

Aus dem Institut für Humangenetik und Anthropologie, Abteilung DNA-Diagnostik
der Albert-Ludwigs-Universität Freiburg i. Br.

**Mutationssuche und deren Analyse in den *LIS1*- und *DCX*-Genen bei
Patienten mit Lissenzephalie**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur

Erlangung des Medizinischen Doktorgrades

der Medizinischen Fakultät

der Albert-Ludwigs-Universität

Freiburg i. Br.

Vorgelegt 2006

von Lisa Dey

geboren in Landau i. d. Pf.

Dekan:	Prof. Dr. C Peters
1. Gutachter:	PD DJ Morris-Rosendahl (PhD)
2. Gutachter:	PD Dr. med. H Omran
Jahr der Promotion:	2006

Teile dieser Arbeit wurden bereits als Tagungsbeiträge veröffentlicht:

- **Mainberger L**, Steuernagel P, Korenke C, Meng M, Wolff G, Morris-Rosendahl DJ (2003) Two new mutations in the 3`coding region of the *LIS1* gene cause various grades of lissencephaly. *Med Genet* **15**(3): 333
- Moog U, Dobyns WB, **Mainberger L**, Dijkstra S, Morris-Rosendahl DJ (2003) Importance of neuroimaging studies in the evaluation of mental retardation: apropos of a case. *Proc Greenwood Genet Center* **23**:166-167
- Morris-Rosendahl DJ, Ravaglia S, Uyanik G, **Mainberger L**, De la Guardia A, Moog U, Kohlhase J (2005) Mutation analysis in the *DCX* gene confirms the high prevalence of mosaicism as a cause of subcortical band heterotopia/double cortex syndrome. *Eur J Hum Genet* **13**(1): 267

Außerdem ist diese Arbeit Bestandteil von zwei Veröffentlichungen in Vorbereitung:

- Uyanik G, Morris-Rosendahl DJ, Stiegler J, **Dey L**, Gross C, Zeschnick C *et al.* Phenotype-genotyp correlation in patients with mutations in the *LIS1* gene are obscured by somatic mosaicism and other factors.
- Morris-Rosendahl DJ, Ravaglia S, Uyanik G, **Dey L**, De la Guardia A, Brockmann K *et al.* Mutation analysis in the *DCX* gene confirms the high prevalence of mosaicism as a cause of subcortical band heterotopia/double cortex syndrome.

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin (Base der DNA)
Abbildung	Abbildung
Ala	Alanin
Arg	Arginin
ARX	<i>englisch</i> : aristaless related homeobox
AS	Aminosäure
Asp	Asparagin
A>C	Nukleotidaustausch von Adenin zu Cytosin
a>p	anterior stärker ausgeprägt als posterior
bp	Basenpaar(e)
BSA	<i>englisch</i> : bovine serum albumin Rinderserumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin (Base der DNA)
c.	cDNA-Nummerierung
cDNA	<i>englisch</i> : complementary DNA, zur mRNA komplementäre DNA
Ci	Curie
Cys	Cystein
C>A	Nukleotidaustausch von Cytosin zu Adenin
C>G	Nukleotidaustausch von Cytosin zu Guanin
C>T	Nukleotidaustausch von Cytosin zu Thymin
DC	Doublecortin (Protein), Doublecortex
DCX	<i>Doublecortex</i> (Gen), Doublecortin (Protein)
del	Deletion
dH ₂ O	destilliertes Wasser
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	<i>englisch</i> : Desoxyribo Nucleic Acid, Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
Ex	Exon
F/f	<i>englisch</i> : forward (DNA-Strang in Leserichtung)
FCMD	<i>englisch</i> : Fukuyama congenital muscle-dystrophy, Fukuyama kongenitale Muskeldystrophie
FIGQY	Aminosäurefolge als charakteristisches Motiv
FISH	Fluoreszenz- <i>in-situ</i> -Hybridisierung
FLNA	Filamin A
G	Guanin (Base der DNA)
g	Gramm
GABA	Gammaaminobuttersäure (-acid)
Gly	Glycin
GTP	Guanosin-5'-Triphosphat
G>A	Nukleotidaustausch von Guanin zu Adenin
h	Stunde
HPLC-Wasser	deionisiertes Wasser; HPLC-analysiert
ILS	Isolierte Lissenzephalie
kb	Kilobasenpaar(e)
kDa	Kilo-Dalton (Einheit des Molekulargewichts)
l	Liter
LCH	Lissenzephalie mit Hypoplasie des Cerebellums
Leu	Leucin
LIS1	Lissenzephalie 1 Gen/Protein
LisH	<i>englisch</i> : LIS1 Homology domain
Ile	Isoleucin
Lys	Lysin
M	Molarität
m	milli (x 10 ⁻³), bzw. Meter
μ	micro (x 10 ⁻⁶)
MAP	Mikrotubuli-assoziiertes Protein
MDS	Miller-Dieker-Syndrom

MEB	<i>englisch</i> : Muscle-eye-brain disease
min	Minute
mol	molar
mRNA	<i>englisch</i> : messenger RNA
MRT	Magnetresonanz-Tomographie
MTOC	<i>englisch</i> : microtubule organizing center
n	nano ($\times 10^{-9}$)
NCBI	<i>englisch</i> : National Center for Biotechnological Information
Nud	<i>englisch</i> : nuclear distribution defect; Gruppe von Genen, die für die Kernwanderung notwendig sind (z.B. NudE, NudA, NudF)
NUDEL	<i>englisch</i> : nuclear distribution Factor L
OMIM	<i>englisch</i> : Online Mendelian Inheritance in Man
p	kurzer Arm eines Chromosoms
p>a	posterior stärker ausgeprägt als anterior
PAF	<i>englisch</i> : platelet-activating-factor, Thrombozyten-aktivierender Faktor
PAFAH	<i>englisch</i> : platelet-activating-factor acetyl-hydrolase, Acetylhydrolase des Thrombozyten-aktivierenden Faktors
PAFAH1B1/2/3	<i>englisch</i> : platelet-activating-factor acetyl-hydrolase1 brain isoform 1/2/3, Gehirn-Isoform 1/2/3 der Acetylhydrolase (Isoform 1) des Thrombozyten-aktivierenden Faktors
Pat.	Patient
PCR	<i>englisch</i> : Polymerase Chain Reaktion, Polymerasekettenreaktion
Phe	Phenylalanin
POMGnT1	Protein-O-Mannose- β -1,2-N-acetylglucosaminyl-Transferase; <i>POMGnT1</i> -Gen
POMT1/2	Protein-O-Mannosyltransferase 1/2; <i>POMT1/2</i> -Gen
Pu	Purin
Py	Pyrimidin
q	langer Arm eines Chromosoms
R/r	<i>englisch</i> : reverse (DNA-Strang entgegen der Leserichtung)
R/Arg	Arginin
RELN	<i>Reelin</i> (Gen), Reelin (Protein)
RNA	<i>englisch</i> : Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
rpm	<i>englisch</i> : rounds per minute, Umdrehungen pro Minute
S/Ser	Serin
SBH	Subkortikale Band Heterotopie
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde
SSC	<i>englisch</i> : standard saline citrate buffer
T	Thymin (Base der DNA)
T/Thr	Threonin
T _a	Annealing-Temperatur
Tab.	Tabelle
Taq	<i>Thermus aquaticus</i>
TBE	Tris-Borat-EDTA-Puffer
TE	Tris-EDTA-Puffer
T>C	Nukleotidaustausch von Thymin zu Cytosin
U	<i>englisch</i> : unit, Einheit der Enzymaktivität
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volt
Val	Valin
WD	Wiederholung der Abfolge aus Tryptophan (W) und Asparaginsäure (A)
WWS	Walker-Warburg Syndrom
X	X-Chromosom
XLAG	X-chromosomale Lissenzephalie mit abnormen Genitalien
XLIS	X-chromosomale Lissenzephalie
YWHAE	Tyrosin 3-Monooxygenase/Tryptophan 5- Monooxygenase Aktivator-Protein
°C	Grad Celsius
α - ³² P	radioaktiv-markierter Phosphor

Inhalt

Seitenzahl

1. Einleitung	1
1.1 Historischer Überblick.....	1
1.2 Kortikogenese.....	2
1.3 Einteilung der Lissenzephalien.....	3
1.4 Klinik.....	5
1.5 Pathomorphologie bei ILS und dem Double-Cortex-Syndrom.....	6
1.6 Gene und Genprodukte.....	8
1.6.1 Das <i>LIS1</i> -Gen.....	8
1.6.2 Das LIS1-Protein PAFAH1B1 und seine Funktion.....	10
1.6.3 Das <i>DCX</i> -Gen.....	13
1.6.4 Das DCX-Protein Doublecortin und seine Funktion.....	15
1.6.5 Interaktion von LIS1 und DCX.....	16
1.6.6 Weitere Gene.....	18
1.6.6.1 Mutiertes <i>14-3-3ε</i> bei Patienten mit MDS.....	18
1.6.6.2 <i>Reelin</i> -Mutationen bei Patienten mit LCH.....	19
1.6.6.3 <i>ARX</i> - Mutationen bei Patienten mit XLAG.....	20
2. Fragestellung	22
3. Material und Methoden	23
3.1 Material.....	23
3.1.1 DNA-Proben: Patienten-DNA.....	23
3.1.2 DNA-Proben: Kontrollpersonen.....	23
3.1.3 <i>LIS1</i> -Gen.....	23
3.1.4 Primer für das <i>LIS1</i> -Gen.....	25
3.1.5 Primer für die allelspezifische PCR des Intron 7 des <i>LIS1</i> - Gens.....	26
3.1.6 Primer zur Amplifikation eines PCR-Produkts aus cDNA (<i>LIS1</i> -Gen).....	26
3.1.7 <i>DCX</i> -Gen.....	27
3.1.8 Primer für das <i>DCX</i> -Gen.....	28
3.2 Methoden.....	29
3.2.1 DNA-Extraktion.....	29
3.2.2 RNA-Extraktion.....	29
3.2.3 DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung.....	30
3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR).....	30

