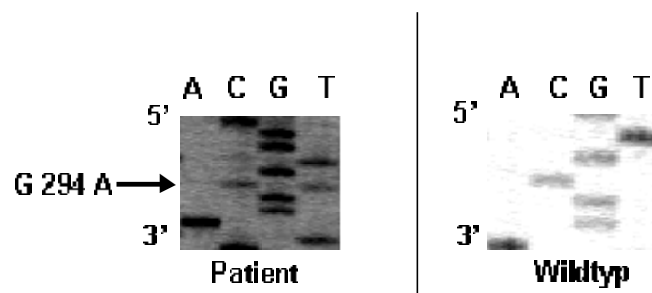


Abb. 5.8.1.1.3: Sequenz einer Patienten-DNA mit dem Nukleotidaustausch G 294 A, Thr 98 Thr im Vergleich zum Wildtyp.

Darüberhinaus wurden keine weiteren Basenaustausche gefunden.

#### 5.8.1.2 Exon 2 von FGFR 2

Exon 2 kodiert für die zweite Hälfte der Ig I-Domäne. Mit 155 bp war dieses Fragment problemlos mit der SSCP-Analyse zu untersuchen (4.3.3).

Bei 77 untersuchten Patienten-DNA-Proben konnte kein „band-shift“ detektiert werden.

### 5.9 Suche nach Mutationen in der Ig IIIb-Isoform von FGFR 2

Nachdem in der Ig I-Domäne keine weiteren Mutationen gefunden wurden, wurde die Untersuchung in der Ig IIIb „splice-Variante“ von FGFR 2 fortgesetzt. Exon 8 kodiert für diesen Teil des Rezeptors. Das Fragment war 230 bp groß.

Es konnte in einem Fall ein „band-shift“ detektiert werden. Die Patientin zeigte phänotypisch ein unklares Craniosynostosesyndrom. Die anschließende Sequenzierung (4.3.2; 4.6) ergab den Nukleotidaustausch in Intron 8 [ c (+10) g ].

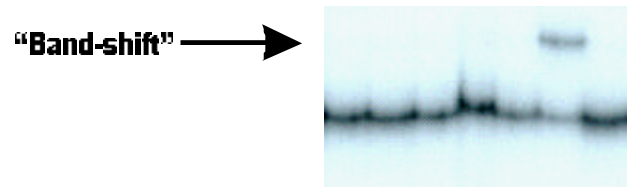


Abb. 5.9.1: SSCP-Analyse von Exon 8 von FGFR 2 mit „band-shift“.

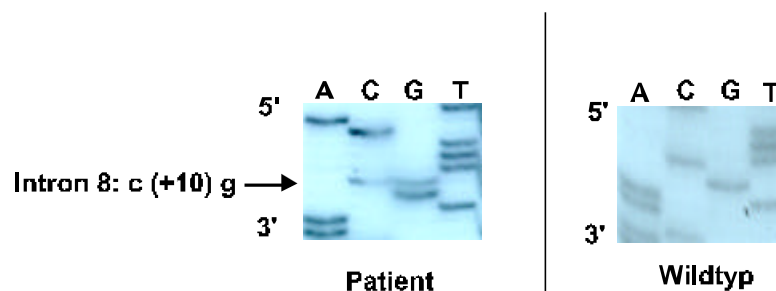


Abb. 5.9.2: Sequenz der Patienten-DNA mit der Intronmutation Intron 8: c (+10) g im Vergleich zum Wildtyp.

Ein weiteres betroffenes Familienmitglied der Patientin sowie zwei untersuchte nicht betroffene Familienangehörige wiesen diesen Nukleotidaustausch nicht auf, ebensowenig 91 nicht miteinander verwandte Patienten.

### **5.10 Tabellarischer Überblick über die Häufigkeit einzelner Mutationen in der vorliegenden Arbeit**

| <b>Rezeptor</b> | <b>Exon</b> | <b>Mutation</b>                       | <b>Phänotyp</b>                   | <b>Publikationen</b>                                                                                                                                                                   | <b>Häufigkeit</b>   |
|-----------------|-------------|---------------------------------------|-----------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------|
| FGFR 1          | 7           | C 488 G,<br>Pro 163 Arg               | PS                                | Muenke et al., 1994; Meyers et al., 1996                                                                                                                                               | 0,5 %               |
| FGFR 2          | 1           | G 294 A,<br>Thr 98 Thr                | CS                                | keine                                                                                                                                                                                  | 0,5 %               |
| FGFR 2          | 7           | C 755 G,<br>Ser 252 Trp               | AS                                | Meyers et al., 1996; Wilkie et al., 1995; Park et al., 1995b; Slaney et al., 1996; Steinberger et al., 1998                                                                            | 5 %                 |
| FGFR 2          | 7           | C 758 G,<br>Pro 253 Arg               | AS                                | Meyers et al., 1996; Wilkie et al., 1995; Park et al., 1995b; Slaney et al., 1996; Steinberger et al., 1998                                                                            | 2,7 %               |
| FGFR 2          | 7           | A 866 C,<br>Gln 289 Pro               | CS                                | Oldridge et al., 1995; Meyers et al., 1996; Gorry et al., 1995; Steinberger et al., 1998                                                                                               | 0,5 %               |
| FGFR 2          | 9           | G 1025 A,<br>Cys 342<br>Tyr/Ser       | CS, PS                            | Reardon et al., 1994; Rutland et al., 1995; Steinberger et al., 1995, 1998; Park et al., 1995a; Schell et al., 1995; Oldridge et al., 1995; Meyers et al., 1996; Schwartz et al., 1996 | 1,4 % bzw.<br>0,5 % |
| FGFR 2          | 9           | G 1032 A,<br>Ala 344 Ala              | CS                                | Jabs et al., 1994; Reardon et al., 1994; Rutland et al., 1995; Steinberger et al., 1996b; Xiang et al., 1995                                                                           | 0,5 %               |
| FGFR 2          | 9           | C 1040 G,<br>Ser 347 Cys              | PS                                | Jabs et al., 1994; Oldridge et al., 1995; Pulleyn et al., 1996; Steinberger et al., 1998                                                                                               | 0,5 %               |
| FGFR 2          | Intron 8    | C->G +<br>10 Intron 8                 | UCS                               | keine                                                                                                                                                                                  | 0,5 %               |
| FGFR 3          | 7           | C 749 G,<br>Pro 250 Arg               | UCS, CS,<br>PS                    | Bellus et al., 1996; Graham et al., 1997; Lajeunie et al., 1999; Muenke et al., 1997; Reardon et al., 1997                                                                             | 11,5 %              |
| FGFR 3          | Intron 9    | C->T +<br>5 Intron 9;<br>+ 8 Intron 9 | PS                                | Keine                                                                                                                                                                                  | 1 %                 |
| FGFR 3          | 10          | C 1172 A,<br>Ala 391 Glu              | CS mit<br>Acanthosis<br>nigricans | Meyers et al., 1995; Wilkes et al., 1996                                                                                                                                               | 0,5 %               |
| FGFR 3          | 10          | T 1150 C,<br>Phe 384<br>Leu           | UCS                               | Golla et al., 1997                                                                                                                                                                     | 1 %                 |

( AS = Apert-Syndrom; CS = Crouzon-Syndrom; PS = Pfeiffer-Syndrom; UCS = unklares Craniosynostosesyndrom

Der Nukleotidaustausch C 749 G, Pro 250 Arg war die in der vorliegenden Arbeit am häufigsten nachgewiesene Mutation.

## **6 Diskussion**

Zytokine und ihre korrespondierenden Rezeptoren sind essenziell für die Proliferation und Differenzierung von Zellen. FGF's („fibroblast growth factors“) gehören zur Familie der Zytokine und fungieren als Liganden für spezifische FGF-Rezeptoren. Fibroblasten, epitheliale, und andere Zellen werden nach Stimulation mit Wachstumsfaktoren wie FGF zu Proliferation und Wachstum angeregt. Das Signal, welches die Zellen stimuliert, wird durch Rezeptoren, die die Zellmembran überspannen, vermittelt. FGF-Rezeptoren besitzen einen extrazellulären Anteil, eine transmembrane Domäne und eine zytoplasmatische Domäne mit intrinsischer Tyrosinkinaseaktivität (Plotnikov et al., 1999; Nicola et al., 1994). Sie gehören damit zu den Rezeptortyrosinkinasen. Vier Gene kodieren für die vier bisher bekannten FGF-Rezeptoren, die die Signale von 18 bisher bekannten Liganden ins Zellinnere vermitteln. Die Expression der FGF-Rezeptoren beschränkt sich auf bestimmte Gewebe (Nicola 1994). FGFR 1 und 2 vermitteln ein anaboles Signal zur Osteoblastendifferenzierung in cranialen Suturen und FGFR 3 einen inhibitorischen Effekt auf die Chondrozytendifferenzierung in den Wachstumsfugen der langen Röhrenknochen.

### **6.1 Mutationen in den FGF-Rezeptorgenen sind „gain-of-function“ Mutationen**

Als „gain of function“ Mutationen werden Mutationen bezeichnet, die eine Steigerung oder Veränderung der Funktion des Genprodukts zur Folge haben. Liegt eine Mutation in Form eines Basenaustauschs, einer Insertion oder Deletion vor, so kann ein FGF-Rezeptor konstitutiv aktiviert werden, oder aber die Dissoziation des Liganden wird durch die Mutation verzögert (Wilkie, 1997). Die konstitutive Aktivierung des Rezeptors bzw. die verzögerte Dissoziation des Liganden führt zur nicht-regulierten Stimulation der Zellen. Die Aktivität der Rezeptoren wird so durch die Mutationen gesteigert, was bedeutet, dass mehr Zellen zur Proliferation angeregt werden als üblicherweise notwendig wäre (Li et al., 1999). Diese Produktivitätssteigerung führt so zum vorzeitigen Verschluß cranialer Suturen und damit zur Entstehung der bei einer Craniosynostose vorhandenen Phänotypen. „Gain-of-function“ Mutationen in den FGF-Rezeptorgenen 1 bis 3 üben damit spezifische Effekte auf die Skelettentwicklung aus. Dies wird deutlich, wenn Mäusen experimentell FGF appliziert

wird und diese daraufhin gesteigerte Differenzierung von Osteoblasten in den cranialen Suturen zeigen (Anderson et al., 1998).

Eine Steigerung des Genprodukts wird auch bei den Mutationen im FGF-Rezeptor 3 Gen auf Chromosom 4 beobachtet, die zu Minderwuchs führen. Das Wolf-Hirschhorn Syndrom ist gekennzeichnet durch Deletion verschiedener Regionen von Chromosom 4p. Bei diesem Syndrom ist unter anderem die Region deletiert, die im Falle einer Mutation im FGFR 3 Gen für Achondroplasie verantwortlich ist. Patienten mit Wolf-Hirschhorn Syndrom zeigen jedoch keinen Minderwuchs. Der Verlust dieser Region kann also keinen Einfluß auf das Vorliegen einer Achondroplasie haben (Shiang et al., 1994; Deng et al., 1996). Mutationen, die Minderwuchs zur Folge haben, müssen diesen dominanten Phänotyp folglich durch Steigerung des Genprodukts („gain-of-function“) oder durch dominant-negativen Einfluß des defekten Genprodukts auf das normale verursachen. In verschiedenen Experimenten wurde bewiesen, dass FGFR 3 als Negativregulator für das Knochenlängenwachstum fungiert. Der intakte FGFR 3 bremst also das Wachstum der langen Röhrenknochen (Deng et al., 1996). Ist die Aktivität des Rezeptors durch „gain-of-function“ gesteigert, wird der Effekt verstärkt, was Minderwuchs in Form einer Achondroplasie (siehe 2.7.6), Hypochondroplasie (siehe 2.7.7) oder der letalen thanatophoren Dysplasie (siehe 2.7.8) zur Folge hat (Naski et al., 1996; Webster et al., 1996). Umgekehrt zeigten Mäuse ohne FGF-Rezeptor 3 im Experiment überlange Röhrenknochen (Martin 1998; Li et al., 1999). Dieses Phänomen wurde offensichtlich durch den Verlust des FGFR 3 Genprodukts erzeugt. Mutationen in den FGF-Rezeptorgenen 1 und 2 betreffen Knochen, die aus desmaler Ossifikation hervorgehen, Mutationen in FGFR 3 jedoch überwiegend solche aus endochondraler Ossifikation (Deng et al., 1996). Mutationen in kodierenden Regionen der FGF-Rezeptoren 1 bis 3 wurden bisher bei neun verschiedenen Skelettdysplasien des Menschen nachgewiesen (Li et al., 1999). Alle diese Erkrankungen werden autosomal-dominant vererbt. Phänotypisch zeigen die Patienten Craniosynostosen verschiedenster Ausprägung, in einigen Fällen außerdem Syndaktylien unterschiedlicher Schweregrade an Händen und Füßen.

Die Verminderung des Genprodukts wird als „loss-of-function“ bezeichnet (Li et al., 1999; Deng et al., 1996; Jabs, 1998). Ein dominanter Phänotyp kann theoretisch nicht nur durch Steigerung des Genprodukts („gain-of-function“), sondern auch durch seine Verminderung („loss-of-function“) entstehen (Deng et al., 1996). Ein Beispiel für den dominanten Effekt von „loss-of-function“ Mutationen ist das Saethre-Chotzen Syndrom (siehe 2.7.9). Dieses Syndrom geht mit mehreren Mutationen im TWIST-Gen einher. TWIST kodiert für einen

Transkriptionsfaktor und ist während der embryonalen Entwicklung von Kopf und Gliedmaßen exprimiert (Jabs 1998). Nach Aktivierung dieses Proteins durch Dimerisierung ist es in der Lage, spezifische DNA-Sequenzen zu binden und seine Funktion als Transkriptionsfaktor zu erfüllen. Mutationen im TWIST-Gen auf Chromosom 7 führen zum Verlust wichtiger regulatorischer Funktionen und damit zum Verlust der Fähigkeit zu dimerisieren und DNA zu binden („loss-of-function“).