3.2.5	Agarosegelelektrophorese.....	31
3.2.6	Aufreinigung der PCR-Produkte.....	32
3.2.7	Sequenzierung von DNA.....	32
3.2.8	Aufbereitung der sequenzierten Eluate.....	33
3.2.9	Analyse und Auswertung der sequenzierten Proben.....	33
3.2.10	Restriktionsverdau mit <i>Ddel</i> , <i>ApoI</i> , <i>MnII</i> , <i>TseI</i>	34
3.2.11	Allelspezifische PCR.....	34
3.2.12	RT-PCR.....	34
3.2.13	PCR mit cDNA.....	35
3.2.14	Southern Blot.....	35
4.	Ergebnisse.....	38
4.1	Fallbeschreibung.....	38
4.2	Ergebnisse der Mutationsanalyse durch direkte DNA-Sequenzierung.....	42
4.2.1	Mutationen im <i>LIS1</i> -Gen.....	44
4.2.1.1	Mutation c.1197C>A (S399R) bei Patientin D3133.....	44
4.2.1.2	Mutation c.1050delG bei Patientin D3077.....	46
4.2.2	Mutationen im <i>DCX</i> -Gen.....	47
4.2.2.1	Mutation c.236C>G bei Patientin D3242.....	47
4.2.3	Polymorphismen im <i>LIS1</i> -Gen.....	50
4.2.3.1	c.568+27T>C.....	50
4.2.3.2	c.1233+17C>T.....	51
4.2.4	Neue Polymorphismen im <i>LIS1</i> -Gen – Der Fall D3050.....	52
4.3	Southern Blot.....	60
5.	Diskussion.....	63
6.	Zusammenfassung.....	70
7.	Abbildungs- und Tabellenverzeichnis.....	71
8.	Literaturverzeichnis.....	73
	Appendix 1 – Materialien.....	84
	Appendix 2 – Puffer und Salzlösungen – Gele.....	86
	Appendix 3 – Geräte und Software.....	88

1. Einleitung

1.1 Historischer Überblick

Erste Beobachtungen zu den Lissenzephalien machte der Pathologe Matell (1839) vor mehr als einhundert Jahren. Er stellte an Gehirnen Verstorbener schwerste Fehlbildungen fest. Die Bezeichnung des auffälligen und gleichwohl seltenen Krankheitsbildes stammt aus dem Griechischen: „lissos“ für glatt und „enkephalos“ für Gehirn. Über die Ätiologie der schweren Fehlbildung konnte lange Zeit nur spekuliert werden. Doch schon 1968 wurde die Möglichkeit einer neuronalen Migrationsstörung als Ursache diskutiert (Hanaway *et al.* 1968). Man beobachtete familiäre Häufungen und vermutete deshalb eine vererbliche Komponente der Krankheitsentstehung, neben anderen Ursachen wie zum Beispiel einer Cytomegalievirusinfektion in der Schwangerschaft (Norman *et al.* 1967). 1984 konnte Stratton *et al.* das erste Mal mit Hilfe der hoch auflösenden Chromosomenanalyse zeigen, dass bei Patienten mit Miller-Dieker-Syndrom (MDS) Deletionen im Chromosom 17 zu finden sind. 1987 beschrieb Dobyys *et al.*, dass es sich um eine neuronale Migrationsstörung handelt, bei der die Gehirnentwicklung in der frühen Embryogenese gestört ist. 1989 konnte Ledbetter *et al.* zeigen, dass innerhalb der chromosomalen Region, die beim MDS deletiert ist, eine konservierte Region von ca. 100bp lokalisiert ist. In diesem Bereich fanden sich sowohl bei Patienten mit MDS als auch bei Patienten mit isolierter Lissenzephalie (ILS) Deletionen. 1993 konnte schließlich der Zusammenhang zwischen Lissenzephalie und der Deletion des *LIS1*-Gens hergestellt werden (Dobyys *et al.* 1993).

Seit zur Diagnostik geistig und motorisch auffälliger Patienten die Magnetresonanztomographie (MRT) des Gehirns genutzt werden konnte, wurden Patienten mit auffälligen Strukturveränderungen des Gehirns immer häufiger beobachtet. Mittlerweile wurden in verschiedenen Genen Mutationen gefunden, die eine Lissenzephalie auslösen (Reiner *et al.* 1993, des Portes *et al.* 1998a, Gleeson *et al.* 1998, Hong *et al.* 2000, Kitamura *et al.* 2002, Fox *et al.* 1998, Kobayashi *et al.* 1998, Yoshida *et al.* 2001, Beltrán-Valero de Bernabé *et al.* 2002, Cardoso *et al.* 2003).

In dieser Arbeit wird das Vorhandensein von Mutationen im *LIS1*- und *DCX*-Gen bei Patienten mit Typ-1-Lissenzephalie untersucht.

1.2 Kortikogenese

Das menschliche Gehirn ist zu komplexen kognitiven Funktionen fähig, und unterscheidet sich so von Gehirnen anderer Säugetiere. Trotzdem ist bis heute noch wenig über die Mechanismen bekannt, die die Entwicklung des menschlichen Gehirns und der Großhirnrinde (Kortex) kontrollieren. Den Stand der Wissenschaft über die Vorgänge im sich entwickelnden Gehirn während der Embryogenese und der Fetalzeit, die die Kortexentwicklung betreffen, sind zusammenfassend in einer Auswahl von Review-Artikeln dargestellt (Reiner 1999, Gressens 2000, Lambert de Rouveroit 2001, Feng und Walsh 2001, Wynshaw Boris und Gambello 2001, Clark 2001, Gupta *et al.* 2002, Kato und Dobyns 2003, Mochida *et al.* 2004).

Die Stammzellen der Neurone und Gliazellen des Kortex befinden sich im proliferativen Neuroepithel der Ventrikularzone / Mantelzone (Abbildung 1). Erst nach der letzten Mitose wandern die jungen neokortikalen Neurone aus der Ventrikularzone aus. Dabei bilden die ersten auswandernden Neurone die sogenannte Preplate. Später generierte Neurone spalten die Preplate in die Marginalzone und die Subplate und bilden die Rindenplatte / kortikale Platte (cortical plate). Dabei wandern die später kommenden Neurone an ihren Vorgängern vorbei, nicht jedoch an den Neuronen der zellkörperarmen Marginalzone, und bilden in einem „inside-out“-Muster (Sidman und Rakic 1973) den Kortex. Die jüngsten Neurone sind also in der jeweils oberflächlichsten Neuronenschicht zu finden. Das Timing der letzten Zellteilung beeinflusst den Bestimmungsort eines kortikalen Neurons also entscheidend (McConnell *et al.* 1991). Sind alle Neurone eingewandert, geht die Subplate zugrunde. Solange die Migrationsdistanzen nicht zu weit sind, gelangen die Neurone über somale Translokation an ihren Bestimmungsort. Später sind die zurückzulegenden Strecken hierfür aber zu lang, die Neurone wandern deshalb entlang einem Glia-Gerüst, der radialen Glia (Rakic 1971). Um ihren spezifischen Zielort zu erreichen, lösen sie sich dann von ihren Leitschienen und wandern wieder mit Hilfe der somalen Translokation. Auf diese Weise bildet sich der sechsschichtige Kortex. Darüber hinaus konnte Rakic (1990) zeigen, dass sich auch vertikale Organisationsmuster (Columns) bilden. Ein Colum ist definiert als eine Gruppe von Neuronen, die von verschiedenen Vorläuferzellen der gleichen Proliferationseinheit abstammen. Des weiteren spielt auch die tangentielle also parallel zur inneren oder äußeren Gehirnoberfläche verlaufende Wanderung von Neuronen

eine Rolle. Diesen Mechanismus nutzen vor allem GABAerge Interneurone (Marin *et al.* 2001).

Der genaue Fortgang der Zellwanderung auf zellulärer Ebene ist noch nicht in allen Einzelheiten abschließend geklärt. Dennoch ist ein Muster erkennbar. Danach bedienen sich alle migrierenden Zellen des gleichen Fortbewegungsmechanismus. Dabei streckt die Zelle in einem ersten Schritt einen Zellfortsatz aus, der die Umgebung testet. Anziehende und abstoßende Signale des Umfelds spielen eine Schlüsselrolle für den Migrationsweg. Hat sich die Zelle für eine Richtung „entschieden“, wird der Zellkern, der sich in einem „Käfig“ aus Mikrotubuli befindet in den Leitfortsatz gezogen (Nukleokinese). Dann wird der Rest der Zelle nachgezogen. Dies wiederholt sich solange, bis sich die Zelle ihren Zielort erreicht hat.

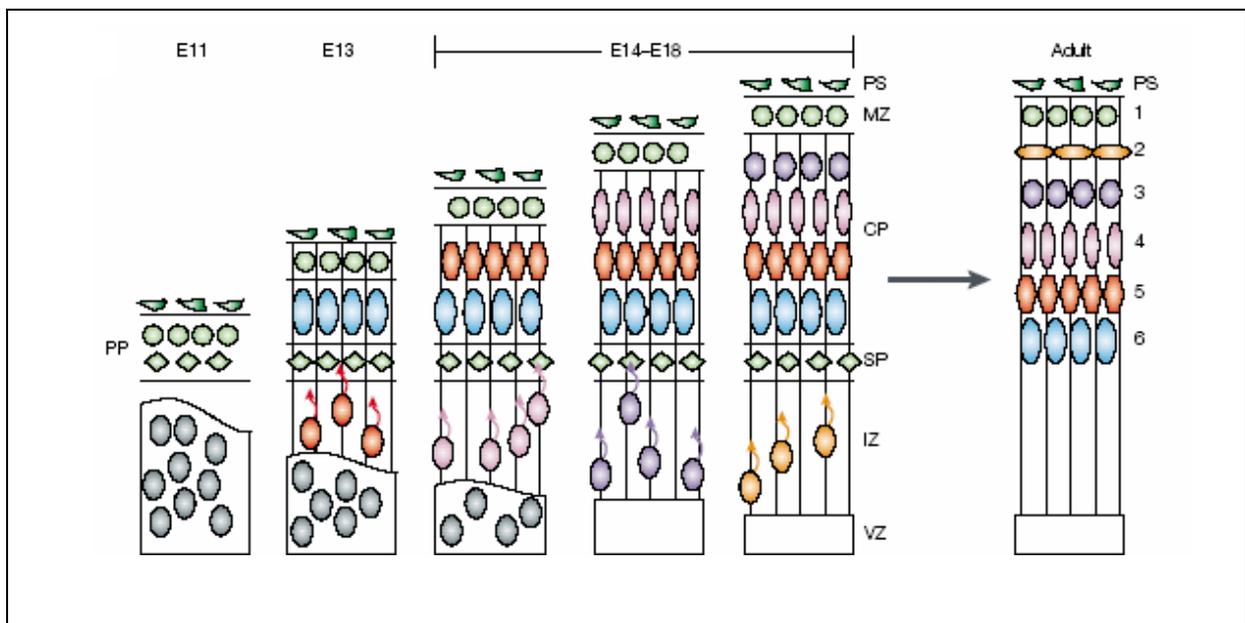


Abbildung 1: Die Vorgänge im Säugerhirn (Mausembryo E: Embryonaltag) während der neuronalen Migration. Junge Neurone wandern aus der Ventrikularzone aus und bilden in einem Inside-Out Muster den sechsschichtigen Kortex. PP Preplate; VZ Ventrikularzone; IZ Intermediärzone; SP Subplate; CP cortical plate – Kortikalplatte; MZ Marginalzone; PS pial surface - Pia Oberfläche (Gupta *et al.* 2002).

1.3 Einteilung der Lissenzephalien

Lissenzephalien werden auf der Grundlage typischer morphologischer Veränderungen der Hirnstruktur in Gruppen eingeteilt. Diese Arbeit folgt einer Einteilung nach Dobyns und Truwit (1995 update).

1) Typ 1-Lissenzephalie

Bei dieser häufigsten Form der Lissenzephalien fehlt das Windungsrelief der Gehirnoberfläche (Agyrie), oder es ist abnormal verbreitert (Pachygyrie). Außerdem kommen subkortikale, bandförmig in das Marklager eingelagerte Schichten grauer Hirnsubstanz (Heterotopien) vor, wodurch das Bild eines doppelten Kortex (daher „Double-Cortex“) entsteht.

Beispielhaft ist die syndromale Erkrankung Miller-Dieker-Syndrom (MDS) (Abbildung 2E). Doch auch die in dieser Arbeit behandelten Störungsbilder der Isolierten Lissenzephalie (ILS) und des Double-Cortex-Syndroms (DCX) werden dieser Gruppe zugeordnet (Abbildung 2A,B,D,F).

2) Typ 1-Lissenzephalie mit assoziierten Symptomen

Zu den oben aufgeführten Anomalien kommen unter anderem cerebelläre Hypoplasie und Agenesie des Korpus Kallosum hinzu.

Mutationen im *ARX*- („aristaless related homeobox“) Gen führen zur Lissenzephalie mit abnormen Genitalien (XLAG) (Abbildung 2G), Mutationen im *RELN*-Gen bedingen zum Teil die Lissenzephalie mit Hypoplasie des Cerebellums (LCHb) (Abbildung 2C).

3) Typ 2-Lissenzephalie (Cobblestone / Kopfsteinpflaster Dysplasie)

Die Oberflächenstruktur des Gehirns zeigt sich bei dieser Form granulär, mit atypischer Agyrie, Pachygyrie oder Polymikrogyrie. Eine dicke fibrogliale Schicht auf der Oberfläche führt oft zur Obstruktion des Subarachnoidalraums. Die Fukuyama-Kongenitale-Muskeldystrophie, die Muscle-Eye-Brain Disease, das Walker-Warburg-Syndrom und die „einfache“ Cobblestone Lissenzephalie werden hier zugeordnet.

4) Lissenzephalie mit Mikrozephalie

Diese Gruppe zeigt außer einer Lissenzephalie eine kongenital beobachtbare Mikrozephalie (mindestens drei Standardabweichungen unter der Norm). Es sind sechs verschiedene Genloci bekannt, jedoch erst zwei Gene konnten identifiziert werden, das *Microcephalin*-Gen (Jackson *et al.* 2002) und das Gen *ASPM* („abnormal spindle-like microcephaly-associated protein“) (Bond *et al.* 2002).

1.4 Klinik

Patienten mit Mutationen im *LIS1*-Gen (Chromosom 17p13), oder männliche Patienten mit Mutationen im X-chromosomalen *DCX*-Gen (Xq22) zeigen das klinische Bild der isolierten Lissenzephalie (ILS; OMIM 601545). Sie leiden typischerweise unter schwerer mentaler Retardierung, epileptischen Anfällen und zentralen Paresen (Aicardi *et al.* 1991, Palmiini *et al.* 1991, Dobyns *et al.* 1993, Barkovic *et al.* 1994). In den ersten 5 Lebensmonaten bleiben Säuglinge typischerweise unauffällig. Es können aber auch schon postpartal, als erste Anzeichen der Lissenzephalie, Probleme mit dem Füttern oder therapieresistente epileptische Anfälle auftreten. Aus auffälligen Muskelhypotonien, entwickelt sich später zunehmend eine spastische Tetraparese. Außerdem können Blindheit und Taubheit als Symptome auftreten. Die Lebenserwartung der Betroffenen ist deutlich reduziert. Da auch die Schlundmuskulatur betroffen sein kann, versterben die Patienten oft an Aspirationspneumonien oder einer folgenden Sepsis. Dank der medizinischen Fortschritte erreichen betroffene Patienten immer öfter das Erwachsenenalter.

Die Schwere der Erkrankung ist aber entscheidend von der Position und Art der Mutationen abhängig (Dobyns *et al.* 2002). So konnte auch ein Patient mit Mutation im *LIS1*-Gen mit normalem Intelligenz-Quotient identifiziert werden (Leventer *et al.* 2001a).

Patientinnen mit nachgewiesener Mutation im *DCX*-Gen zeigen das klinische Bild des Double-Cortex-Syndrom (DCX; OMIM 300121). Die Klinik weiblicher Patientinnen ist in hohem Maße variabel und von der Banddicke der Heterotopien abhängig. Je breiter die Schicht mit subkortikalen Neuronen ist, desto schwerer sind die Patientinnen betroffen (Barkovich *et al.* 1994). Starke Variationen von schwerer mentaler Retardierung und Epilepsie über normale Intelligenz und milde Epilepsie bis zu völlig unauffälliger Klinik (Demelas *et al.* 2001) kommen vor. Die Erklärung hierfür ist die unterschiedliche X-Inaktivierung und damit unterschiedliche Aktivierung der beiden Allele bei Frauen (Gleeson *et al.* 2000b).

1.5 Pathomorphologie bei ILS und dem Double-Cortex-Syndrom

Auffälligstes Kennzeichen einer Typ 1- Lissenzephalie ist die Pachygyrie oder Agyrie des Kortex. Diese Gyrierungsstörung ist aber meist nicht über der gesamten Hirnoberfläche gleichmäßig verteilt, sondern durch eine Gradientenbildung gekennzeichnet (Pilz *et al.* 1998). Das bedeutet, dass entweder die fronto-temporalen Bezirke oder die okzipitalen Bereiche der Großhirnrinde stärker betroffen sind. Eine betonte Gyrierungsstörung im Frontalhirn (a>p, anterior > posterior) ist charakteristisch für Mutationen im *DCX*-Gen, während ein posterior > anterior Gradient (p>a) für eine Mutation im *LIS1*-Gen spricht. Allerdings kann man bei schweren Formen nicht mit einer eindeutigen Gradientenbildung rechnen (Leventer *et al.* 2000).

Bei Mutationen im *LIS1*-Gen fällt zusätzlich ein okzipital verdickter Kortex (10-20 mm) auf. Dieser besteht jedoch aus nur vier Schichten (Crome *et al.* 1956) anstelle der normalerweise sechs Zellschichten. Die molekulare-Schicht bildet die oberflächlichste Lage, es folgt die externe zelluläre-Schicht mit diffus verteilten Neuronen, dann eine zelluläre-Schicht mit niedriger Dichte an Neuronen, die unterste Zellschicht ist besonders neuronreich. Analog hierzu weisen männliche Patienten mit Mutation im *DCX*-Gen einen frontal verdickten (10-20 mm) Kortex auf.

Patientinnen mit einer Mutation im *DCX*-Gen zeigen meist nur flache Sulci und eine „Subkortikale Band Heterotopie“ (SBH) mit einer bilateralen Neuronenschicht direkt unterhalb des Kortex, die nur von einer dünnen Schicht weißer Substanz getrennt wird (Barkovic *et al.* 1994). Die Heterotopien sind in drei Zonen unterteilbar. Eine superfizielle Zone mit desorganisierten Neuronen, eine intermediäre Zone mit kleinen Neuronen und eine tiefe Zone, in der nodulär Neurone vorkommen, die immer wieder von weißer Substanz unterbrochen werden (Harding *et al.* 1996). Hier ist der Kortex aber meist regelrecht aufgebaut (Barkovic *et al.* 1994). Doch auch bei einer nachgewiesenen Mutation im *DCX*-Gen kann die Hirnstruktur von Patientinnen im MRT unauffällig sein (Gleeson *et al.* 2000a, Aigner *et al.* 2003).

Außer diesen Veränderungen der Gehirnstruktur können aber auch weitere Befunde hinzukommen. So wird die Hypoplasie des Corpus callosum, erweiterte, dysmorphe Ventrikelräume und eine abnormale Positionierung der Olivenkerne (Nuclei olivarii

inferiores) beobachtet (Cadoso *et al.* 2002). Gelegentlich kann es auch zu einer milden Vermis-Hypoplasie des Kleinhirns kommen (Cadoso *et al.* 2002).