„Loss-of-function“ Mutationen im TWIST-Gen führen zu Haploinsuffizienz, das heisst, die Menge des Genprodukts reicht nicht für einen normalen Phänotyp aus (Strachan und Read 1996). So entstehen die bereits beschriebenen, für das Saethre-Chotzen Syndrom typischen klinischen Merkmale (2.7.9).

## **6.2 Die Mutationen im Einzelnen**

### **6.2.1 Exon 7 von FGFR 2**

Der Nukleotidaustausch **A 866 G**, der zum Aminosäureaustausch **Gln 289 Pro** führt, wurde bei einem Patienten mit „Crouzon-Symptomatik“ nachgewiesen. Nähere Angaben zum Phänotyp wurden bei Einsendung der Patienten-DNA nicht gemacht. Gorry et al. (1995) beschrieben diese Mutation in Exon 7 von FGFR 2 bei mehreren Mitgliedern einer Familie mit Crouzon-Syndrom. Bis dahin waren in Exon 7 ausschließlich Mutationen, die mit dem Apert-Syndrom korrelierten nachgewiesen worden. Nun wurde erstmals eine Mutation in Exon 7 beschrieben, die phänotypisch keine Syndaktylien der Gliedmaßen verursachte. Exon 7 von FGFR 2 (Nomenklatur nach Givol und Yayon, 1992) kodiert für die erste Hälfte der Ig III-Domäne (Ig IIIa) und ist somit beiden „splice-Formen“ der zweiten Hälfte der Ig III gemein. Sowohl bei KGFR als auch bei FGFR 2 wird daher dieses Exon transkribiert und translatiert. Während Crouzon Mutationen in Exon 9 in der BEK-Isoform (2.3.1.1) vorkommen, können Mutationen in Exon 7 die zweite Hälfte der Ig III-Domäne sowohl in die BEK-Isoform als auch in die KGFR-Isoform teilen. Die Tatsache, dass sich Crouzon Patienten mit Mutationen in Exon 7 und 9 stark ähneln spricht dafür, dass bei Patienten mit Crouzon-Syndrom überwiegend die BEK Isoform exprimiert wird, was keine Gliedmaßenanomalien verursacht. Es wurde alternativ dazu die Vermutung geäußert, dass Mutationen, die außerhalb von Exon IIIc, entweder im FGFR 2 selbst oder in anderen Genen liegen, den Phänotyp definieren (Gorry et al., 1995). Dies wäre eine Erklärung dafür, warum

beim Apert-Syndrom mit Mutationen im gleichen Exon Syndaktylien schwersten Grades auftreten. Oldridge et al. (1995) sowie Meyers et al. (1996) beschrieben die Mutation Gln 289 Pro auch bei Patienten mit Jackson-Weiss-Syndrom (Oldridge et al., 1995; Meyers et al., 1996). Diese Mutation kann also bei zwei unterschiedlichen Syndromen vorliegen (Tartaglia et al., 1997).

17 DNA-Proben wurden mit Verdacht auf Apert-Syndrom eingesandt. Bei 11 Patienten fand sich der Aminosäureaustausch **Ser 252 Trp**, bei 6 der Aminosäureaustausch **Pro 253 Arg**. Patienten mit der Pro 253 Arg Mutation hatten Syndaktylien der Füße vom Grad III und Syndaktylien der Hände vom Grad II-III (2.7.1). Patienten mit dem Aminosäureaustausch Ser 252 Trp zeigten erheblich mildere Syndaktylien der Hände und Füße, in 3 Fällen fanden sich Fußsyndaktylien vom Grad III. Wie schon in der Einleitung erwähnt, ist das Apert-Syndrom eine Craniosynostose, die sich auf Grund der charakteristischen Syndaktylien relativ sicher nach dem Phänotyp diagnostizieren lässt. Außerdem ist das Mutationsspektrum bei diesem Syndrom sehr eng, da 98 % aller Patienten mit Apert-Syndrom eine der beiden genannten Mutationen tragen (Jabs, 1998). Auffallend ist die unterschiedliche Häufigkeit, mit der die beiden Mutationen auftreten. Das Verhältnis Ser 252 Trp zu Pro 253 Arg liegt bei 1,7:1 (Cohen, 1995, Wilkie et al., 1995). Der Nukleotidaustausch C 755 G, Ser 252 Trp entsteht im Gegensatz zu C 758 G, Pro 253 Arg, aus einem CpG-Dinukleotid, welches häufig zu Mutationen neigt (Wilkie et al., 1995). CpG-Dinukleotide besitzen ein Cytosin am 5'-Ende der Desoxyribose. Die Desoxyribose des Cytosin ist über eine Phosphodiesterbindung am 3'-Ende mit der Desoxyribose des Guanin am 5'-Ende verbunden. Das Cytosin neigt dazu, methyliert und anschließend zu Thymin desaminiert zu werden, weshalb CpG-Dinukleotide leicht mutieren (Strachan und Read, 1996). In CpG-Dinukleotiden tritt der Austausch von C nach G häufiger auf als an anderen Positionen. Die Ursache dafür ist noch ungeklärt (Cooper et al., 1990). Das Codon TCG für Serin wird daher häufiger zu Mutationen neigen, als das Codon CCT für Prolin. Die Mutationen für das Apert-Syndrom liegen in der Ig II-Ig III Verbindungsregion von FGFR 2. Dieser Teil des Rezeptors ist maßgeblich an der Ligandenbindung beteiligt, indem er die Struktur des Rezeptors aufrecht erhält. Alle bekannten Apert Mutationen führen eine Aminosäure mit umfangreichen Seitenketten ein (Trp, Arg, Phe). Dies erhöht vermutlich die Starrheit der Verbindungsregion zwischen Ig II und Ig III. Der Ligand kann dadurch weniger leicht dissoziieren, so dass die Ligand-Rezeptor-Bindung länger als nötig bestehen bleibt (Wilkie et al., 1995; Anderson et al., 1998). Der Rezeptor ist also voll funktionsfähig, das Signal hält jedoch länger an als üblich. Möglich

wäre auch, dass der Rezeptor durch Mutationen in diesem Bereich schon auf geringere Ligandenkonzentrationen reagiert (Anderson et al., 1998; Passos-Bueno et al., 1999). Dies wurde experimentell bewiesen. Wie bereits erwähnt, sind die Syndaktylien beim Aminosäureaustausch Pro 253 Arg ungleich schwerer als bei Ser 252 Trp. Im Experiment war die Dissoziationsrate des Liganden bei Ser 252 Trp höher, als bei Pro 253 Arg, d.h. bei letzterem Austausch bindet der Ligand noch länger. Möglicherweise werden die schweren Syndaktylien im zweiten Fall durch die veränderte Liganden-Rezeptor Interaktion bei der IIIb-„splice-Form“ vermittelt (Anderson et al., 1998).

Neben den genannten Mutationen Ser 252 Trp und Pro 253 Arg wiesen Oldridge et al. (1997) bei einem Patienten mit Apert-Phänotyp die Mutation Ser 252 Phe nach. Desweiteren zeigte ein anderer Patient mit milden Crouzon-Symptomen den Aminosäureaustausch Ser 252 Leu. Daraus folgerten Oldridge et al. (1997), dass offenbar nicht nur die Aminosäureposition für den Apert-Phänotyp verantwortlich ist, sondern auch die entsprechend substituierte Aminosäure selbst eine Rolle spielt. Außerdem scheint auch die der Mutation benachbarte Aminosäure von Bedeutung zu sein. Ein von Oldridge et al. (1997) untersuchter Patient wies sowohl den Aminosäureaustausch Ser 252 Phe, als auch Pro 253 Arg auf. Dieser Patient zeigte jedoch Pfeiffer-Symptomatik und nicht wie erwartet einen Apert-Phänotyp (Oldridge et al., 1997).

Patienten mit Crouzon-Syndrom und Mutationen in Exon 7 von FGFR 2 weisen craniofaciale Veränderungen auf, haben jedoch keine Gliedmaßenanomalien. Die Syndaktylien, die beim Apert-Syndrom beobachtet werden, sind vermutlich auf die Expression eines mutierten KGFR im AER („apical ectodermal ridge“) während der Gliedmaßenentwicklung zurückzuführen. Dass KGFR eine wichtige Rolle während der frühen Organogenese spielt, wurde von De Moerloose et al. (2000) experimentell an Mäusen gezeigt, denen FGFR 2 (IIIb) fehlte. Der Effekt wird offenbar durch FGF 4 vermittelt, welches eine hohe Affinität zu KGFR aufweist und ebenfalls im AER nachweisbar ist (Martin, 1998). Wilkie et al. (1995) spekulierten, dass die Syndaktylien durch eine reduzierte anterior-posterior Länge oder Dicke des AER zustande kommen. Gleichzeitig wird jedoch auch bei Apert die BEK-Isoform exprimiert, was das Auftreten von craniofacialen Veränderungen sowohl bei Apert-, als auch bei Crouzon-Patienten erklärt (Wilkie et al., 1995). Die Genotyp-Phänotyp Analyse der Apert Patienten, die in dieser Arbeit untersucht wurden, zeigt nicht nur einen unterschiedlichen Schweregrad der Syndaktylien bei den beiden nachgewiesenen Mutationen, sondern auch ein unterschiedliches Ergebnis nach craniofacialem chirurgischem Eingriff (v. Gernet et al., im Druck). Die Patienten wurden in Bezug auf die Genotyp-Phänotyp-Korrelation nach der

Operation untersucht. Postoperativ zeigten Patienten mit dem Aminosäureaustausch Pro 253 Arg einen vergleichsweise milden Phänotyp mit leichter Mittelgesichtshypoplasie und normalem Kieferschluß im Gegensatz zu denen mit der Mutation Ser 252 Trp. Letztere zeigten gravierende dentale Befunde und stärkere Mittelgesichtshypoplasie. Dagegen waren die Syndaktylien bei der Pro 253 Arg Gruppe erheblich schwerer. Die Autoren stimmen mit den unterschiedlichen phänotypischen Effekten beider Apert Mutationen, die von Wilkie et al. (1995) beschrieben wurden, überein und erweitern die Kenntnisse um die Ergebnisse nach chirurgischem Eingriff. Möglicherweise kommen die unterschiedlichen Effekte in Bezug auf Anomalien des Schädels und der Gliedmaßen durch örtlich spezifische „gain-of-function“ zustande. Die Studie an Patienten post operationem sollte weiterhin verfolgt werden. So besteht eventuell die Möglichkeit, nach Untersuchung des Genotyps die Operationsmethode festzulegen, um so die besten Ergebnisse für den Patienten erzielen zu können (v. Gernet et al., im Druck).

#### 6.2.2 Exon 9 von FGFR 2

Der Nukleotidaustausch **G 1025 A**, der zum Aminosäureaustausch von **Cystein** an Stelle **342** zu **Tyrosin** führt, wurde bei 3 nicht verwandten Patienten mit klassischen Crouzon-Symptomen wie Exorbitismus und Hypertelorismus nachgewiesen. Dieser Nukleotidaustausch wurde bereits bei Patienten mit Crouzon-Syndrom beschrieben (Reardon et al., 1994; Steinberger et al., 1995).

Darüberhinaus wurde in dieser Arbeit bei einem Patienten mit Verdacht auf Pfeiffer-Syndrom an der gleichen Stelle der Austausch **G 1025 C** mit dem daraus resultierenden Aminosäureaustausch **Cystein** zu **Serin** nachgewiesen. Diese Mutation wurde bisher sowohl bei Patienten mit Pfeiffer-Syndrom, als auch bei solchen mit Crouzon-Syndrom beschrieben (Rutland et al., 1995; Meyers et al., 1996). Das Codon 342 stellt eine Besonderheit im Mutationsspektrum von FGFR 2 dar (Wilkie 1997). An dieser Stelle kann das Cystein durch Tyrosin, Arginin, Tryptophan, Serin und Phenylalanin ersetzt werden (Steinberger et al., 1998). Der Phänotyp kann auch dann stark variieren, wenn bei zwei Patienten die gleiche Aminosäure substituiert ist. Patienten mit einer Mutation an Stelle 342 zeigen Pfeiffer-, Crouzon-, oder Jackson-Weiss-Symptomatik (Passos-Bueno et al., 1999). Der Ersatz des Cystein an Stelle 342 durch eine andere Aminosäure ist mit 30-40 % die häufigste Mutation bei Pfeiffer- und Crouzon-Syndrom. Dabei bleibt ein Cystein-Rest an Stelle 278, welcher sich

sonst über eine Disulfidbrücke mit dem Cystein 342 paart, frei. Auch am Cystein 278 sind Mutationen bekannt (Oldridge et al., 1995; Meyers et al., 1996; Steinberger et al., 1998). Das Vorhandensein eines freien Cysteins in der Ig III-Domäne von FGFR 2 kommt in über 50 % aller Fälle von Crouzon, Jackson-Weiss und Pfeiffer-Syndrom vor und führt wahrscheinlich über intermolekulare Disulfidbrückenbildung zur ligandenunabhängigen Aktivierung des Rezeptors (Tartaglia et al., 1997; Reardon et al., 1994; Steinberger et al., 1995; Rutland et al., 1995; Meyers et al., 1996). Alternativ dazu könnten Mutationen am Cystein 342 die Ligandenbindungsspezifität verändern (Passos-Bueno et al., 1999), da die Disulfidbrücke zwischen Cys 342 und Cys 278 durch Mutation zerstört wird und die Struktur der Ig III-Domäne so nicht mehr gewährleistet werden kann (Meyers et al., 1996).

Die Punktmutation **G 1032 A**, die zu dem synonymen Austausch **Ala 344 Ala** führt, wurde in der vorliegenden Arbeit bei 2 verwandten Patienten nachgewiesen. Beide untersuchten Patienten zeigten Crouzon-Symptome, wie Exorbitismus, leichte Stirnvorwölbung und Mittelgesichtshypoplasie. Bei einem der beiden wurde eine unilaterale Synostose der Coronarnaht diagnostiziert. Reardon et al. (1994) beschrieben diese Mutation bei zwei Patienten mit Crouzon-Syndrom.