Selten kann auch eine frontal betonte SBH bei einer nachgewiesenen Mutation im DCX-Gen bei einem männlichen Patienten (Gleeson *et al.* 2000a, Poolos *et al.* 2002, Mizuguchi *et al.* 2002, Aigner *et al.* 2003) sowie eine posterior betonte SBH bei einer nachgewiesenen Mutation im LIS1-Gen (Leventer *et al.* 2001a, Sicca *et al.* 2003) beobachtet werden. Diesen Phänotypen liegt dann ein somatisches Mosaik zugrunde.

Die Veränderungen, die makroskopisch und mikroskopisch sichtbar werden variieren je nach Schweregrad der Lissenzephalie. Die genauere Charakterisierung und Einteilung (6 Grade) der Typ 1- Lissenzephalie erfolgt mit Hilfe der Magnetresonanztomographie (Leventer *et al.* 2000) (Tabelle 1). Hierbei steht die Untergruppe „a“ für Veränderungen bei Mutationen im LIS1-Gen, wohingegen „b“ für Veränderungen der Hirnstruktur bei Mutationen im DCX-Gen stehen. Grad eins bis vier entsprechen der klassischen Lissenzephalie. Abbildung 2 zeigt MRT-Bilder betroffener Patienten und einer Normalperson mit Angabe des Schweregrades.

Tabelle 1

Einteilung der Typ-1-Lissenzephalie nach dem Schweregrad.

Grad	Beschreibung der Hirnoberfläche	Detaillierte Einteilung
1	diffuse Agyrie	1a: diffuse Agyrie mit orbitofrontal und anteriortemporal vereinfachtem Gyrierungsmuster 1b: diffuse Agyrie mit nur anteriortemporal vereinfachtem Gyrierungsmuster
2	diffuse Agyrien und wenige flache Sulci	2a: frontal und temporal flache Sulci, orbitofrontal und anteriortemporal vereinfachtes Gyrierungsmuster 2b: anteriortemporal vereinfachtes Gyrierungsmuster, okzipital flache Sulci
3	gemischte Agyrie und Pachygyrie	3a: Frontale Pachygyrie und posteriore Agyrie 3b: Frontale Agyrie und posteriore Pachygyrie
4	diffuse oder partielle Pachygyrie	4a: posterior betont 4b: anterior betont
5	SBH und gemischte Pachygyrie	5a: frontale SBH, posteriore Pachygyrie 5b: posteriore SBH, frontale Pachygyrie
6	SBH	6a: posterior betont 6b: anterior betont

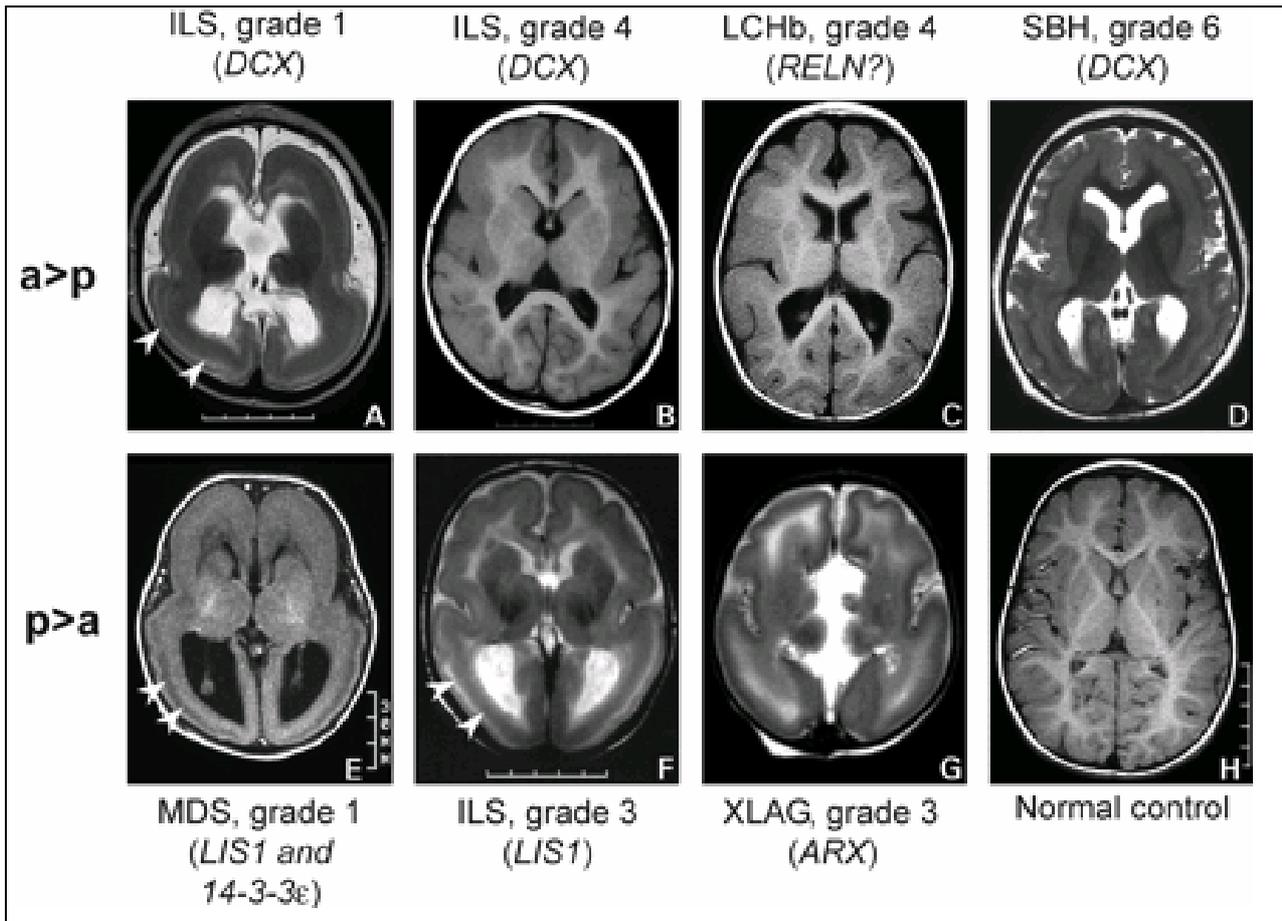


Abbildung 2 MRT-Bilder betroffener Patienten, sowie einer Normalperson (Kato und Dobyns 2003).

1.6 Gene und Genprodukte

1.6.1 Das LIS1-Gen

Das *LIS1*-Gen ist auf Chromosom 17p13.3 lokalisiert (Ledbetter *et al.* 1989). Es überspannt einen genomischen Bereich von ca 92 kb. Es existieren zwei alternative Transkripte (5,5 kb, 7,5 kb) mit unterschiedlicher 3'UTR-Länge (Lo Nigro *et al.* 1997). Das Gen besteht aus 11 Exonen (Lo Nigro *et al.* 1997), wovon die Exone 2 bis 11 für das translatierte Produkt kodieren. Die cDNA enthält 1233 Basenpaare. Das 411 Aminosäuren große Genprodukt ist die nicht katalytische β -Untereinheit der Acetyl-Hydrolase Isoform 1 des Thrombozyten-aktivierenden Faktors des Gehirns (Platelet-Activating-Factor-Acetyl-Hydrolase Isoform 1; PAFAH1B1).

LIS1 wird in allen bisher untersuchten Geweben (ubiquitär) exprimiert (Reiner *et al.* 1993). In Rindern (Hattori *et al.* 1994), Mäusen (Peterfy *et al.* 1995), *Drosophila melanogaster* (Liu

et al. 1999), *Saccharomyces cerevisiae* (Geiser *et al.* 1997) und *Aspergillus nidulans* (Xiang *et al.* 1995) wurden Homologe gefunden.

Motive und Domänen im LIS1-Gen

Emes und Ponting identifizierten 2001 die LisH-Domäne (LIS1 Homology domain, AS 1-39 (Kim *et al.* 2004)), ein Motiv, das bei über 100 eukaryotischen intrazellulären Proteinen nachgewiesen werden konnte. Bisher bleibt die Funktion der LisH-Domäne noch weitgehend unklar, es konnte aber 2004 gezeigt werden, dass die LisH-Domäne zusammen mit der „coiled-coil“-Domäne für die Dimerisation des LIS1-Proteins essentiell ist (Kim *et al.* 2004).

Die Exone 2 bis 5 codieren für ein „coiled-coil“-Motiv (AS 40-85). Dieses Motiv bildet eine spiralisierte Spirale, ähnlich den Leucin-Zipper-Motiven. Durch die amphiphatische Helix wird eine Verzahnung mit anderen Proteinen möglich (Lewin 1998a).

Kennzeichen für viele Protein-Protein Interaktionen ist auch die Domäne, die von den Exonen 5 bis 11 (AS 96-410) codiert wird. Hier ist die Information für insgesamt sieben WD40-Repeats (Hattori *et al.* 1994) enthalten (Abbildung 3). WD-Repeats sind Kennzeichen der Familie der G-Proteine. Sie bilden ein fingerartiges Motiv, das die Form eines Propellerrades hat (Gupta *et al.* 2002).

Diese funktionell wichtigen Regionen des Gens sind evolutionär in hohem Maß konserviert (Hattori *et al.* 1994).

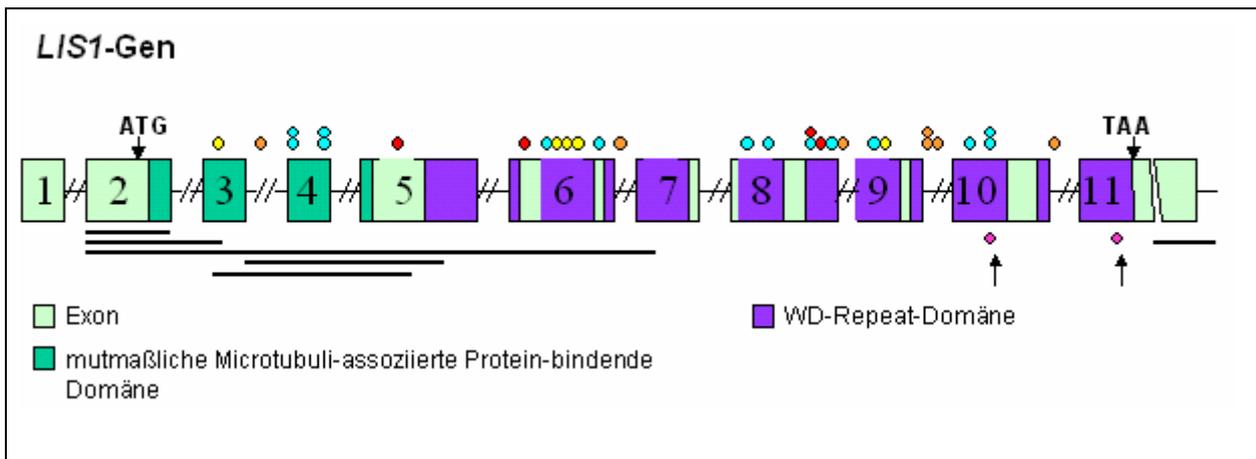


Abbildung 3 Genschema des LIS1-Gens. Funktionell wichtige Genbereiche sind farblich hervorgehoben. Die Positionen schon bekannter Mutationen sind als farbige Punkte dargestellt: gelb: Missense-Mutationen; rot: Nonsense-Mutationen; orange: Spleiß-Mutationen; türkis: kleinere Deletionen und Insertionen; pink: hier beschriebene Mutationen; schwache Linien: größere Deletionen; ATG: Start Codon; TAA: Stop Codon (modifiziert nach: Morris-Rosendahl und Wolff 2003).

1.6.2 Das LIS1-Protein PFAH1B1 und seine Funktion

PFAH1B1 bindet mit seiner „coiled-coil“-Domäne im N-terminalen Bereich an die Untereinheiten PFAH1B2 und PFAH1B3 (Hattori *et al.* 1994). Das gleiche Motiv vermittelt auch die Interaktion zwischen zwei LIS1-Proteinen. LIS1 liegt dann als Homodimer vor (Cahana *et al.* 2001).

LIS1 wird in Zusammenhang mit folgenden Prozessen gebracht: Zellmotilität (Dynein vermittelte Nukleokinese, somale Translokation), Mitose und Trennung der Chromosomen sowie Regulierung von PAF. Diese Zusammenstellung stützt sich auf einer Reihe von unterschiedlichen Erkenntnissen. Als erstes deutet die intrazelluläre LIS1-Lokalisation auf einen solchen Zusammenhang hin. So findet sich LIS1 in Regionen hoher Konzentration an Mikrotubuli, vor allem am Zentrosom und dem „microtubule organizing center“ (MTOC) (Smith *et al.* 2000). Auch in der perinukleären Region lässt sich LIS1 nachweisen (Coquelle *et al.* 2002). Lokalisationsunterschiede zeigen sich während des Zellzykluses. In der Interphase findet sich LIS1 entlang von Mikrotubuli (Sapir *et al.* 1997, Smith *et al.* 2000). Während der Mitose ist LIS1 an den Kinetochoren, am Zell-Kortex und an astralen Mikrotubuli lokalisiert (Faulkner *et al.* 2000). Unter physiologischen Bedingungen *in vitro* führt LIS1 zu einer Verlängerung und Stabilisierung der Mikrotubuli. Bei Überexpression kommt es zur Orientierung der Mitosespindel und zur Progression der Mitose. Bei fehlendem LIS1 ist die Metaphase gestört (Faulkner *et al.* 2000). Diese Tatsachen sprechen dafür, dass LIS1 bei der Mitose, Chromosomentrennung und der Zellteilung eine entscheidende Rolle spielt (Leventer *et al.* 2001b).

Zweitens ist für LIS1 seine Vielzahl an Interaktionspartnern, die wiederum mit zellulären Fortbewegungsmechanismen in Zusammenhang stehen, charakteristisch. Dabei werden momentan zwei verschiedene voneinander unabhängige Funktionen des LIS1-Proteins untersucht. Man kann zwischen evolutionär konservierten und relativ neuartigen Interaktionen unterscheiden.

Die evolutionär neuartigen Interaktionen stehen im Zusammenhang mit PAF. Die PFAH inaktiviert PAF (Platelet-Activating-Factor) durch Entfernen einer Acetyl-Gruppe. PAF bindet an G-Protein-gekoppelte transmembranäre Rezeptoren, die über ein „second-messenger“-System die Information ins Zellinnere tragen (Prescott *et al.* 2000). Dabei stimuliert PAF die neuronale Migration. Im Mausmodell konnte gezeigt werden, dass PAF-

Rezeptor defiziente Mäuse eine histologisch abnorme embryonale Kleinhirnstruktur aufweisen, wobei PAF Rezeptor defiziente granular-Neurone langsamer wandern als Wildtyp-Neurone (Tokuoka *et al.* 2003). Außerdem konnte bereits gezeigt werden, dass zu hohe Konzentrationen an PAF zu einem Zusammenfallen der Wachstumskegel (growth cones) der Neurone führt, es zu einer Retraktion der Neuriten kommt, sowie axonale Schwellungen auffallen. Hohe Konzentrationen an PAF wirken neurotoxisch (Clark *et al.* 1995).

Somit ist die genaue Regulierung der intrazellulären PAF-Konzentration ein entscheidender Faktor bei neuronalen Migrationsprozessen. Da man in Versuchen mit *Drosophila melanogaster* aber weder eine katalytische Aktivität der α -Untereinheiten der PAFAH zeigen konnte und es auch zu keiner Interaktion zwischen dem LIS1-Homolog und den α -Untereinheiten kommt (Sheffield *et al.* 2000), ist diese LIS1-Funktion evolutionär neuartig.

In hohem Maße evolutionär konserviert sind Interaktionen, die über die WD-Repeats vermittelt werden. Diese Domäne, die in ihrer Sekundärstruktur eine enge β -Faltblattstruktur bildet, weist Homologien zur β -Untereinheit von G-Proteinen auf (Reiner *et al.* 1993). WD-Repeats sind unter anderem für Interaktionen mit zahlreichen Proteinen notwendig. Es konnte gezeigt werden, dass PAFAH1B1 mit α - und γ -Tubulin über Vermittlung der WD-Repeats interagiert und so den Abbau von Tubulin-Einheiten reduziert (Sapir *et al.* 1997). Es nimmt also direkte Verbindung mit Mikrotubuli auf. LIS1 zählt aber zu den unkonventionellen Mikrotubuli-assoziierten Proteinen (MAP), da es keine typischen Bindedomänen aufweist. Auch die Assoziation mit Dynein und anderen MAPs weist auf eine Rolle bei zellulären Fortbewegungsmechanismen hin. Mit Hilfe der Proteine NUDEL und NudE kann LIS1 eine physikalische Interaktion mit Dynein (schwere Kette) eingehen (Niethammer *et al.* 2000, Faulkner *et al.* 2000; Liu *et al.* 2000; Smith *et al.* 2000; Xiang 2003). Ein weiterer Interaktionspartner (über WD 5-7) ist das „cytoplasmic linker protein 170“ (CLIP-170) (Coquelle *et al.* 2002). Dieses Plus-Pol-Protein vermittelt die Assoziation von Dynein/Dynactin mit Mikrotubuli Plus Enden. Damit könnte LIS1 als regulierter Adapter zwischen CLIP-170 und cytosolischen Dynein sein (Coquelle *et al.* 2002). Mit Doublecortin, welches ebenfalls an der neuronalen Migration beteiligt ist, interagiert LIS1 mit Hilfe von WD7 (Caspi *et al.* 2000).

Vor allem die Ergebnisse der Forschungsarbeit mit *Aspergillus nidulans* haben entscheidend zur Klärung von zellulären Fortbewegungsmechanismen beigetragen. Durch Mutationen in Nud-Genen (nuclear distribution defect), die die Kernwanderung (Nukleokinese) beeinflussen, konnte gezeigt werden, dass Mikrotubuli unerlässlich für die Kernwanderung in diesem filamentösen Pilz sind. Im Zuge dieser Forschungsarbeit wurden unter anderem nudA (humanes Homolog: Dynein schwere Kette), Dynactin, nudE (humanes Homolog: NUDE, NUDEL) und nudF (humanes Homolog: LIS1, 42% identisch, Xiang *et al.* 1995) als essentielle Bestandteile für diesen Prozess gefunden. NudF bindet zum Beispiel an α - und γ -Tubulin, sowie an Dynein (schwere Kette) (Hoffmann *et al.* 2001). Humanes LIS1 nimmt mit den Proteinen NUDEL und NudE direkte Interaktion über die „coiled-coil“-Domäne auf (Efimov und Morris 2000). Dabei ist vor allem die Interaktion von LIS1 mit Dynein für die Organisation von Mikrotubuli in der Zellperipherie wichtig. Die LIS1-Dosis reguliert den Dynein-Motor in diesem Prozess (Smith *et al.* 2000). Zusammen mit LIS1 reguliert NUDEL die Lokalisation des cytoplasmatischen Dyneins bei der neuronalen Migration und der Mitose durch direkte Interaktion (Leventer *et al.* 2001b). Dabei spielt LIS1 eine Schlüsselrolle bei der Dyneinfunktion und dem Mikrotubuliumbau (Leventer *et al.* 2001b). Ist *NUDEL* mutiert, ist die Häufigkeit und Geschwindigkeit der Minusende-gerichteten Bewegung reduziert (Abbildung 5). Es kommt zur Golgi-Apparat Fragmentation und Fehlverteilung von Membranorganellen (Liang *et al.* 2004).

Eine weitere interessante Rolle von Lis1 postulieren Kholmanskikh *et al.* (2003). Die Autoren fanden bei Lis1 haploinsuffizienten Mäuseneuronen unter anderem eine geringere Anzahl von filamentösem Actin im Leitsaum und eine Hoch-Regulierung von RhoA („Ras-homology A“). Sie stellten fest, dass RhoGTPasen von Lis1 reguliert werden, diese wiederum regulieren die Actin-Polymerisation. Damit interagiert Lis1 nicht nur mit Mikrotubuli, es nimmt auch auf die Actin-Polymerisation Einfluss.