Steinberger et al. (1996) wiesen die Mutation G 1044 A in Codon 344 bei verschiedenen Mitgliedern einer türkischen Familie nach. Der Nukleotidaustausch erzeugt keinen Austausch der Aminosäure Alanin, sondern führt zu abnormalem „splicing“ des FGFR 2 Transkripts (Reardon et al., 1994; Rutland et al., 1995; Li et al., 1995; Del Gatto und Breathnach, 1995). So werden 51 bp bzw. 17 Aminosäuren der Ig IIIc deletiert (Li et al., 1995; Del Gatto und Breathnach, 1995). Innerhalb der von Steinberger et al. (1996) untersuchten Familie variierte der Phänotyp auffallend stark. So waren einige Personen völlig gesund und bis auf eine leichte maxilläre Hypoplasie und Hypertelorismus klinisch unauffällig. Andere Träger der Mutation wiesen Craniosynostosen mit Folgesymptomen wie Kopfschmerzen und Quetschung des Sehnervs auf. Die klinische Symptomatik konnte keinem Syndrom zugeordnet werden. Dieser Nukleotidaustausch ist ein Beispiel für die große Variabilität des Phänotyps bei dieser Erkrankung.

Der Aminosäureaustausch, **Ser 347 Cys** wurde bei einem Patienten mit einem Pfeiffer ähnlichen Phänotyp nachgewiesen. Diese Mutation war bisher nur Patienten mit Crouzon-Syndrom bekannt (Jabs et al., 1994; Steinberger et al., 1998; Pulleyn et al., 1996). Die Einführung eines dritten Cysteins in die Ig III-Domäne könnte die Sekundärstruktur, die durch

Cys 342 und Cys 278 gewährleistet wird, zerstören (Jabs et al., 1994; Oldridge et al., 1995) und so die Ligandenbindungsspezifität verändern. Dass der untersuchte Patient klinisch Pfeiffer Symptomatik zeigte, ist ein weiteres Beispiel dafür, dass der Phänotyp bei Craniosynostosen selbst bei identischen Mutationen in einem der drei FGF-Rezeptorgene stark variieren kann.

### 6.2.3 Exon 1 von FGFR 2

Pulleyn et al. (1996) wiesen den Aminosäureaustausch Tyr 105 Cys in der Ig I-Domäne von FGFR 2 bei einem Patienten mit „atypischem Crouzon-Syndrom“ nach. Zum ersten Mal wurde in diesem Rezeptorbereich eine Mutation detektiert. Pulleyn et al. wiesen darauf hin, dass sich eventuell weitere Mutationen in diesem Teil des Rezeptors befinden, die zu einer Craniosynostose führen könnten. Robertson et al. (1998) beobachteten eine Rezeptoraktivierung im Experiment nach Mutation des Cystein an Stelle 62 in der Ig I-Domäne und äußerten daraufhin ebenfalls die Vermutung nach neuen Mutationen in diesem Teilbereich.

Bei einer Patientin mit Crouzon-Syndrom sowie deren nicht betroffenen Vater, wurde in dieser Arbeit der Nukleotidaustausch **G 294 A** in der Ig I-Domäne, welcher zu dem synonymen Aminosäureaustausch **Thr 98 Thr** führt, nachgewiesen. Dieser Austausch konnte bei keinem der weiteren 106 untersuchten Patienten festgestellt werden, jedoch bei 4 von 114 Kontrollpersonen. Dies, und die Tatsache, dass es sich hier um einen synonymen Aminosäureaustausch handelt, sprechen für einen Polymorphismus. Ein Polymorphismus liegt dann vor, wenn man in einer Population zwei und mehr Allele an einem Locus findet (Strachan und Read, 1996), die in der Regel keine direkten Auswirkungen auf den Phänotyp haben. Da es sich im vorliegenden Fall vermutlich um einen neutralen Polymorphismus handelt, kann dieser nicht verantwortlich für die Erkrankung sein. Polymorphismen können unter bestimmten Bedingungen dennoch den Phänotyp beeinflussen. Ein Beispiel ist das PRNP-Gen („prion protein gene“) auf Chromosom 20. Der Aminosäureaustausch Asp 178 Asn kann fatale familiäre Schlaflosigkeit (FFI), oder einen Subtyp der Creutzfeld-Jakob-Erkrankung (CJD) auslösen (Cohen 1995; Rutland et al., 1995). Welcher Phänotyp zum Tragen kommt, wird bei dieser Erkrankung durch die Existenz eines Polymorphismus in Codon 129 bestimmt. Ein weiteres Beispiel ist das Allel  $\epsilon$  4 des Gens für Apolipoprotein E auf Chromosom 19 (19q13.2), welches bei der Alzheimer-Krankheit eine Rolle spielt. Das Vorhandensein dieses Allels erhöht die Wahrscheinlichkeit an der Alzheimer-Krankheit zu

erkranken. Es ist jedoch weder eine notwendige noch eine hinreichende Bedingung für die Erkrankung (Lautenschlager et al., 1999; Kurz und Müller, 1997).

In der für die Ig I-Domäne kodierenden Region konnte außer dem oben beschriebenen Nukleotidaustausch im Rahmen dieser Arbeit kein weiterer Austausch nachgewiesen werden. Damit wurde die Vermutung, dass auch Mutationen in der Ig I-Domäne bei Craniosynostosesyndromen vorliegen könnten von Pulleyn et al. (1996) und Robertson et al. (1998) nicht bestätigt.

#### 6.2.4 Exon 8 von FGFR 2

In Intron 8 wurde in der vorliegenden Arbeit bei einer Patientin mit unklarem Craniosynostosesyndrom der Nukleotidaustausch **+10 Intron 8 C->G** nachgewiesen.

Ein weiteres betroffenes Familienmitglied der Patientin sowie zwei untersuchte nicht betroffene Familienangehörige wiesen diesen Nukleotidaustausch nicht auf, ebensowenig einer der 91 nicht verwandten Patienten. Ob dieser Nukleotidaustausch einen Effekt, z.B. dadurch, dass er zu abnormem „splicing“ führt, hat, bleibt noch zu klären. Hierzu müsste eine reverse Transkription an der RNA der Patientin durchgeführt und das Produkt anschließend sequenziert werden. Frisches Untersuchungsmaterial zur Extraktion von RNA wurde im weiteren Verlauf der vorliegenden Arbeit nicht erhalten. Bislang wurden keine Mutationen in der IIIB-Isoform (2.3.1.1) nachgewiesen.

#### 6.2.5 Exon 5 von FGFR 1

Bei zwei verwandten Patienten mit Pfeiffer-Syndrom wurde der Nukleotidaustausch **C 758 G, Pro 252 Arg** nachgewiesen.

Der nachgewiesene Nukleotidaustausch wurde bereits bei Patienten mit Pfeiffer-Syndrom beschrieben (Muenke et al. 1994, 1997; Meyers et al., 1996). An der gleichen Stelle befindet sich in FGFR 2 und 3 der gleiche Aminosäureaustausch, nämlich Pro 253 Arg in FGFR 2 und Pro 250 Arg in FGFR 3. In FGFR 2 korreliert dieser Austausch mit dem Apert-Syndrom, in FGFR 3 mit einem unklaren, nicht klassifizierbaren Craniosynostosesyndrom (Muenke et al., 1997).

Es können also 3 Mutationen, die jeweils den gleichen Aminosäureaustausch bedingen, in gleichen Bereichen verschiedener Rezeptorgene auftreten (Bellus et al., 1996). Alle 3 Mutationen haben unterschiedliche Phänotypen zur Folge. Alle 3 Mutationen liegen außerdem

in einer ligandenbindenden Domäne des Rezeptors, die in allen FGF-Rezeptorgenen weitgehend in der Basenabfolge übereinstimmt (Graham et al., 1998). Vermutlich verändern diese Mutationen die Bindung von FGF's auf unterschiedliche Weise, was dann die verschiedenen Phänotypen zur Folge hat. Das Pfeiffer-Syndrom ist ein weiteres Beispiel für die Heterogenität der Craniosynostosen. Zwei Mutationen in unterschiedlichen Rezeptorgenen (FGFR 1 und 2) auf verschiedenen Chromosomen (Chromosom 8 und 10) führen zu gleichen Phänotypen (Muenke et al., 1994; Rutland et al., 1995). In FGFR 1 wurde bisher keine weitere Mutation außer der genannten detektiert. Exon 5 ist der einzige Bereich, der in diesem Rezeptorgen bislang untersucht worden ist.

### 6.2.6 Exon 7 von FGFR 3

Es wurde der Aminosäureaustausch **Pro 250 Arg** bei 25 nicht verwandten Patienten und 3 vermeintlich nicht Betroffenen in Exon 7 von FGFR 3 nachgewiesen. Bei 17 Patienten war die Mutation familiär bedingt, bei einem trat sie *de novo* auf, bei den Übrigen konnte dazu keine Aussage gemacht werden. Die Häufigkeit mit der dieser Aminosäureaustausch auftritt wird von Moloney et al. (1997) mit 0,8-1:10000 angegeben. Damit ist der Nukleotidaustausch C 749 G der häufigste im menschlichen Genom. In der vorliegenden Arbeit war dies ebenfalls die am Häufigsten nachgewiesene Mutation. Ob die Mutation meist familiär oder *de novo* auftritt, ist nicht geklärt. Lajeunie et al. (1998) beschrieben diesen Aminosäureaustausch bei 74 % ihrer untersuchten Patienten als familiär bedingt, während Reardon et al. (1997) hauptsächlich *de novo* Mutationen nachwiesen. Phänotypisch zeigten in der vorliegenden Arbeit 9 der Patienten ein unklares Craniosynostosesyndrom, 9 ein Crouzon-Syndrom, 2 eine Plagiocephalie, und 3 einen Pfeiffer-ähnlichen Phänotyp. Bei den anderen Patienten wurden bei der Einsendung des Untersuchungsmaterials keine genauen Angaben zum Phänotyp gemacht.

Auch in FGFR 3 erzeugen 3 verschiedene Mutationen in Exon 7 unterschiedliche Phänotypen. Während FGFR 3 Mutationen in der Regel Minderwuchs verursachen (Shiang et al., 1994; Bellus et al., 1995b; Tavormina et al., 1995b), zeigen Patienten mit dem Aminosäureaustausch Pro 250 Arg ein vollkommen normales Knochenlängenwachstum. Sie weisen jedoch craniofaciale Veränderungen unterschiedlichen Ausmaßes, sowie gelegentlich Anomalien der Hände und Füße auf und können auf Grund des Phänotyps keinem Syndrom zugeordnet werden (Bellus et al., 1996; Muenke et al., 1997). Sind dem Codon 250 direkt benachbarte Codons von Mutationen betroffen, führt dies bei den Patienten zur stärksten

Ausprägung von Minderwuchs, der Thanatophoren Dysplasie Typ I (Tavormina et al., 1995; Rousseau et al., 1996). Es gibt mehrere mögliche Erklärungen für die verschiedenen phänotypischen Effekte von Mutationen in Exon 7 von FGFR 3. Pro 250 Arg könnte beispielsweise die Ligandenbindung in der Art verändern, dass der Rezeptor durch einen üblicherweise unpassenden Liganden aktiviert wird, der überwiegend in den cranialen Suturen exprimiert ist (Passos-Bueno et al., 1999). Alternativ dazu könnte Pro 250 Arg die ligandenunabhängige Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden bedingen, die von FGFR 3 in Gang gesetzt werden. Desweiteren besteht die Möglichkeit, dass die Pro 250 Arg Mutation die Fähigkeit von FGFR 2, Heterodimere mit anderen FGFR's zu bilden, verstärkt. Daraus würde dann eine ligandenabhängige oder ligandenunabhängige Aktivierung des Rezeptors resultieren (Bellus et al., 1996; Wilkie et al., 1995a). Ob und welcher dieser Mechanismen zu den beschriebenen Effekten führt, bleibt weiterhin zu klären.

Auffallend ist der überlappende Phänotyp bei Patienten mit Saethre-Chotzen-Syndrom und solchen mit der Pro 250 Arg Mutation in FGFR 3. Patienten mit Saethre-Chotzen-Syndrom zeigen ebenfalls Craniosynostosen unterschiedlicher Ausprägung und Anomalien der Gliedmaßen (Gorlin et al., 1990). Obwohl bei Patienten, die klinisch als Saethre-Chotzen-Patienten klassifiziert wurden, häufig eine Mutation im TWIST-Gen nachgewiesen werden konnte, wurde bei einigen ein Nukleotidaustausch in FGFR 2 oder 3 detektiert. Dies ist ein weiterer Beweis für die Variabilität des Phänotyps bei dieser Erkrankung (Paznekas et al., 1998; El Ghouzzi et al., 1999; Escobar et al., 1977; Rose et al., 1997; Johnson et al., 1998). Außerdem wird die Vermutung nahegelegt, dass TWIST und FGFR in den gleichen Reaktionsweg münden (Jabs 1998; Lajeunie et al., 1999; Reardon et al., 1997). Experimentell wurde nachgewiesen, dass TWIST in *Drosophila* die Expression von DFR 1, einem FGFR Homolog, reguliert. Diese Beobachtung erhärtet die Vermutung eines gemeinsamen Reaktionsweges (Jabs 1998).

#### 6.2.7 Exon 9 von FGFR 3

Bei 2 Patienten konnten je 2 Intronmutationen in Intron 9 von FGFR 3 nachgewiesen werden, nämlich **C->T + 5 Intron 9** und **+ 8 Intron 9 insCT** (Nomenklatur nach Antorakakis et al., 1999). Einer von ihnen zeigte einen Pfeiffer-ähnlichen Phänotyp, bei dem anderen fehlten die Angaben zur klinischen Symptomatik. Die Untersuchung von Kontrollen ergab die gleiche Mutation bei zwei Gesunden. Es stellt sich die Frage, ob diese Mutationen einen Effekt haben, oder ob es sich um einen Polymorphismus handelt. Da zwei Gesunde ebenfalls die

Mutationen tragen, liegt die Vermutung eines Polymorphismus sehr nahe. Bisher wurden in Exon 9 von FGFR 3 keine Mutationen nachgewiesen.