Drittens spricht auch die Tatsache, dass bei Patienten mit Migrationsstörungen von Nervenzellen Mutationen im *LIS1*-Gen nachgewiesen werden konnten, für eine Rolle des Proteins bei der Fortbewegung der Neurone.

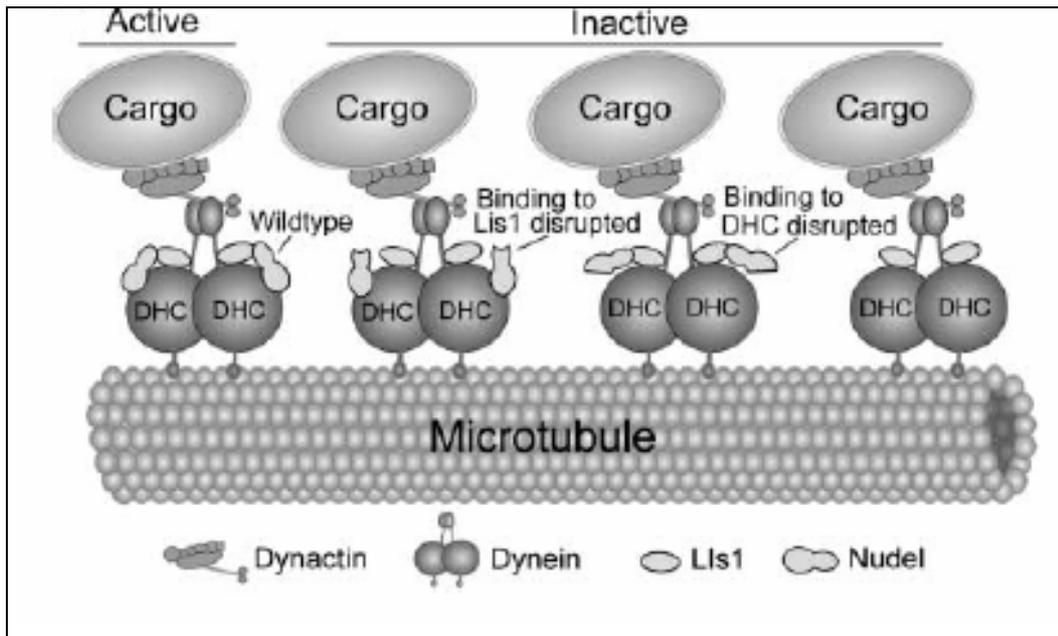


Abbildung 4 Modell, das sich auf den dyneinabhängigen Transportmechanismus konzentriert. Dabei kann ein Transportgut (Cargo) nur dann erfolgreich entlang eines Mikrotubulus bewegt werden, wenn sowohl die Dynein- und Dynactinkomponenten als auch Lis1 und Nudel regelrecht interagieren können. DHC = Dynein schwere Kette (Liang *et al.* 2004).

1.6.3 Das *DCX*-Gen

Des Portes *et al.* (1998a) und Gleeson *et al.* (1998) identifizierten das *DCX*-Gen auf Xq22.3-q23, das bei Patienten mit X-chromosomal vererbter Typ1-Lissenzephalie Mutationen zeigte. Das 118 kb-Gen besteht aus neun Exonen, wovon die Exone 4 bis 9 kodierend sind, zusätzlich kann in einigen Transkripten das dritte Exon kodierend sein (des Portes *et al.* 1998b). Das 40 kDa-Protein Doublecortin (des Portes *et al.* 1998a) resultiert aus einer 1080 bp großen mRNA, die alternativ gespleißt wird. Das Gen wird hauptsächlich in fetalem Gehirn (Frontalhirn und Cerebellum) exprimiert (des Portes *et al.* 1998a). Sowohl das zeitliche, als auch das räumliche Verteilungsmuster sprechen für eine entscheidende Rolle während der Kortikogenese. Im frühen Preplate-Stadium überlappt die Expression von DCX mit der Reelin-Expression. Reelin wird von Cajal-Retzius Zellen exprimiert, und ist als Molekül, das die wandernden Neurone steuert, bekannt (D'Arcangelo *et al.* 1995). Zwei verschiedene Muster der DCX-Expression können dann während der Ausbildung des Kortex beobachtet werden: in den radial-orientierten apikal-Fortsätzen von Pyramidenzellen und in nicht radial-orientierten mono- und bipolaren Neuronen. Auch hier wird DCX von Cajal-Retzius Zellen, außerdem von Zellen der subpialen Granularschicht exprimiert (Meyer *et al.* 2002). Intrazellulär ist DCX im Leitsaum

wandernder Neurone und im Wachstumskegel (growth cone) differenzierter Neurone stark angereichert (Schaar *et al.* 2004). Das DCX-Protein befindet sich entlang von Mikrotubuli, die zwischen dem perinukleären Netz und dem Zentrosom liegen (Tanaka *et al.* 2004b). Im adulten Gehirn findet sich eine DCX-Expression im Gyrus dentatus, der Wand der Seitenventrikel, im rostralen Migrationsstrom und im Bulbus olfaktorius (Brown *et al.* 2003). Im Mausmodell konnten auch Dcx-positive Neurone dorsal im Korpus kallosum, ventral im Nucleus accumbens, ventromedial im Striatum und ventrolateral im Septum gefunden werden (Yang *et al.* 2004). Da es nur in Neuroblasten und proliferierenden Vorläuferzellen exprimiert wird, könnte es deshalb als Marker im adulten Gehirn verwendet werden (Brown *et al.* 2003, Yang *et al.* 2004, Rao und Shetty 2004).

Motive und Domänen des DCX-Gens

Exon 4 kodiert für eine DC-Domäne (Abbildung 4), diese setzt sich aus zwei Tandem-Repeats zusammen (Sapir *et al.* 2000). Die DC-Domäne ist für die Interaktion mit α -Tubulin verantwortlich (Caspi *et al.* 2000), je ein α -Tubulin bindet an die N- und C-terminale Domäne (N-terminale Domäne AS 43-125; C-terminale Domäne AS 178-253). Die DC-Domäne zeigt aber keinerlei Homologien mit bisher bekannten mikrotubuli-assoziierten Proteinen. Außerdem findet sich in Exon 4 eine Abl-Phosphorylierungsstelle (Gleeson *et al.* 1998, Matsumoto *et al.* 2001). Exon 8 codiert für eine Serin-Prolin reiche Domäne (Matsumoto *et al.* 2001). Die Aminosäuren 51-135 vermitteln die Homodimerisierung von DCX (Caspi *et al.* 2000).

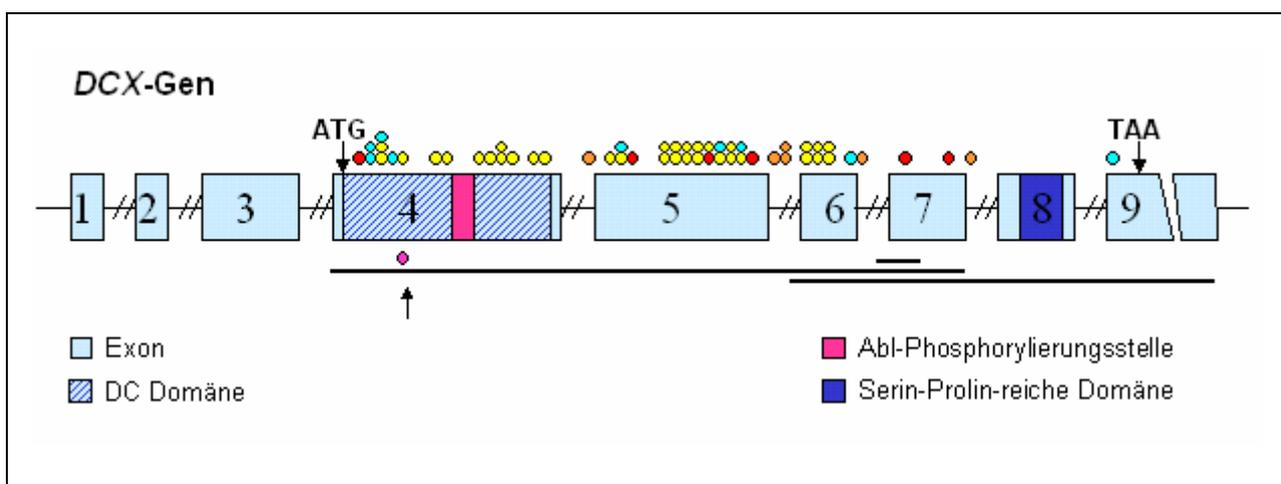


Abbildung 5 Genschema des DCX-Gens. Funktionell wichtige Genbereiche sind farblich hervorgehoben. Die Positionen schon bekannter Mutationen sind als farbige Punkte dargestellt: gelb: Missense-Mutationen; rot: Nonsense-Mutationen; orange: Spleiß-Mutationen; türkis: kleinere Deletionen und Insertionen; pink: hier beschriebene Mutation; schwarze Linien: größere Deletionen; ATG: Start Codon; TAA: Stop Codon (modifiziert nach: Morris-Rosendahl und Wolff 2003).

1.6.4 Das DCX-Protein Doublecortin und seine Funktion

Das DCX-Protein ist ein stabiles, in seiner Tertiärstruktur dem Ubiquitin ähnliches Protein. Es besteht eine auffallende strukturelle Ähnlichkeit zu GTPase bindenden Domänen (Kim *et al.* 2003).

Bisher ist über den genauen Mechanismus der DCX-Funktion nur sehr wenig bekannt. Vor allem, da bis vor kurzem ein Mausmodell gefehlt hat, und so die kortikale Migationsstörung durch Gen-Knockout nicht generiert werden konnte (Corbo *et al.* 2002). Deshalb kamen immer wieder nur Mosaiksteine der möglichen DCX-Funktion ans Tageslicht, die noch nicht zu einem Gesamtbild zusammengesetzt werden können. Da 2003 durch RNA-„interference“ (RNAi) aber gezeigt werden konnte, dass Doublecortin für die radiale Migration im Ratten-Kortex benötigt wird (Bai *et al.* 2003), bleibt zu hoffen, dass sich die Erkenntnisse durch das Mausmodell in Zukunft besser Verknüpfen lassen.