#### 6.2.8 Exon 10 von FGFR 3

Tabelle 6.2.8.1 zeigt die Mutationen, die bisher in Exon 10 von FGFR 3 beschrieben wurden.

*Tab. 6.2.8.1: Zusammenfassung aller bisher in Exon 10 von FGFR 3 nachgewiesenen Mutationen*

| <b>Nukleotidaustausch</b> | <b>Aminosäureaustausch</b> | <b>Phänotyp</b>                          | <b>Publikation</b>         |
|---------------------------|----------------------------|------------------------------------------|----------------------------|
| C 1172 A                  | Ala 391 Glu                | Crouzon Syndrom mit Acanthosis nigricans | Meyers et al., 1995        |
| G 1138 A<br>G 1138 C      | Gly 380 Arg                | Achondroplasie                           | Shiang et al., 1994        |
| G 1123 T                  | Gly 375 Cys                | Achondroplasie                           | Superti-Furga et al., 1995 |
| G 1108 T<br>A 1118 G      | Gly 370 Cys<br>Tyr 373 Cys | Thanatophore Dysplasie Typ I             | Rousseau et al., 1996      |
| A 1111 T                  | Ser 371 Cys                | Thanatophore Dysplasie Typ I             | Tavormina et al., 1995     |
| T 1150 C                  | Phe 384 Leu                | Unklare Craniosynostose                  | Golla et al., 1997         |

Im Rahmen dieser Arbeit wurde bei einem Patienten der Nukleotidaustausch **C 1172 A, Ala 391 Glu** (Meyers et al., 1995; Wilkes et al., 1996) nachgewiesen. Der Patient zeigte phänotypisch ein Crouzon-Syndrom sowie eine Acanthosis nigricans. Dieser Phänotyp wurde bisher ausschließlich bei Patienten mit der genannten Mutation beschrieben. Meyers et al. (1995) und Wilkes et al. (1996) beschrieben bei insgesamt 7 Patienten das Auftreten eines Crouzon-Syndroms in Verbindung mit Acanthosis nigricans. Unter einer Acanthosis nigricans versteht man schmutzigbraune bis –graue papillomatös-keratotische Hautveränderungen. Sie

treten beim Menschen meist symmetrisch in den Achselhöhlen, Gelenkbeugen, im Nacken-, oder Geschlechtsbereich auf. Selten sind sie universell auch an den Schleimhäuten zu erkennen. Die Verbindung von Acanthosis nigricans mit congenitalen Erkrankungen ist bekannt. Sie wurde beim Berardinelli-Syndrom (angeborene Überfunktion der Schilddrüse), bei der Sattan Dysplasie („severe achondroplasia with developmental delay and acanthosis nigricans“) sowie bei Mutationen des Insulinrezeptorgens beschrieben. Das überschüssig produzierte Insulin bindet an EGF-Rezeptoren („Epidermal Growth Factor“) und FGF-Rezeptoren, die ihrerseits dann die Acanthose und Hyperpigmentierung induzieren sollen (Dahme und Weiss 1988). Wären Mutationen im Insulinrezeptorgen für die Acanthose verantwortlich, sollte man bei den Patienten eine Störung des Glucosemetabolismus erwarten. Dies wurde jedoch bei keinem der in der Literatur beschriebenen Fälle festgestellt (Wilkes et al., 1996). Das Auftreten einer Acanthosis nigricans in Verbindung mit dem Crouzon-Syndrom ist untypisch, unterscheidet es sich doch in mancher Hinsicht vom Auftreten bei anderen Erkrankungen. Die Acanthosis wird bei den Patienten schon in frühester Kindheit beobachtet. Die Verteilung der Hautdefekte auf verschiedene Körperstellen ist ebenfalls untypisch. So kommt die Acanthosis beim Crouzon-Syndrom nicht nur in Achselhöhle und Nacken, sondern auch an Brust und Abdomen, sowie perioral und periorbital vor. Cohen (1999) schlug vor, das Crouzon-Syndrom in Verbindung mit Acanthosis nigricans als „Crouzonodermoskeletal Syndrome“ zu bezeichnen, um die phänotypischen Unterschiede zum klassischen Crouzon-Syndrom herauszustellen. Cohen gab an, dass diese Art der Erkrankung sich vom üblichen Crouzon-Syndrom in zwei Punkten unterscheidet. Zum einen wird sie nur durch eine spezifische Mutation in der transmembranen Domäne von FGFR 3 verursacht (Passos-Bueno et al., 1999), während alle anderen Crouzon Mutationen in Exon 7 und 9 von FGFR 2 liegen, zum anderen unterscheidet sich der Phänotyp der Patienten völlig von dem beim klassischen Crouzon-Syndrom (Cohen 1999).

Wie in der Einleitung bereits erwähnt, ist das gleichzeitige Auftreten von Craniosynostosen und Hautveränderungen dadurch erklärbar, dass die Mutationen, welche beide in Exon 10, also hinter der Ig III-Domäne liegen, sowohl in der BEK- als auch in der KGFR-Isoform vorkommen. KGFR ist vorwiegend in Zellen epithelialer Herkunft exprimiert, BEK dagegen in Knochenvorläuferzellen (Przylepa et al., 1996). Interessanterweise liegen die beiden Craniosynostosen, die mit Hautveränderungen korrelieren (Beare-Stevenson cutis gyrata und Crouzon-Syndrom mit Acanthosis nigricans) jeweils an einem Ende der transmembranen Domäne von FGFR 2 bzw. FGFR 3 (Passos-Bueno et al., 1999).

Welcher Mechanismus zur Aktivierung des Rezeptors führt, ist noch unklar.

Die Acanthosis nigricans ist auch beim Tier bekannt und wird in der Veterinärmedizin als „Genodermatose auf polygener Grundlage“ beschrieben. Sie tritt dort überwiegend familiär gehäuft beim jungen Dackel, sporadisch beim Drahthaar-Foxterrier, Airedale-Terrier und deutschen Schäferhund auf (Niemand und Suter, 1994). Ihre genaue Ursache ist nicht geklärt.

Bei zwei weiteren nicht verwandten Patienten wurde in der vorliegenden Arbeit der Nukleotidaustausch **T 1150 C**, welcher zum Aminosäureaustausch von **Phenylalanin** an Stelle **384** zu **Leucin** führt, nachgewiesen. Eine Patientin zeigte phänotypisch eine Scaphocephalie. Die Mutation wurde außerdem bei fünf Verwandten dieser Betroffenen detektiert, die keine phänotypischen Auffälligkeiten zeigten. Der zweite, nicht mit der Familie verwandte Patient, sollte ein klassisches Crouzon-Syndrom zeigen, schien jedoch nach den Photos zu urteilen phänotypisch unauffällig.

Der Austausch Phe 384 Leu wurde von Golla et al. (1997) als Polymorphismus bei 3 Mitgliedern einer Familie türkischer Abstammung beschrieben. Die von Golla et al. untersuchten Betroffenen zeigten phänotypisch Craniosynostosen unterschiedlichen Schweregrades, Hypertelorismus, cutane Syndaktylien, faciale Asymmetrien und Strabismus. Zwei der Personen, bei denen der Nukleotidaustausch T 1150 C nachgewiesen werden konnte, waren klinisch unauffällig. Als ursächliche Mutation wurde in der von Golla et al. untersuchten Familie die Pro 250 Arg Mutation in FGFR 3 nachgewiesen. Die beiden Patienten, bei denen in dieser Arbeit der Aminosäureaustausch Phe 384 Leu nachgewiesen werden konnte, wurden in allen übrigen zu testenden Teilbereichen der FGF-Rezeptorgene untersucht. Es konnte jedoch keine andere Mutation gefunden werden. Bisher trat der Aminosäureaustausch Phe 384 Leu bei keinem der untersuchten deutschen oder nordamerikanischen Patienten auf. In der vorliegenden Arbeit konnte diese Mutation nun erstmals bei einer deutschen Familie und einem nicht mit ihr verwandten Schweizer nachgewiesen werden. Die Mutation liegt zwischen dem für Achondroplasie verantwortlichen Aminosäureaustausch Gly 380 Arg und der Crouzon Mutation in Verbindung mit Acanthosis nigricans (Ala 391 Glu). Bei den Patienten, die den Nukleotidaustausch T 1150 C trugen, konnte weder ein Minderwuchs noch eine Hautveränderung diagnostiziert werden. Auffallend war auch, dass weder ein anderer der 109 untersuchten Patienten noch einer der 106 Gesunden diesen Nukleotidaustausch aufwies. Das Phenylalanin 384 ist ebenfalls an korrespondierenden Stellen in der transmembranen Domäne von FGFR 1 und 2 vorhanden. Es könnte also durchaus eine Funktion haben. Unklar bleibt jedoch, warum viele Mutationsträger keinerlei klinische Symptomatik aufweisen.

### **6.3 Phänotypische Variabilität bei Craniosynostosen**

Patienten mit Craniosynostosen weisen, wie die vorliegende Arbeit bestätigt, oft einen stark variierenden Phänotyp auf. So können Mitglieder einer Familie, die die gleiche Mutation tragen, phänotypisch verschiedenen Syndromen zugeordnet werden (Jabs, 1998). Diese phänotypische Variabilität innerhalb einer Familie mit der gleichen Mutation weist auf das Vorhandensein von anderen modifizierenden Genen oder Umweltfaktoren hin, die den Phänotyp auf unterschiedliche Art und Weise beeinflussen (Jabs et al., 1994; Cohen 1995). Diese modifizierenden Gene könnten z.B. andere FGF-Rezeptorgene oder Gene für FGF's sein, die mit FGFR 2 konkurrieren, ihn ersetzen oder mit ihm kooperieren. Ein Beispiel für eine Mutation mit variierendem Phänotyp ist der Aminosäureaustausch Cys 342 Arg in Exon 9 von FGFR 2, der phänotypisch sowohl zum Pfeiffer-Syndrom, als auch zum Crouzon-Syndrom führen kann (Rutland et al., 1995; Cohen 1995; Pulleyn et al., 1996). Hier führt kausale Homogenität zu phänotypischer Heterogenität (Cohen 1995). Das gleiche Phänomen wiesen Steinberger et al. (1996) für die Mutation G 1044 A in Codon 344 bei verschiedenen Mitgliedern einer türkischen Familie nach (siehe 6.2.2). Auch hier ist eine Erklärung das eventuelle Vorhandensein von genetischen Variationen anderer Loci, wodurch Genprodukte entstehen, die mit dem mutierten FGFR 2 interagieren (Rutland et al., 1995). Dass die gleiche Mutation unterschiedliche Erkrankungen hervorrufen kann, ist auch für andere Gene bekannt. So zum Beispiel der Aminosäureaustausch Asp 178 Asn im PRNP-Gen („prion protein gene“) auf Chromosom 20 (siehe 6.2.3), bei dem ein Polymorphismus in Codon 129 bestimmt, zu welchem Phänotyp die Mutation führt (Cohen 1995; Rutland et al., 1995). Phänotypische Variabilität wird nicht nur bei Patienten mit der gleichen Mutation beobachtet, sondern auch bei solchen, die unterschiedliche Mutationen in funktionell gleichen Bereichen der FGF-Rezeptorgene zeigen. So weisen Patienten mit Jackson-Weiss-Syndrom in Exon 9 von FGFR 2 klinisch nicht nur craniofaciale Veränderungen auf, sondern auch Anomalien der Füße in Form von breiten, nach medial abgespreizten großen Zehen und tarso-metatarsalen Verschmelzungen. Patienten mit Crouzon-Syndrom, bei denen ebenfalls Mutationen in Exon 9 von FGFR 2 nachgewiesen wurden, zeigen dagegen keinerlei Gliedmaßenanomalien. Es gibt bisher keine Erklärung für diese unterschiedliche klinische Symptomatik. Möglicherweise führen Mutationen, die phänotypisch auf ein Jackson-Weiss-Syndrom hinweisen, zu einer veränderten Ligandenbindungsspezifität und zu unterschiedlich starker

konstitutiver Rezeptoraktivierung. Diese Vorgänge finden eventuell zu anderen zeitlichen Entwicklungsstadien statt als die, die für das Crouzon-Syndrom verantwortlich sind (Jabs et al., 1994).

Ein weiteres Beispiel für unterschiedliche Mutationen in der gleichen funktionellen Domäne von FGFR 2 mit variierendem Phänotyp sind das Apert-Syndrom und das Crouzon-Syndrom in Exon 7.

Auch in FGFR 1, 2 und 3 erzeugen die drei Mutationen Pro 252 Arg (FGFR 1), Pro 253 Arg (FGFR 2) und Pro 250 Arg (FGFR 3) in gleichen funktionellen Bereichen der Rezeptorgene, drei unterschiedliche Phänotypen. An Stelle der Pro 250 Arg Mutation in FGFR 3 kommt in FGFR 2 die Mutation Pro 253 Arg in Korrelation mit dem Apert-Syndrom vor. Darüberhinaus korreliert die Mutation Pro 252 Arg in FGFR 1 mit dem Pfeiffer-Syndrom (Wilkie et al., 1995; Park et al., 1995).

Die genaue Erforschung der Reaktionswege von FGF-Rezeptoren wird notwendig sein, um eventuell vorhandene andere Komponenten zu finden, die die Variabilität der einzelnen Phänotypen bedingen. Dies erfordert die enge Kooperation von Klinikern und Molekularbiologen (Jabs 1998).