Doublecortin assoziiert mit Mikrotubuli, stabilisiert und bündelt sie (Horesh *et al.* 1999, Francis *et al.* 1999, Gleeson *et al.* 1999). Es konnte gezeigt werden, dass die Bindung von Tubulin an beide Tandem-Repeats der DC-Domäne für die Polymerisierung und Stabilisierung von Mikrotubuli notwendig ist. Dabei bindet die N-terminale Domäne (AS 43-125) Mikrotubuli-Polymere, während die C-terminale Domäne (AS 178-253) Tubulin-Dimere bindet (Kim *et al.* 2003). Je stärker das Protein phosphoryliert ist, desto weniger bindet es an Mikrotubuli (Horesh *et al.* 1999). Bei Versuchen mit Hefe zeigte sich, dass Doublecortin wie auch LIS1 zusätzlich zur Assoziation mit Mikrotubuli auch mit Aktin interagiert. Dabei bindet Doublecortin Neurabin II an dessen „coiled-coil“-Domäne (Tsukada *et al.* 2003). Neurabin II ist ein F-Aktin bindendes Protein. Das Heterodimer Doublecortin- Neurabin II ist Teilkomplex bei der zellulären Migration.

Doublecortin befindet sich in den Extremitäten wachsender Neuriten. Es konnte die Interaktion mit den Adapterkomplexen AP1 und AP2 („adapter protein“) im clathrin-vermittelten Transport gezeigt werden (Friocourt *et al.* 2003). Diese binden an Membranvesikel, die Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle enthalten. Ein L1 („ligand-1“)-Zelladhäsionsmolekül, welches Doublecortin über ein FIGQY-Phosphotyrosin-Motiv erkennt, ist Neurofascin (Kizhatil *et al.* 2002). DCX interagiert damit direkt mit der Zellmembran. Somit könnte Doublecortin eine Rolle bei der Bestimmung der Migationsrichtung, z.B. auch über den Membrananbau (Friocourt *et al.* 2003) im Prozess der neuronalen Wanderung spielen.

Verschiedene Kinasen phosphorylieren DCX und schaffen so die Grundlage für eine gezielte Regulation der DCX-Funktion und -Lokalisation in wandernden Neuronen (Reiner *et al.* 2004, Schaar *et al.* 2004). So wird Dcx im Mausmodell von der „cyclin-dependent kinase 5“ (cdk5) phosphoryliert (Tanaka *et al.* 2004a, Graham *et al.* 2004). Dabei ist die Affinität von phosphoryliertem Dcx zu Mikrotubuli *in vitro* vermindert, der Effekt auf die Polymerisation ist reduziert und die Bindung an Mikrotubuli wird in Kultur aufgehoben (Tanaka *et al.* 2004a). Auch die Protein-Kinase A (PKA) und die „microtubule affinity regulatory kinase“ (MARK) -Familie phosphorylieren DCX (Schaar *et al.* 2004). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass Doublecortin Teil des Wegs der Signalübertragung ist, der durch die „Jun N-terminal kinase“ (JNK) gekennzeichnet ist (Gdalyahu *et al.* 2004, Reiner *et al.* 2004). DCX ist ein Substrat der JNK und interagiert nicht nur mit JNK, sondern auch mit „JNK interacting protein“ (JIP). Dabei wird DCX in den Wachstumskegeln (growth cones) von JNK phosphoryliert (Gdalyahu *et al.* 2004). Der JNK-Weg der Signalübertragung ist auch mit dem Weg der Reelin-Signaltransduktion verknüpft (Reiner *et al.* 2004).

Eine weitere Funktion könnte DCX bei der Zellteilung spielen. Normalerweise scheint DCX den Fortgang der Ausbildung der Mitosespindel und die Chromosomentrennung zu stören. Im Falle von Mutationen ist diese Fähigkeit gemindert (Couillard-Despres *et al.* 2004).

Auch die Interaktion von Doublecortin mit LIS1 über die Aminosäuren 51-135 (Caspi *et al.* 2000) untermauert die Bedeutung beider Proteine bei der Migration von Neuronen.

1.6.5 Interaktion von LIS1 und DCX

Damit die Nervenzelle einen Zellfortsatz ausbilden kann, müssen sich in diesem Bereich Mikrotubuli verlängern und ein stabiles Gerüst bilden. Bei diesem Schritt könnte sowohl die LIS1-, als auch die DCX-Funktion eine entscheidende Rolle als Stabilisator spielen, da beide an Mikrotubuli binden. Abbildung 6 verdeutlicht hierfür die intrazelluläre Lokalisation von LIS1 und DCX. Aber auch ein möglichst hohes Maß an Flexibilität ist notwendig, um auf Umweltreize reagieren zu können. Wenn die Zelle eine Wanderungsrichtung festgelegt hat, binden LIS1, NUDEL und NudE am MTOC am Minus-Pol der Mikrotubuli und stabilisieren es so. Dann wird der Zellkern, der sich in einem „Käfig“ aus Mikrotubuli befindet in Richtung des leitenden Zellfortsatz gezogen. DCX befindet sich am periventrikulären Gitternetz, und ist für dessen Ausbildung eventuell notwendig (Tanaka *et al.* 2004b). Hierbei deuten neuere Erkenntnisse darauf hin, dass der Abstand zwischen Zellkern und dem Zentrosom konstant bleiben muss (Tanaka *et al.* 2004b). Bei Mutationen

im *LIS1*-Gen ist dieser Abstand vergrößert. *LIS1* und *DCX* spielen eine entscheidende Rolle bei der Wahrung des Abstands zwischen Zentrosom und Zellkern in der migrierenden Zelle (Tanaka *et al.* 2004b). Beim Ziehen des Kerns könnten analog zu den Ereignissen bei *Saccharomyces cerevisiae* *LIS1* und Dynein essentiell mitbeteiligt sein (Niethammer *et al.* 2000, Tanaka *et al.* 2004b). Indem *LIS1* cytoplasmatisches Dynein an die Plus-Pole der Mikrotubuli führt und dieses dann in der Kernmembran verankert, kann der Dyneinkomplex den Kern in Richtung des Zentrosoms ziehen.

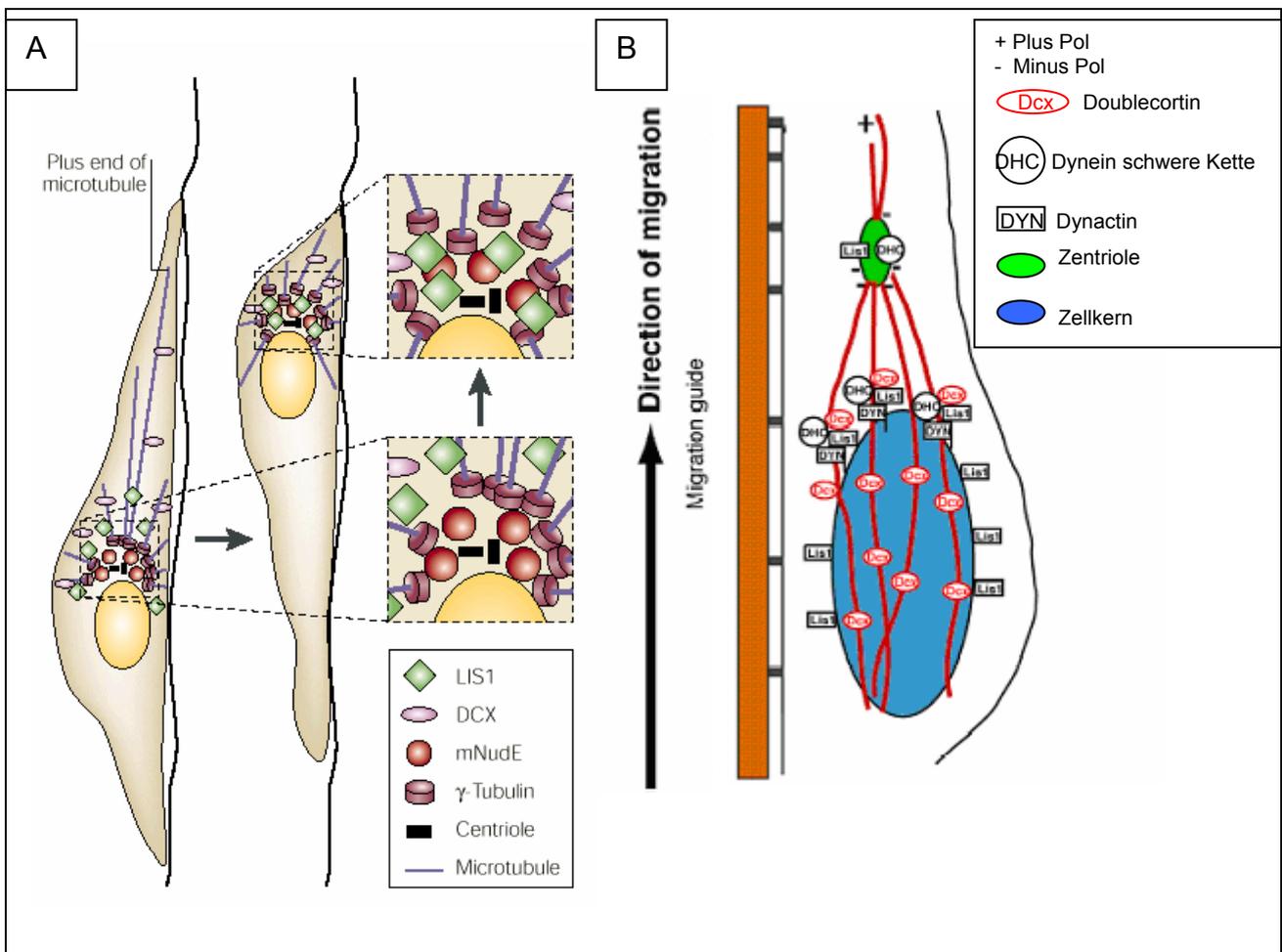


Abbildung 6 Intrazelluläre Lokalisation von *LIS1* und *DCX* im Prozess der neuronalen Migration. Die dargestellten Vorgänge sind im Text erklärt (A: Feng und Walsh 2001, B: Tanaka *et al.* 2004b).