#### **6.4 Die DGGE -eine geeignete Methode zur Mutationsanalyse bei FGF-Rezeptor assoziierten Craniosynostosen**

Die „Denaturing Gradient Gel Electrophoresis“ (DGGE) wurde in der vorliegenden Arbeit zur Mutationsanalyse bei FGF-Rezeptor-assoziierten Craniosynostosen für Exon 1, 7 und 9 von FGFR 2 und Exon 7 von FGFR 3 etabliert. Exon 9 von FGFR 2 wurde zunächst als „Testfragment“ verwendet, da es sich in der PCR konsistent amplifizieren ließ. Die Untersuchung dieses Exons war unproblematisch, wohingegen die Untersuchung von Exon 7 von FGFR 2 und 3 keine scharfen Banden im Gel erbrachte. Erst nach Feststellung des optimalen Harnstoffgradienten durch ein Perpendikulgel war die Untersuchung mittels paralleler DGGE durchführbar. Weshalb der optimale Gradient mit dem Computerprogramm MELT87™ (Lerman et al., 1987) nicht berechnet werden konnte, erklärt Tabelle 5.7.2.1 im Ergebnisteil. Die mit Hilfe des Perpendikulargels ermittelten Harnstoffgradienten unterscheiden sich von den errechneten um 20-40 %. Der mit MELT87™ ermittelte Gradient

liegt bei allen untersuchten Bereichen außer Exon 9 von FGFR 2 bei über 60 %. Das Computerprogramm errechnet den Gradienten in Abhängigkeit vom Schmelzprofil des Fragments. Ist ein Fragment sehr GC-reich, ist die Temperatur, bei der die beiden DNA-Stränge sich trennen, wesentlich höher als bei einem Fragment mit niedrigem GC-Anteil, da die Bindung zwischen G und C stärker ist als zwischen A und T. Ist die Schmelztemperatur sehr hoch, wird der vom Computer errechnete optimale Harnstoffgradient ebenfalls sehr hoch sein. Bei einem sehr hohen Harnstoffgradienten besteht die Gefahr, dass die doppelsträngige DNA vollständig in ihre beiden Einzelstränge aufschmilzt. In diesem Fall schmilzt auch die GC-Klammer. Diese ist jedoch unbedingt notwendig, um das Fragment an einer Seite zusammenzuhalten. Wenn das gesamte Fragment mit GC-Klammer aufschmilzt, können Mutationen im parallelen Gradientengel nicht detektiert werden.

Das Perpendikulargel gibt den optimalen Harnstoffgradienten so an, dass die GC-Klammer bestehen bleibt. Daher ist es bei der Austestung neuer Fragmente empfehlenswert, zunächst ein Perpendikulargel anzufertigen. Dennoch ist das Computerprogramm MELT87™ für die Auswahl des geeigneten GC-Primers unverzichtbar.

Problematisch bei der Untersuchung mittels DGGE ist die Detektion von Mutationen nahe der Intron/Exon Grenze. Am Beispiel der Apert-Mutationen Ser 252 Trp und Pro 253 Arg wurde in der vorliegenden Arbeit gezeigt, dass Bereiche des Exons, die zu nahe am Primer und damit an der GC-Klammer liegen, nicht mehr aufschmelzen und dadurch nicht zu untersuchen sind. Dieses Problem kann umgangen werden, indem zum Beispiel ein Primer gewählt wird, der 100-130 bp von der Intron/Exon Grenze entfernt liegt. Eine andere, aufwendigere Möglichkeit ist es, jedes Fragment zweimal zu untersuchen, einmal mit der GC-Klammer am Strang-Primer und einmal am Gegenstrang-Primer. Diese Art des Vorgehens erfordert jedoch das Vorhandensein von zwei GC-Primern, was kostspielig ist. Werden die genannten Punkte berücksichtigt, ist die DGGE nach den Erfahrungen dieser Arbeit zu urteilen, eine einfache und zuverlässige Untersuchungsmethode für den Nachweis von Mutationen bei FGF-Rezeptor assoziierten Craniosynostosen.

#### **6.4 Craniosynostosen beim Tier?**

FGF-Rezeptoren verschiedener Spezies weisen große Homologien in Bezug auf die Aminosäuresequenz auf. So wiesen Johnson und Williams (1993) beim Vergleich des FGFR 1 von Mensch und Maus 98 % Übereinstimmung der Aminosäuresequenz nach. Der FGFR 3 von Mensch und Maus zeigt 84,5 % Übereinstimmung, zwischen Mensch und Huhn 63,3 % und zwischen Mensch und Rind 89 % (Usha et al., 1997).

Achondroplasie ist bei Hund und Rind bekannt. Sie wird beim Hund als Störung der Osteoblastenaktivität unbekannter Ursache eingeordnet (Niemand und Suter, 1994). Sie darf jedoch nicht verwechselt werden mit der herausgezüchteten *proportionierten Achondroplasie* mancher Hunderassen, wie zum Beispiel dem Zwergpudel. Andere Rassen, z.B. die französische Bulldogge (siehe Foto) sind nicht nur unproportioniert minderwüchsig, sondern weisen beinahe „Crouzon-ähnliche“ faciale Veränderungen, wie Hypertelorismus, Brachycephalie, Exorbitismus und Mittelgesichtshypoplasie auf. Auch wenn dieses Aussehen von den Besitzern erwünscht wird, stellt sich die Frage nach der genetischen Grundlage.



*Abb. 6.5.1: Französische Bulldogge.*

Usha et al. (1997) vermuteten einen Zusammenhang zwischen der Achondroplasie beim Rind und der des Menschen. Homozygote Kälber zeigen verkürzte Gliedmaßen und craniofaciale Veränderungen und werden als „Bulldoggen-Kälber“ bezeichnet. Sie werden bereits tot geboren. Heterozygote sind minderwüchsig und lebensfähig. Bei der Sequenzierung der transmembranen Domäne von FGFR 3 beim Rind konnte jedoch keine Mutation nachgewiesen werden. Weitere Regionen, wie der Tyrosinkinasebereich wurden nicht untersucht. Fotografien der Kälber zeigen bei den homozygoten Tieren einen Phänotyp, der dem der Thanatophoren Dysplasie ähnelt. Da nur der transmembrane Bereich des Rezeptors untersucht wurde, bleibt die Frage offen, ob vielleicht doch eine Mutation in einem anderen Teilbereich des FGFR 3 Gens für diesen Phänotyp verantwortlich ist.



*Abb. 6.5.2: Kurzköpfiger achondroplastischer Zwergwuchs bei einem Romagnola-Kalb und achondroplastisches „Bulldog-Kalb“ (Abb. aus Rosenberger, 1994).*

## **6.6 Die Bedeutung genetisch bedingter Erkrankungen in der Veterinärmedizin**

Parallel zum Humanen Genom Projekt werden immer mehr Gene auch bei anderen Spezies entschlüsselt. Auch wenn der Nutzen dieser Information umstritten ist, so gibt es doch einige Argumente für die Erstellung von Genkarten beim Tier (O'Brien et al., 1997). Viele unserer Haustiere haben genetisch bedingte Erkrankungen analog zu denen des Menschen. Beispiele sind die Duchenne/Becker Muskeldystrophie, die bei Mensch, Hund, Katze und Maus bekannt ist (Valentine et al., 1986; Bulfield et al., 1984; Carpenter et al., 1989) und die maligne Hyperthermie bei Mensch und Schwein (Harbitz et al., 1992). Genkarten von Tieren können Aufschluß über die Pathogenese von Erkrankungen geben und so auch dem Menschen

nutzen. Umgekehrt können beim Menschen bewährte Therapien für homologe Erkrankungen auch beim Tier Anwendung finden. Einige genetisch bedingte Erkrankungen beim Tier sind bereits bekannt:

1. Die progressive Retinaatrophie (PRA) ist bisher bei 100 Hunderassen bekannt, tritt jedoch gehäuft beim Irish Setter auf. Ursache ist ein Nukleotidaustausch von G nach A im Codon 807 des cGMP der Phosphodiesterase in der Retina. Die Erkrankung wird autosomal-rezessiv vererbt.
2. Die Kupferspeicherkrankheit beim Bedlington Terrier wird ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt und beruht auf einem Defekt des Kontrollgens, welches von fetalen auf postnatale Verhältnisse umschaltet. Durch den Defekt wird zu viel Kupfer in der Leber gespeichert, was zu Leberzellnekrosen und Freisetzung des Kupfers in die Blutbahn führt. Die Folgen sind Hämolyse und Methämoglobinbildung.
3. Die X-chromosomale kombinierte Immundefizienz („CID“) beim Basset ist ein autosomal-rezessiver B- und T-Zelldefekt aufgrund von Thymusdysplasie. Betroffene Hunde werden selbst nicht immunkompetent und erkranken häufig an „exotischen“ Infektionen, sobald der maternale Antikörperspiegel sinkt.
4. Die schwere kombinierte Immundefizienz beim Araber wird ebenfalls autosomal-rezessiv vererbt und ist in 2 % aller Fälle die Todesursache bei Araberfohlen.
5. Die hyperkaliämische periodische Paralyse (HYPP) beim Pferd ist auch beim Menschen bekannt. Sie beruht auf einer Punktmutation im Natrium-Kanal des Skelettmuskels.

Darüberhinaus wird die PCR mittlerweile routinemäßig zum Nachweis bestimmter Gensequenzen bei feline Coronaviren, Staupeviren beim Hund, equinen, feline und caninen Herpesviren und Chlamydien beim Vogel angewendet.

Bei vielen anderen Erkrankungen des Tieres werden genetische Ursachen vermutet, ohne dass jedoch genauere Informationen verfügbar sind. Züchterische Maßnahmen lassen genetische Ursachen für einige Erkrankungen vermuten. So ist die Osteochondrosis dissecans (OCD) beim Pferd nach dem Ausscheiden betroffener Hengste aus der Zucht zurückgegangen. Ebenso verhält es sich bei der Hüftgelenkdysplasie (HD) des Hundes. HD-freie Elterntiere gelten als Garant für gesunde Nachkommen.

## **7 Zusammenfassung**

In der vorliegenden Arbeit wurden Mutationsanalysen bei FGF-Rezeptor assoziierten Craniosynostosen durchgeführt. Ziel der Arbeit war es, die Mutationsanalysen in Exon 7 von FGFR 1, 2 und 3, Exon 9 von FGFR 2 und 3, sowie in Exon 10 von FGFR 3 fortzuführen und darüber hinaus bisher nicht untersuchte Teilbereiche der FGF-Rezeptorgene zu untersuchen. Außerdem wurde die „Denaturing Gradient Gel Electrophoresis“ (DGGE) im Rahmen dieser Arbeit als neue Methode zur Mutationsanalyse bei FGF-Rezeptor assoziierten Craniosynostosen eingeführt.

Es wurden Mutationsanalysen an 216 Craniosynostosepatienten und 66 nicht betroffenen Personen, welche mit einem der Betroffenen verwandt waren, durchgeführt. Bei 59 Patienten mit unterschiedlicher klinischer Symptomatik wurde eine Mutation nachgewiesen. Die detektierten Mutationen sind in Tabelle 5.10.1 zusammengefasst. Außerdem wiesen 8 der 66 nicht betroffenen Personen ebenfalls einen Nukleotidaustausch auf. Exon 1, 2 und 8 von FGFR 2 wurden als bisher nicht untersuchte Teilbereiche im Rahmen dieser Arbeit analysiert. In Exon 1 fand sich bei einer Patientin und deren Vater eine bisher nicht beschriebene synonyme Mutation in Codon 98. Diese Mutation wurde darüberhinaus bei 4 gesunden Personen nachgewiesen, was auf einen Polymorphismus hindeutet. In Exon 2 von FGFR 2 konnte keine Mutation detektiert werden. Damit wurde die Vermutung neuer Mutationen in der Ig I-Domäne von FGFR 2 nicht bestätigt. Bei der Analyse von Exon 8 von FGFR 2 konnte bei einer Patientin eine Mutation im Intron 8 nachgewiesen werden. Ihre Bedeutung konnte in dieser Arbeit nicht geklärt werden. Die häufigste nachgewiesene Mutation in der vorliegenden Arbeit war der Aminosäureaustausch Pro 250 Arg in FGFR 3. 11,5 % der Patienten wiesen diese Mutation auf.

Die Bedingungen zur Mutationsanalyse konnten durch Einführung der DGGE als neue Methode verbessert werden. Sie ermöglicht die einfache Untersuchung von Fragmenten, die für die SSCP-Analyse zu groß sind. Außerdem ist kein Einsatz von Radioaktivität erforderlich.

## **8 Summary**

In this work, mutational analyses of FGF-receptor associated craniosynostoses were performed. Precisely, the aim of the work was to continue mutational analyses of exon 7 of the FGFR 2- and 3-genes, of exon 9 of the FGFR 2 and 3 genes and of exon 10 of the FGFR 3-gene.

Furthermore, the DGGE was established as a new method to analyse mutations in FGFR-genes.

DNA from 216 craniosynostosis patients and additional 66 unaffected relatives was screened for FGFR mutations. Mutations in FGFR-genes were detected in 59 cases associated with different clinical features. The identified mutations are summarized in table 5.10.1

Additionally, in 8 of 66 unaffected individuals nucleotide exchanges were detected. The previously not examined FGFR 2 exons 1,2 and 8 were analysed as part of this work. In exon 1, previously not described synonymous mutation of Codon 98 was detected in an affected female patient and her father. The same mutation was found in 4 unaffected individuals, indicating a polymorphism. In exon 2 of FGFR 2 no mutation was detected. Since exon 2 encodes the Ig I domain of FGFR 2, the suggestion of an involvement of that part of the receptor in craniosynostosis FGFR 2-mutations could not be confirmed. The analysis of exon 8 of FGFR 2 revealed a mutation within intron 8 in one case. The significance of this mutation remains to be determined. The most frequently identified mutation reported here (11,5 % of 216 examined patients) was the exchange of proline at position 250 by an arginine in FGFR 3.

Establishment of DGGE improved the effectivity of mutation detection, since it enables the examination of PCR fragments that are too large for SSCP-analysis. In addition, for reasons of health care, usage of radioactivity could be avoided.

## **9 Literaturverzeichnis**

- 1) Anderson J, Burns HD, Enriquez-Harris P, Wilkie AOM, Heath JK (1998):  
Apert syndrome mutations in fibroblast growth factor receptor 2 exhibit increased affinity for FGF ligand, *Hum Mol Genet* **7(9)**: 1475-1483
- 2) Antonarakis SE (1998):  
Recommendations for a nomenclature system for human gene mutations, *Hum Mutat* **11**: 1-3
- 3) Apert E (1906):  
De l'acrocephalosyndaktylie, *Bull Soc Med Paris* **23**: 1310-1330
- 4) Armelin HA (1973):  
Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth *Proc Natl Acad Sci* **70(9)**: 2702-2706
- 5) Atkinson FRB (1937):  
Hereditary craniofacial dysostosis, or Crouzon's disease, *Med Press Circular* **195**: 118-124
- 6) Beaudet AL, Tsui LC (1993):  
A suggested nomenclature for designating mutations, *Hum Mutat* **2**: 245-248
- 7) Bellus GA, Hefferon TW, Ortiz de Luna RI, Hecht JT, Horton WA, Machado M, Kaitila I et al. (1995a):  
Achondroplasia is defined by recurrent G 380 R mutations of FGFR 3, *Am J Hum Genet* **56**: 368-373
- 8) Bellus GA, McIntosh I, Smith EA, Aylsworth AS, Kaitila I, Horton WA, Greenhaw GA, Hecht JT, Francomano H & CA (1995b):  
A recurrent mutation in the tyrosine kinase domain of fibroblast growth factor receptor 3 causes hypochondroplasia, *Nat Genet* **10**: 357-359
- 9) Bellus GA, Gaudenz K, Zackai EH, Clarke LA, Szabo J, Francomano CA, Muenke M (1996):  
Identical mutations in three different fibroblast growth factor receptor genes in autosomal dominant craniosynostosis syndromes, *Nat Genet* **14** : 174-176
- 10) BioRad (1997):  
Users Manual
- 11) Bulfield G, Siller WG, Wright PAL, Moore KJ (1984):  
X-chromosome-linked muscular dystrophy (mdx) in the mouse, *Proc Natl Acad Sci USA* **81**: 1189-1192
- 12) Burke D, Wilkes D, Blundell TL, Malcolm S (1998):  
Fibroblast growth factor receptors: lessons from the genes, *TIBS* **23**: 59-62
- 13) Carpenter JL, Hoffmann EP, Romanul FCA, Kunkel LM, Rosales RK, Ma NSF, Dasbach JJ, Rae JF, Moore FM, McAfee MB, Pearce LK (1989):  
Feline muscular dystrophy with dystrophin deficiency, *Am J Pathology* **135(5)**
- 14) Chang CC, Tsai FJ, Tsai HD, Tsai CH, Hsieh YY, Lee CC, Yang TC, Wu AJY (1998):  
Prenatal diagnosis of Apert syndrome, *Prenat Diagn* **18**: 621-625
- 15) Chotzen F (1932):  
Eine eigenartige familiäre Entwicklungsstörung ( Akrocephalosyndaktylie. Dysostosis craniofacialis und Hypertelorismus ), *Monatschr Kinderheilkd* **55**: 97-122
- 16) Cohen MM jr, Kreiborg S (1995):  
Hands and feet in the Apert syndrome, *Am J Med Genet* **57**:82-96

- 17) Cohen MM jr. (1995):  
Craniosynostoses: phenotypic/molecular correlations, *Am J Med Genet* **56**: 334-339
- 18) Cohen MM jr. (1999):  
Let's call it „Crouzonodermoskeletal syndrome“ so we won't be prisoners of our own conventional terminology, *Am J Med Genet* **84**: 74
- 19) Cohen MM jr. (1993):  
Pfeiffer update, clinical subtypes, and guidelines for differential diagnosis, *Am J Med Genet* **45** ( 3 ) : 300-7
- 20) Cohen MM jr. (1993):  
Sutural biology and the correlates of craniosynostosis, *Am J Med Genet* **47** ( 5 ) : 581-616
- 21) Cotton RGH (1997):  
Mutation Detection, *Oxford University Press*
- 22) Cooper DN, Krawczak M (1990):  
The mutational spectrum of single base-pair substitutions causing human genetic disease: patterns and predictions, *Hum Genet* **85**: 55-74
- 23) Crouzon O (1912):  
Dysostose cranio-faciale hereditaire, *Bull Soc Med Hop Paris* **33**: 545-555
- 24) Dahme E, Weiss E (1988):  
Grundriß der speziellen pathologischen Anatomie der Haustiere, *Enke Verlag Stuttgart*
- 25) Delezoide AL, Lasselin-Benoist C, Legeal-Mallet L, Brice P, Senée V, Yayan A, Munnich A, Vekemans M, Bonaventure J (1997):  
Abnormal FGFR 3 expression in cartilage of thanatophoric dysplasia fetuses, *Hum Mol Genet* **6** ( 11 ) : 1899-1906
- 26) Del Gatto F, Breathnach R (1995):  
A Crouzon syndrome synonymous mutation activates a 5' splice site within the IIIc exon of the FGFR 2 gene, *Genomics* **27**: 558-559
- 27) De Moerloose L, Pencer-Dene B, Revest JM, Hajihosseini M, Rosewell I, Dickson C (2000):  
An important role for the IIIB isoform of fibroblast growth factor receptor 2 ( FGFR 2 ) in mesenchymal-epithelial signalling during mouse organogenesis, *Dev* **127** (3): 483-492
- 28) Deng C, Wynshaw-Boris A, Zhou F, Kou A, Leder P (1996):  
Fibroblast growth factor receptor 3 is a negative regulator of bone growth, *Cell* **84**: 911-921
- 29) Deutz-Terlouw PP, Losekoot M, Aalfs CM, Hennekam RCM, Bakker E (1998):  
Asn 540 thr substitution in the fibroblast growth factor receptor 3 tyrosine kinase domain causing hypochondroplasia, *Hum Mutat Suppl* **1**: 62-65
- 30) Dionne CA, Modi WS, Crumley G, O'Brien SJ, Schlessinger J, Jaye M (1992):  
BEK, a receptor for multiple members of the fibroblast growth factor ( FGF ) family, maps to human chromosome 10q25.3-q26, *Cytogenet Cell Genet* **60**: 34-36
- 31) El Ghouzzi V, Lajeunie E, Le Merrer M, Cormier-Daire V, Renier D, Munnich A, Bonaventure J (1999):  
Mutations within or upstream of the basic helix-loop-helix domain of the TWIST gene are specific to Saethre-Chotzen syndrome, *Eur J Hum Genet* **7**: 27-33
- 32) El Ghouzzi V, Le Merrer M, Schmitt FP, Lajeunie E, Benit P, Renier D, Bourgeois P, Bolcato-Bellemin AL, Munnich A, Bonaventure J (1997):  
Mutations of the TWIST gene in the Saethre-Chotzen syndrome, *Nat Genet* **15**: 42-46
- 33) Erlebacher A, Filvaroff EH, Gitelman SE, Derynck R (1995):  
Toward a molecular understanding of skeletal development, *Cell* **80**: 371-378

- 34) Escobar V, Brandt IK, Bixler D (1977):  
Unusual association of Saethre-Chotzen syndrome and congenital adrenal hyperplasia, *Clin Genet* **11**: 365-371
- 35) Everett ET, Britto DA, Ward RE, Hartsfield JK jr. (1999):  
A novel FGFR 2 gene mutation in Crouzon syndrome associated with apparent nonpenetrance, *Cleft Palate Craniofac J* **36 ( 6)** : 533-41
- 36) Fisher SG, Lerman LS (1979):  
Length independent separation of DNA restriction fragments in two-dimensional gel electrophoresis, *Cell* **16**, 191-200
- 37) Fodde R, Losekoot M (1994):  
Mutation detection by denaturing gradient gel electrophoresis (DGGE), *Hum Mutat* **3**:83-94
- 38) Fragale A, Tartaglia M, Bernardini S, Di Stasi AMM, Di Rocco C, Velardi F, Teti A, Battaglia PA, Migliaccio S (1999):  
Decreased proliferation and altered differentiation in osteoblasts from genetically and clinically distinct craniosynostotic disorders, *Am J Pathology* **154** No 5: May 1999
- 39) Galzie Z, Kinsella AR, Smith JA (1997):  
Fibroblast growth factors and their receptors, *Biochem Cell Biol* **75 ( 6)** : 669-85
- 40) Givol D, Yayon A (1992):  
Complexity of FGF receptors:genetic basis for structural diversity and functional specificity, *FASEB J* **6**:3362-3369
- 41) Golla A, Lichtner P, von Gernet S, Winterpacht A, Fairley J, Murken J, Schuffenhauer S (1997):  
Phenotypic expression of the fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3) mutation P 250 R in a large craniosynostosis family, *Med Genet*, **34**:683-684
- 42) Goldfarb LG, Peterson RB, Tabaton M, Brown P, LeBlanc AC, Montagna P, Cortelli P, Julien J, Vital C, Pendelbury WW, Haltia M, Wills PR, Hauw JJ, McKeever PE, Monari L, Schrank B, Swergold GD, Autilio-Gambetti L, Gajdusek DC, Lugaresi E, Gambetti P (1992):  
Fatal familial insomnia and familial Creutzfeld-Jacob disease: Disease phenotype determined by a DNA polymorphism, *Science* **258**: 806-808
- 43) Gorlin RJ, Cohen MMjr., Levin LS (1990):  
Syndromes of the head and neck, *Oxford University Press New York*, 519-564
- 44) Gorry MC, Preston RA, White GJ, Zhang Y, Singhai VK, Losken HW, Parker MG, Nwokoro NA, Post JC, Ehrlich GD (1995):  
Crouzon syndrome: mutations in two spliceoforms of FGFR 2 and a common point mutation shared with Jackson-Weiss syndrome, *Hum Mol Genet* **4 ( 8)**: 1387-1390
- 45) Graham JM, Braddock SR, Mortier GR, Lachman R, Van Dop C, Jabs EW (1998):  
Syndrome of coronal craniosynostosis with brachydaktyly and carpal/tarsal coalition due to Pro 250 Arg mutation in FGFR 3 gene, *Am J Med Genet*, **77**:322-329
- 46) Gripp KW, Stolle CA, Mc Donald-Mc Ginn DM, Markowitz RI, Bartlett SP, Katowitz JA, Muenke M, Zackai EH (1998):  
Phenotype of the fibroblast growth factor receptor 2 Ser351Cys mutation: Pfeiffer syndrome type III, *Am J Med Genet* **78**: 356-360
- 47) Harbitz I, Kristensen T, Bosnes M, Kran S, Davies W (1992):  
DNA sequence of the skeletal muscle calcium release channel cDNA and verification of the Arg<sup>615</sup>->Cys<sup>615</sup> mutation, associated with porcine malignant hyperthermia, in Norwegian Landrace pigs, *Animal Genetics* **23**: 395-402
- 48) Hayashi K, Yandell DW (1993):  
How sensitive is PCR-SSCP?, *Hum Mutat* **2 (5)**: 338-46

- 49) Heath JK (1993):  
Growth Factors, IRL Press
- 50) Hennig W (1995):  
Genetik, Springer Verlag
- 51) Hinrichsen KV (1993):  
Human-Embryologie
- 52) Hollway GE, Suthers GK, Haan EA, Thompson E, David DJ, Gecz J, Mulley JC (1997):  
Mutation detection in FGFR 2 craniosynostosis syndromes, *Hum Genet* **99**: 251-255
- 53) Howard TD, Paznekas WA, Green ED, Chiang LC, Ma N, Ortiz de Luna RI, Delgado CG, Gonzalez-Ramos M, Kline AD, Jabs EW (1997):  
Mutations in TWIST, a basic helix-loop-helix transcription factor, in Saethre-Chotzen syndrome, *Nat Genet* **15**: 36-41
- 54) Hovig E, Smith-Soerensen B, Boerresen AL (1993):  
Current Protocols in Human Genetics, Volume 1
- 55) Jabs EW (1998):  
Toward understanding the pathogenesis of craniosynostosis through clinical and molecular correlates, *Clin Genet* **53**: 79-86
- 56) Jabs EW, Li X, Scott AF, Meyers G, Chen W, Eccles M, Mao J, Charnas LR, Jackson CE, Jaye M (1994):  
Jackson-Weiss and Crouzon syndromes are allelic with mutations in fibroblast growth factor receptor 2, *Nat Genet* **8**: 275-279
- 57) Jabs EW, Müller U, Li X, Ma L, Luo W, Haworth IS, Klisak I, Sparkes R, Warman ML, Mulliken JB, Snead ML, Maxson R (1993):  
A mutation in the homeodomain of the human MSX2 gene in a family affected with autosomal dominant craniosynostosis, *Cell* **75**: 443-450
- 58) Jackson CE et al. (1976):  
Craniosynostosis, mid-facial hypoplasia, and foot abnormalities: An autosomal dominant phenotype in a large Amish kindred, *J Pediatr* **88**: 963-968
- 59) Johnson DE, Williams LT (1993):  
Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family, *Adv Cancer Res* **60**: 1-41
- 60) Johnson D, Horsley SW, Moloney DM, Oldridge M, Twigg SRF, Walsh S, Barrow M, Njolstad PR, Kunz J, Ashworth J, Wall SA, Kearney L, Wilkie AOM (1998):  
A comprehensive screen for TWIST mutations in patients with craniosynostosis identifies a new microdeletion syndrome of chromosome band 7p21.1
- 61) Kostrzewa M, Müller U (1998):  
Genomic structure and complete sequence of the human FGFR 4 gene, *Mammalian Genome* **9**: 131-135
- 62) Krebs I, Weis I, Hudler M, Rommens JM, Roth H, Scherer SW, Tsui LC, Füchtbauer EM, Grzeschick KH, Tsuji K, Kunz J (1997):  
Translocation breakpoint maps 5 kb 3' from TWIST in a patient affected with Saethre-Chotzen syndrome, *Hum Mol Genet* **6** (7): 1079-1086
- 63) Krepelova A, Calda P, Plavka R, Baxova A, Kapras J (1998):  
FGFR 2 gene mutation Tyr 375 Cys in a new case of Beare-Stevenson syndrome, *Am J Hum Genet* **76**: 362-364

- 64) Kretz K et al. (1994):  
Cycle sequencing, *PCR Methods of Application*, **3(5)**, 107-12
- 65) Lajeunie E, Ma HW, Bonaventure J, Munnich A, Le Merrer M, Renier D (1995):  
FGFR 2 mutations in Pfeiffer syndrome, *Nat Genet* **9**: 108
- 66) Lajeunie E, Cameron R, El Ghouzzi V, de Parseval N, Journeau P, Gonzales M, Delezoide AL, Bonaventure J, Le Merrer M, Renier D (1999):  
Clinical variability in patients with Apert's syndrome, *J Neurosurg* **90 (3)**: 443-7
- 67) Lajeunie E, El Ghouzzi V, Le Merrer M, Munnich A, Bonaventure J, Renier D (1999):  
Sex related expressivity of the phenotype in coronal craniosynostosis caused by the recurrent P 250 R FGFR 3 mutation, *J Med Genet* **36**: 9-13
- 68) Lautenschlager N, Kurz A, Müller U (1999):  
Erbliche Ursachen und Risikofaktoren der Alzheimer-Krankheit, *Nervenarzt* **70**: 195-205
- 69) Lerman LS, Silverstein K (1987):  
Computational simulation of DNA melting and its application to denaturing gradient gel electrophoresis, *Methods in Enzymology*, **155**, 482-501
- 70) Lewanda AF, Cohen MM jr, Jackson DE, Taylor EW, Li X, Beloff M, Day D, Clarren SK, Ortiz R, Garcia C et al. (1994):  
Genetic heterogeneity among craniosynostosis syndromes: mapping the Seathre-Chotzen syndrome locus between D7S513 and D7S516 and exclusion of Jackson-Weiss and Crouzon syndrome loci from 7p, *Genomics* **19 ( 1 )**: 115-9
- 71) Li X, Park WJ, Pyeritz RE, Jabs EW (1995):  
Effect on splicing of a silent FGFR 2 mutation in Crouzon syndrome, *Nat Genet* **9**: 252-253
- 72) Li C, Chen L, Iwata T, Kitagawa M, Fu XY, Deng CX (1999):  
A Lys 644 Glu substitution in fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3) causes dwarfism in mice by activation of STATs and ink4 cell cycle inhibitors, *Hum Mol Genet* **8(1)**: 35-44
- 73) Ma HW, Lajeunie E, Le Merrer M, de Parseval N, Serville F, Weissenbach J, Munnich A, Renier D (1995):  
No evidence of genetic heterogeneity in Crouzon craniofacial dysostosis, *Hum Genet* **96**: 731-735
- 74) Mattei M-G, Moreau A, Gesnel M-C, Houssaint E, Breathnach R (1991):  
Assignment by in situ hybridization of a fibroblast growth factor receptor gene to human chromosome band 10q26, *Hum Genet* **87**: 84-86
- 75) Macek M Jr., Mercier B, Mackova A, Weiner Miller P, Hamosh A, Ferec C, Cutting GR (1997):  
Sensitivity of the denaturing gradient gel electrophoresis technique in detection of known mutations and known Asian mutations in the CFTR gene, *Hum Mutat* **9**: 136-147
- 76) Martin GR (1998):  
The roles of FGFs in the early development of vertebrate limbs, *Genes & Development* **12**: 1571-1586
- 77) Mason IJ (1994):  
The ins and outs of fibroblast growth factors, *Cell* **78**: 547-552
- 78) Moloney DM, Slaney SF, Oldridge M, Wall SA, Sahlin P, Stenman G, Wilkie AOM (1996):  
Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome, *Nat Genet* **13**: 48-53
- 79) Meyers GA, Day D, Goldberg R, Daentl DL, Przylepa KA, Abrams LJ, Graham JM, Feingold M, Moeschler JB, Rawnsley E, Scott AF, Jabs EW (1996):  
FGFR 2 exon IIIa and IIIc mutations in Crouzon, Jackson-Weiss, and Pfeiffer syndromes: Evidence for missense changes, insertions, and a deletion due to alternative RNA splicing, *Am J Hum Genet* **58**: 491-498

- 80) Meyers GA, Orlow SJ, Munro IR, Przylepa KA, Jabs EW (1995):  
Fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR 3) transmembrane mutation in Crouzon syndrome with acanthosis nigricans, *Nat Genet* **11**: 462-464
- 81) Moloney DM, Slaney SF, Oldridge M, Wall SA, Sahlin P, Stenman G, Wilkie AOM (1996):  
Exclusive paternal origin of new mutations in Apert syndrome, *Nat Genet* **13**: 48-53
- 82) Moloney DM, Wall SA, Ashworth GJ, Oldridge M, Glass A, Francomano CA, Muenke M, Wilkie AOM (1997):  
Prevalence of Pro 250 Arg mutation of fibroblast growth factor receptor 3 in coronal craniosynostosis, *Lancet* **349**: 1059-62
- 83) Muenke M, Schell U, Hehr A, Robin NH, Losken HW, Schinzel A, Pulleyn LJ, Rutland P, Reardon W, Malcolm S, Winter RM (1994):  
A common mutation in the fibroblast growth factor receptor 1 gene in Pfeiffer syndrome, *Nat Genet* **8**:269-274
- 84) Muenke M, Gripp KW, Mc Donald-Mc Ginn DM, Gaudenz K, Whitaker LA, Bartlett SP, Markowitz RI, Robin NH, Nwokoro N, Mulvihill JJ, Losken HW, Mulliken JB, Guttmacher AE, Wilroy RS, Clarke LA, Hollway G, Ades LC, Haan EA, Mulley JC, Cohen MM, Bellus GA, Francomano CA, Moloney DM, Wall SA, Wilkie AOM, Zackai EH (1997):  
A unique point mutation in the fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR 3) defines a new craniosynostosis syndrome, *Am J Hum Genet* **60**:555-564
- 85) Müller U, Steinberger D, Kunze S (1997):  
Molecular genetics of craniosynostotic syndromes, *Graefe's Arch Clin Exp Ophthalmol* **1997**: 1-6
- 86) Mulliken JB, Steinberger D, Kunze S, Müller U (1999):  
Molecular diagnosis of bilateral coronal synostosis, *Plast Reconstr Surg* **104 (6)**: 1603-15
- 87) Mulliken JB, Mathew L und MD, Warman MD (1996):  
Molecular genetics and craniofacial surgery, *Plastic and Reconstructive Surg* **97 ( 3)**: 666-675
- 88) Mulvihill JJ (1995):  
Craniofacial syndromes: no such thing as a single gene disease, *Nat Genet* **9**: 101-103
- 89) Müller U, Warman ML, Mulliken JB, Weber JL (1993):  
Assignment of a gene locus involved in craniosynostosis to chromosome 5qter, *Hum Mol Genet* **2**: 119-122
- 90) Murdoch-Kinch CA, Ward RE (1997):  
Metacarpophalangeal analysis in Crouzon syndrome: additional evidence for phenotypic convergence with the acrocephalosyndactyly syndromes, *Am J Med Genet* **73**: 61-66
- 91) Muyzer G, Hottenträger S, Teske A, Wawer C (1996):  
Denaturing gradient gel electrophoresis of PCR-amplified 16S rDNA-a new molecular approach to analyse the genetic diversity of mixed microbial communities, *Molecular Microbial Ecology Manual* **3.4.4**:1-23
- 92) Myers RM, Ellenson LH, Hayashi K. (1997):  
Genome Analysis, *Cold Spring Harbour Press, New York*
- 93) Naski MC, Wang Q, Xu J, Ornitz DM (1996):  
Graded activation of fibroblast growth factor receptor 3 by mutations causing achondroplasia and thanatophoric dysplasia, *Nat Genet* **13 (2)**: 233-7
- 94) Neilson KM, Friesel R (1996):  
Ligand-independent activation of fibroblast growth factor receptors by point mutations in the extracellular, transmembrane, and kinase domains, *J Biol Chem* **271**: 25049-25057

- 95) Newton CR (1995):  
PCR – essential data, *Wiley, Chichester*
- 96) Newton CR, Graham A (1994):  
PCR, *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*
- 97) Nicholl DST (1995):  
Gentechnische Methoden, *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*
- 98) Nicola NA (1994):  
Guidebook to Cytokines and Their Receptors, *A Sambrook and Tooze Publication at Oxford University Press*
- 99) Niemand HG, Suter PF (1994):  
Praktikum der Hundeklinik, *Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin*
- 100) O'Brien SJ, Wienberg J, Lyons LA (1997):  
Comparative genomics lessons from cats, *TIG* **13** (10): 393-399
- 101) Oldridge M, Wilkie AOM, Slaney SF, Poole MD, Pulleyn LJ, Rutland P, Hockley AD, Wake MJC, Goldin JH, Winter RM, Reardon W, Malcolm S (1995):  
Mutations in the third immunoglobulin in the fibroblast growth receptor 2 gene in Crouzon syndrome, *Hum Mol Genet* **4**: 1077-1082
- 102) Oldridge M, Lunt PW, Zackai EH, et al. (1997):  
Genotype-phenotype correlation for nucleotide substitutions in the Ig II-Ig III linker of FGFR 2, *Hum Mol Genet* **6** (1): 137-43
- 103) Orita M, Iwahana H, Kanazawa H, Hayashi K, Sekiya T (1989):  
Detection of polymorphisms of human DNA by gel electrophoresis as single strand conformation polymorphisms, *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 2766-2770
- 104) Park WJ, Bellus GA, Jabs EW (1995):  
Mutations in fibroblast growth factor receptors: phenotypic consequences during eukariotic development, *Am J Hum Genet* **57**: 748-754
- 105) Park WJ, Theda C, Maestri NE, et al. (1995):  
Analysis of phenotypic features and FGFR 2 mutations in Apert syndrome, *Am J Hum Genet* **57**: 321-328
- 106) Passos-Bueno MR, Sertie AL, Richieri-Costa A, Alonso LG, Zatz M, Alonso N, Brunoni D, Ribeiro SFM (1998):  
Description of a new mutation and characterization of FGFR 1, FGFR 2, and FGFR 3 mutations among brazilian patients with syndromic craniosynostoses, *Am J Med Genet* **78**: 237-241
- 107) Passos-Bueno MR, Wilcox WR, Jabs EW, Sertie AL, Alonso LG, Kitch H (1999):  
Clinical spectrum of fibroblast growth factor receptor mutations, *Hum Mutat* **14**: 115-125
- 108) Paznekas WA, Cunningham ML, Howard TD, Korf BR, Lipson MH, Grix AW, Feingold M, Goldberg R, Borochowitz Z, Aleck K, Mulliken J, Yin M, Jabs EW (1998):  
Genetic heterogeneity of Saethre-Chotzen syndrome due to Twist and FGFR mutations, *Am J Hum Genet* **62**: 1370-1380
- 109) Pfeiffer RA (1964):  
Dominant erbliche Akrocephalosyndaktylie, *Z Kinderheilkd* **90**: 301-320
- 110) Plomp AS, Hamel BCJ, Cobben JM, Verloes A, Offermans JPM, Lajeunie E, Fryns JP, de Die-Smulders CEM (1998):  
Pfeiffer syndrome type 2: further delineation and review of the literature, *Am J Med Genet* **75**: 245-251

- 111) Plotnikov AN, Schlessinger J, Hubbard SR, Mohammadi M (1999):  
Structural basis for FGF Receptor dimerization and activation, *Cell* **98**: 641-650
- 112) Przylepa KA, Paznekas W, Zhang M, Golabi M, Bias W, Bamshad MJ, Carey JC, Hall BD, Stevenson R, Orlow SJ, Cohen MM, Jabs EW (1996):  
Fibroblast growth factor receptor 2 mutations in Beare-Stevenson cutis gyrata syndrome, *Nat Genet* **13**: 492-494
- 113) Pulleyn LJ, Reardon W, Wilkes D, Rutland P, Jones BM, Hayward R, Hall CM, Bructon L, Chun N, Lammer E, Malcolm S, Winter RM (1996):  
Spectrum of craniosynostosis phenotypes associated with novel mutations at the fibroblast growth factor receptor 2 locus, *Eur J Hum Genet* **4**(5):283-91
- 114) Reardon W, Wilkes D, Rutland P, Pulleyn LJ, Malcolm S, Dean JCS, Evans RD, Jones BM, Hayward R, Hall CM, Nevin NC, Baraitser M, Winter RM (1997):  
Craniosynostosis associated with FGFR 3 Pro 250 Arg mutation results in a range of clinical presentations including unsutural sporadic craniosynostosis, **34**:632-636
- 115) Reardon W, Winter RM, Rutland P, Pulleyn LJ, Jones BM, Malcolm S (1994):  
Mutations in the fibroblast growth factor receptor 2 gene cause Crouzon syndrome, *Nat Genet* **8**: 98-102
- 116) Rickwood D (1993):  
Growth factors, *Oxford University Press*
- 117) Robin NH, Scott JA, Arnold JE, Goldstein JA, Shilling BB, Marion RW, Cohen jr. MM (1998):  
Favorable prognosis for children with Pfeiffer syndrome types 2 and 3: Implications for classification, *Am J Med Genet* **75**: 240-244
- 118) Robin NH, Feldman GJ, Mitchell HF, Lorenz P, Wilroy RS, Zackai EH, Allanson JE, Reich EW, Pfeiffer RA, Clarke LA, Warman ML, Mulliken JB, Brueton LA, Winter RM, Price RA, Gasser DL, Muenke M (1994):  
Linkage of Pfeiffer syndrome to chromosome 8 centromere and evidence for genetic heterogeneity, *Hum Mol Genet* **3**: 2153-2158
- 119) Robertson SC, Meyer AN, Hart KC, Galvin BD, Webster MK, Donoghue DJ (1998):  
Activating mutations in the extracellular domain of the fibroblast growth factor receptor 2 function by disruption of the disulfide bond in the third immunoglobulin-like domain, *Proc Natl Acad Sci* **95**:4567-4572
- 120) Rose CSP, Malcolm S (1997):  
A TWIST in development, *TIG* **13** (10): 384-387
- 121) Rose CSP, Patel P, Reardon W, Malcolm S, Winter RM (1997):  
The TWIST gene, although not disrupted in Saethre-Chotzen patients with apparently balanced translocations of 7p21, is mutated in familial and sporadic cases, *Hum Mol Genet* **6** (8): 1369-1373
- 122) Rosenberger G (1994):  
Krankheiten des Rindes, *Blackwell Wissenschafts-Verlag Berlin*
- 123) Rösler M, Retz W, Thome J (1997):  
Alzheimer Krankheit, *Deutscher Studien Verlag Weinheim*
- 124) Rousseau F et al. (1996):  
Missense FGFR 3 mutations create cysteine residues in thanatophoric dwarfism type I ( TDI ), *Hum Mol Genet* **5**: 509-512
- 125) Rousseau F, Saugier P, Le Merrer M, Munnich A, Delezoide AL, Maroteaux P, Bonaventure J, Narcy F, Sanak M (1995):  
Stop codon FGFR 3 mutations in thanatophoric dwarfism type I, *Nat Genet* **10** : 11-12

- 126) Rutland P, Pulleyn LJ, Reardon W, Baraitser M, Hayward R, Jones B, Malcolm S, Winter RM, Oldridge M, Slaney SF, Poole MD, Wilkie AOM (1995):  
Identical mutations in the FGFR 2 gene cause both Pfeiffer and Crouzon syndrome phenotypes, *Nat Genet* **9**:173-176
- 127) Saethre H (1931):  
Ein Beitrag zum Turmschädelproblem. ( Pathogenese, Erbllichkeit und Symptomologie). *Dtsch Z Nervenheilkd* **117**: 533-555
- 128) Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S et al. (1988):  
Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase, *Science* **239**:487-491
- 129) Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989):  
Molecular cloning.A laboratory manual.*Cold Spring Harbour Press, New York*
- 130) Sanger F, Nicklen S, Coulson AR (1977):  
DNA sequencing with chain-terminating inhibitors, *Proc Natl Acad Sci USA* **74**: 5463-5467
- 131) Schlessinger J (1988):  
Signal transduction by allosteric receptor oligomerisation, *Trends Biochem Sci* **13**: 443-447
- 132) Schlessinger J (1994):  
SH2/SH3 signaling proteins, *Curr Opin Genet Dev* **4**: 25-30
- 133) Schnorr B (1989):  
Embryologie der Haustiere, *Enke Verlag Stuttgart*
- 134) Sheffield VC, Cox DR, Lerman LS, Myers RM (1989):  
Attachment of a 40-base-pair G+C rich sequence (GC-clamp) to genomic DNA fragments by the polymerase chain reaction results in improved detection of single-base changes, *Proc Natl Acad Sci* **86**, 232-6
- 135) Sheffield VC, Beck JS, Kwitek AE, Sandstrom DW, Stone EM (1993):  
The sensitivity of single-strand conformation polymorphism analysis for the detection of single base substitutions, *Genomics* **16**, 325-32
- 136) Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Church DM, Fielder TJ, Bocian M, Winokur ST, Wasmuth JJ (1994):  
Mutations in the transmembrane domain of FGFR 3 cause the most common genetic form of dwarfism, achondroplasia, *Cell* **78**, 335-342
- 137) Singer M, Berg P (1992):  
die Sprache der Gene, *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*
- 138) Slaney SF, Oldridge M, hurst JA, Morriss-Kay GM, Hall CM, Poole MD, Wilkie AOM (1996):  
Differential effects of FGFR 2 mutations on syndactyly and cleft palate in Apert syndrome, *Am J Hum Genet* **58**:923-932
- 139) Steinberger D, Vriend G, Mulliken JB, Müller U (1998):  
The mutations in FGFR 2-associated craniosynostoses are clustered in five structural elements of immunoglobulin-like domain III of the receptor, *Hum Genet* **102**:145-150
- 140) Steinberger D, Mulliken JB, Müller U (1995):  
Prediposition for cysteine substitutions in the immunoglobulin-like chain of FGFR 2 in Crouzon syndrome, *Hum Genet* **96**: 113-115
- 141) Steinberger D, Collmann H, Schmalenberger B, Müller U (1997):  
A novel mutation (a886g) in exon 5 of FGFR 2 in members of a family with Crouzon phenotype and plagiocephaly, *J Med Genet* **34** (5): 420-422

- 142) Steinberger D, Mulliken JB, Müller U (1996):  
Crouzon syndrome: previously unrecognized deletion, duplication, and point mutation within FGFR 2 gene, *Hum Mutat* **8**: 386-390
- 143) Steinberger D, Reinhartz T, Unsöld R, Müller U (1996):  
FGFR 2 mutation in clinically nonclassifiable autosomal dominant craniosynostosis with pronounced phenotypic variation, *Am J Med Genet* **66**: 81-86
- 144) Strauss WM  
Current Protocols in Molecular Biology, Volume 1
- 145) Strachan T, Read AP (1996):  
Molekulare Humangenetik, *Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg*
- 146) Tartaglia M, Di Rocco C, Lajeunie E, Valeri S, Velardi F, Battaglia PA (1997):  
Jackson-Weiss syndrome: identification of two novel FGFR 2 missense mutations shared with Crouzon and Pfeiffer craniosynostotic disorders, *Hum Genet* **101**: 47-50
- 147) Tartaglia M, Bordini V, Velardi F, Basile RT, Saulle E, Tenconi R, Di Rocco C, Battaglia PA (1999):  
Fibroblast growth factor receptor mutational screening in newborns affected by metopic synostosis, *Childs Nerv Syst* **15** (8): 389-394
- 148) Tavormina PL, Shiang R, Thompson LM, Zhu YZ, Wilkin DJ, Lachman RS, Wilcox WR, et al. (1995b):  
Thanatophoric dysplasia ( types I and II ) caused by distinct mutations in fibroblast growth factor receptor 3, *Nat Genet* **9**: 321-328
- 149) Tavormina PL et al. (1995):  
Another mutation that results in the substitution of an unpaired cysteine residue in the extracellular domain of FGFR 3 in Thanatophoric dysplasia, *Hum Mol Genet* **11**: 2175-2177
- 150) Thompson LM, Plummer S, Schalling M, Altherr MR, Gusella JF, Housman DE, Wasmuth JJ (1991):  
A gene encoding a fibroblast growth factor receptor isolated from the Huntington disease gene region of human chromosome 4, *Genomics* **11**: 1133-1142
- 151) Upton J (1991):  
Classification and pathological anatomy of limb anomalies, *Clin Plast Surg* **18**: 321-355
- 152) Usha AP, Lester DH, Williams JL (1996):  
Dwarfism in dexter cattle is not caused by the mutations in FGFR 3 responsible for achondroplasia in humans, *Anim Genet* **28**: 55-57
- 153) Valentine BA, Cooper BJ, Cummings JF, de Lahunta A (1996):  
Progressive muscular dystrophy in a golden retriever dog: Light microscope and ultrastructural features at 4 and 8 months, *Acta Neuropathol* **71**: 301-310
- 154) Vogel F (1989):  
Humangenetik
- 155) Warman ML, Mulliken JB, Hayward PG, Müller U (1993):  
Newly recognized autosomal dominant disorder with craniosynostosis, *Am J Med Genet* **46**: 444-449
- 156) Warrington JA, Bailey SK, Armstrong E, Aprelikova O, Alitalo K, Dolganov GM, Wilcox AS, Sikela JM, Wolfe SF, Lovett M, Wasmuth JJ (1992):  
A radiation hybrid map of 18 growth factor, growth factor receptor, hormone receptor, or neurotransmitter receptor genes on the distal region of the long arm of chromosome 5, *Genomics* **13**: 803-808
- 157) Webster MK, Donoghue DJ (1997):  
FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing, *Trends Genet* **13**: 178-182

- 158) Webster MK, Donoghue DJ (1996):  
Constitutive activation of fibroblast growth factor receptor 3 by the transmembrane domain point mutation found in achondroplasia, *EMBO J* **15** (3): 520-7
- 159) Williams AF, Barclay AN (1988):  
The immunoglobulin superfamily-domain for cell surface recognition, *Ann Rev Immunol* **6**: 381-405
- 160) Wilkes D, Rutland P, Pulleyn LJ, Reardon W, Moss C, Ellis JP, Winter RM, Malcolm S (1996):  
A recurrent mutation, ala 391 glu, in the transmembrane region of FGFR 3 causes Crouzon syndrome and acanthosis nigricans, *J Med Genet* **33**: 744-748
- 161) Wilkie AOM (1997):  
Craniosynostosis: genes and mechanisms, *Hum Mol Genet* **6** No 10: 1647-1656
- 162) Wilkie AOM, Moriss-Kay GM, Jones EY, Heath JK (1995a):  
Functions of fibroblast growth factors and their receptors, *Curr Biol* **5**: 500-507
- 163) Wilkie AOM, Slaney SF, Oldridge M, Poole MD, Ashworth GJ, Hockley AD, Hayward RD, David DJ, Pulleyn LJ, Rutland P, Malcolm S, Winter RM, Reardon W (1995b):  
Apert syndrome results from localized mutations of FGFR 2 and is allelic with Crouzon syndrome, **9**:165-172
- 164) Winter RM (1996):  
What's in a face?, *Nat Genet* **12**: 124-129
- 165) Wood S, Schertzer M, Yaremko ML (1995):  
Sequence identity locates CEBPD and FGFR 1 to mapped human loci within proximal 8p. *Cytogenet Cell Genet* **70**: 188-191
- 166) Wüchner C, Hilbert K, Zabel B, Winterpacht A (1997):  
Human fibroblast growth factor receptor 3 gene (FGFR 3): genomic sequence and primer set information for gene analysis, *Hum Genet* **100**: 215-219
- 167) Xiang L, Park WJ, Pyeritz RE, Jabs EW (1995):  
Effect on splicing of a silent FGFR 2 mutation in Crouzon syndrome, *Nat Genet* **9**: 232-33
- 168) Zschocke J, Hoffmann G (1997):  
Denaturierungs-Gradienten-Gelelektrophorese zur Identifizierung unbekannter Mutationen, *Biospektrum* **1**:73-74

## **10. Anhang**

### **10.1 Abkürzungen**

|        |                                                                       |
|--------|-----------------------------------------------------------------------|
| A      | Adenin                                                                |
| Abb.   | Abbildung                                                             |
| AS     | Aminosäure                                                            |
| APS    | Ammoniumpersulfat                                                     |
| Arg    | Arginin                                                               |
| Asn    | Asparagin                                                             |
| Asp    | Asparaginsäure                                                        |
| Ala    | Alanin                                                                |
| bp     | Basenpaare                                                            |
| bzw.   | beziehungsweise                                                       |
| ° C    | Grad Celsius                                                          |
| C      | Cytosin                                                               |
| Cys    | Cystein                                                               |
| Ci     | Curie                                                                 |
| DMSO   | Dimethylsulfoxid                                                      |
| DNA    | Desoxyribonukleinsäure                                                |
| EDTA   | Ethylendiamintetraacetat                                              |
| EGF    | Epidermal growth factor                                               |
| EGFR   | Epidermal growth factor receptor                                      |
| et al. | et altera                                                             |
| FGF    | Fibroblast growth factor                                              |
| FGFR   | Fibroblast growth factor receptor                                     |
| g      | Gramm                                                                 |
| Glu    | Glutaminsäure                                                         |
| Gly    | Glycin                                                                |
| Gln    | Glutamin                                                              |
| h      | Stunde                                                                |
| HCl    | Salzsäure                                                             |
| His    | Histidin                                                              |
| Ile    | Isoleucin                                                             |
| l      | Liter                                                                 |
| Leu    | Leucin                                                                |
| Lys    | Lysin                                                                 |
| M      | Molar                                                                 |
| m      | milli                                                                 |
| μ      | Mikro                                                                 |
| min.   | Minute                                                                |
| ml     | Milliliter                                                            |
| mM     | Millimolar                                                            |
| PAGE   | Polyacrylamidgelelektrophorese                                        |
| PCR    | Polymerase chain reaction                                             |
| PDGF   | Platelet derived growth factor<br>(Wachstumsfaktor aus Blutplättchen) |
| Phe    | Phenylalanin                                                          |
| RNA    | Ribonukleinsäure                                                      |
| rpm    | rounds per minute (Umdrehungen pro Minute)                            |

---

|       |                        |
|-------|------------------------|
| RT    | Raumtemperatur         |
| Ser   | Serin                  |
| Sec   | Sekunde                |
| Thr   | Threonin               |
| Tyr   | Tyrosin                |
| TEMED | Tetramethylethyldiamin |
| U     | Units                  |
| Val   | Valin                  |
| z.B.  | zum Beispiel           |

## **10.2 Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. U. Müller für die Überlassung des Themas und die intensive Betreuung bei der Anfertigung dieser Arbeit.

Herrn Prof. Dr. E. Schimke danke ich für die Betreuung und Vertretung der Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin.

Danken möchte ich außerdem Frau Dr. Daniela Steinberger für die gute Betreuung bei der praktischen Durchführung dieser Arbeit sowie Herrn Dr. Hans Joos und Herrn Andreas Wagner für ihre Diskussionsbereitschaft, die kollegiale Zusammenarbeit und die Kekse.

Silke Reichmann-Repp und Tanja Schmidt danke ich für die Versorgung mit Büromaterialien und ihre Hilfe bei den computertechnischen Fragen und Problemen.

Meinen Eltern danke für die finanzielle Unterstützung während meines Studiums, meinem Vater und Adele Schmidt außerdem ganz besonders herzlich für die Korrektur der Rechtschreibung und moralische Unterstützung während dieser Arbeit.

Danken möchte ich meinen Freunden Ute Mayr, Patrick Hirsch, Michaela Hoffmann, Claudia Scheef, Ute Kaim, Bettina Nier, Meike Schüddemage, Maja Schneider-Kühnle, Annette Wenisch und Katja Roscher für die Hilfe in allen Lebenslagen.

Nicht zuletzt gilt mein besonderer Dank meinem Freund Dirk Debus und Laura für die langen Spaziergänge und aufmunternden Worte, ohne die diese Arbeit nicht entstanden wäre.