Es gibt mehrere Hinweise dafür, dass *DCX*, *LIS1* und Reelin im menschlichen Gehirn überlappende Wege der Signalübertragung aufweisen. Bei nachgewiesener *LIS1*-Mutation konnte gezeigt werden, dass die Zahl der Cajal-Retzius-Zellen vermindert, außerdem ihre Morphologie abnormal ist. Zusätzlich konnte eine stark verminderte *DCX*-

Expression nachgewiesen werden. Das führte Meyer *et al.* (2002) zum Schluss, dass LIS1-Mangel auch die DCX- und Reelin-positiven Neurone beeinträchtigt.

Bei Überexpression von Dcx und/oder Lis1 in Gehirnen von Mäusen konnte eine höhere Migrationsrate festgestellt werden (Tanaka *et al.* 2004b). Außerdem kann eine Dcx-Überexpression einen Lis1 heterozygoten Status kompensieren (Tanaka *et al.* 2004b). Diese Tatsachen weisen darauf hin, dass beide Proteine eng im Prozess der neuronalen Migration zusammenwirken.

1.6.6 Weitere Gene

In den letzten Jahren wurden außer im *LIS1*- und *DCX*-Gen in weiteren Genen Mutationen gefunden, die für neuronale Migrationsstörungen verantwortlich sind. Abbildung 7 stellt eine Diagnosehilfe zur korrekten Klassifizierung von häufigen neuronalen Migrationsstörungen dar.

1.6.6.1 Mutiertes 14-3-3 ϵ bei Patienten mit MDS

Außer einer schwergradigen Typ1-Lissenzephalie fallen beim Miller-Dieker-Syndrom (OMIM 247200) auch faciale Dysmorphien (hohe vorstehende Stirn, bitemporale Abflachung, kurze Nase mit vorwärtsgerichteten Nasenlöchern, flaches Mittelgesicht, vorstehende Oberlippe und kleiner Unterkiefer) auf (Dobyns *et al.* 1984). Es konnte gezeigt werden, dass bei Patienten mit MDS das Gen *YWHAE* mit dem Genprodukt 14-3-3 ϵ zusätzlich zum *LIS1*-Gen deletiert ist (Cardoso *et al.* 2003, Toyo-oka *et al.* 2003). Daraus erklärt man sich den höheren Schweregrad und die facialen Dysmorphien des Syndroms (Dobyns *et al.* 1999). Das Gen befindet sich auf Chromosom 17p13.3 und kodiert für ein Protein aus 255 Aminosäuren mit 6 Exonen. 14-3-3 ϵ bindet an CDK5-phosphoryliertes NUDEL und sorgt damit dafür, dass NUDEL phosphoryliert bleibt. Bei Defizienz findet man LIS1 und NUDEL nicht am richtigen Ort in der Zelle vor, außerdem kommt es zu einer Reduktion der zytoplasmatischen Dynein-Funktion (Toyo-oka *et al.* 2003).

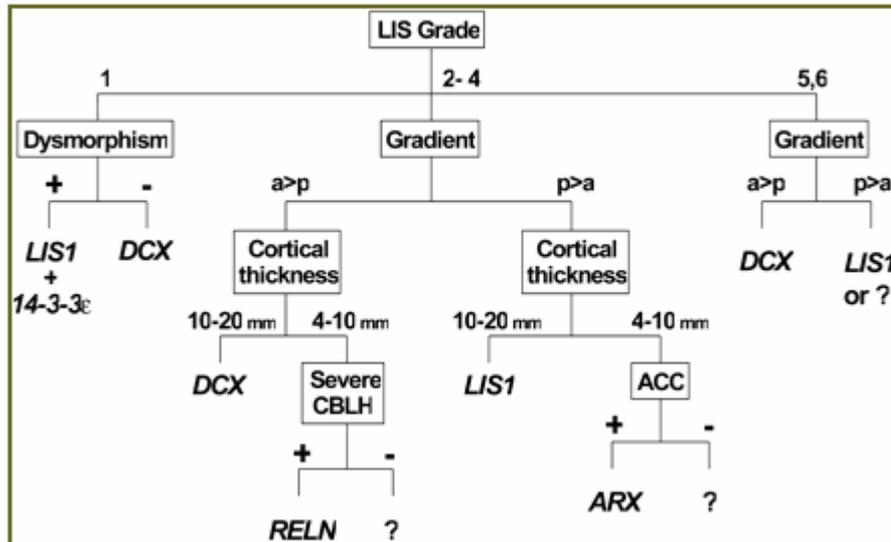


Abbildung 7 Diagnosehilfe zur korrekten Klassifizierung von neuronalen Migrationsstörungen. a anterior; p posterior; CBLH cerebelläre Hypoplasie; ACC Agenesie des Corpus Kallosum (Kato und Dobyns 2003).

1.6.6.2 *Reelin*- Mutationen bei Patienten mit LCH

Mutationen im *Reelin*- (*RELN*) Gen behindern die radiäre, gliagestützte Wanderung von Neuronen (Kato und Dobyns 2003). Das *RELN* Gen befindet sich auf Chromosom 7q22 (D'Arcangelo *et al.* 1995, Hong *et al.* 2000). Es codiert das aus 3460 Aminosäuren bestehende Protein Reelin. Dieses wird von Cajal-Retzius-Zellen in die extrazelluläre Matrix sekretiert. Rezeptoren für Reelin sind die Lipoproteinrezeptoren VLDLR („very low density lipoprotein receptor“) und ApoE₂R. Auch der „Cadherin-related-neuronal rezeptor“ (CNR) und $\alpha 3\beta_1$ -Integrin binden Reelin. Während die Bindung an $\alpha 3\beta_1$ -Integrin ein Stoppsignal für die neuronale Migration bedeutet, führt die Bindung an die anderen Rezeptoren zu einer Signalkaskade. Durch die Rezeptorbindung wird „mouse-disabled-1“ (mDab1) aktiviert, dieses gibt das Signal dann weiter, indem es an Tyrosinkinasen bindet (Wynshaw-Boris und Gambello 2001).

Mutationen im *RELN*-Gen wurden bei Patienten mit Lissenzephalie mit Hypoplasie des Cerebellums (LCH; OMIM 600514) gefunden (Hong *et al.* 2000). Außerdem fällt die Hippocampus-Fehlbildung und das afolare Kleinhirn auf (Strohner *et al.* 2001). Der Kortex hat eine Dicke von 5-10 mm und weist einen a>p-Gradienten auf (Kato und Dobyns 2003). Klinisch relevant sind die Hypotonie, die Entwicklungsverzögerung, die Epilepsie und der Nystagmus betroffener Patienten.

1.6.6.3 ARX-Mutationen bei Patienten mit XLAG

Ein weiteres Gen, das bei der neuronalen Migration eine Rolle spielt und für Lissenzephalie mit assoziierten Symptomen verantwortlich ist, ist das ARX-Gen („*aristaless related homeobox*“) (Kitamura *et al.* 2002). Das ARX-Gen befindet sich auf dem X-Chromosom (Xp22.1 – p21.1), und kodiert für einen Transkriptionsfaktor. Im Mausmodell konnte eine Rolle bei der neuronalen Proliferation, sowie bei der Migration und Differenzierung von Interneuronen gezeigt werden (Kitamura *et al.* 2002).

Mutationen im ARX-Gen manifestieren sich klinisch heterogen. Als XLAG (X-chromosomale Lissenzephalie mit abnormen Genitalien; OMIM 300215) zeigen betroffenen Jungen therapieresistente myoklonische Epilepsie, chronische Diarrhoe, Schwierigkeiten bei der Temperaturregulation und mentale Retardierung mit Sprachdefizit und aggressivem Verhalten (Kitamura *et al.* 2002). Es fallen abnorme Genitalien auf. Bei Patienten mit XLAG zeigt sich ein dreischichtiger Kortex mit einer Dicke von 5 bis 10 mm (Reiner 2002). Charakteristisch ist die Agenesie des Korpus Kallosum. ARX steuert die tangential wandernden GABAergen Interneurone. Diese sind in ihrer Migration und Differenzierung durch „loss-of-function“-Mutationen gestört (Kitamura *et al.* 2002, Sherr *et al.* 2003, Uyanik *et al.* 2003). Patientinnen zeigen nur milde bis moderate neurologische Symptome: Aufmerksamkeitsdefizit, mentale Retardierung und Epilepsie (Sheen and Walsh 2003). Aber auch andere syndromale Krankheitsbilder wie das West-Syndrom ohne Beteiligung des zentralen Nervensystems können auf Mutationen im ARX-Gen zurückgeführt werden (Sherr *et al.* 2003).

Außer den bisher erwähnten Genen konnten noch eine Reihe weiterer Gene identifiziert werden, die bei Mutationen Fehlbildungen des Kortex zur Folge haben. Eine Auswahl ist in Tabelle 2 dargestellt.

Tabelle 2

Weitere Gene, die zu neuronalen Entwicklungsstörungen führen.

Einteilung	Gen	Name der Krankheit	Wichtigste Kennzeichen	Referenz
Typ-2-Lissenzephalie	<i>Fukutin</i> (9q31-q33)	Fukuyama kongenitale Muskeldystrophie (FCMD; OMIM 253800)	Muskeldystrophie, Hirnfehlbildungen (Desorganisation der Schichtung des Kortex, Kleinhirns und des Hippocampus durch Übermigration der Neuronen) und selten Augenfehlbildungen (Myopie, persistierender primärer Glaskörper)	(Kobayashi <i>et al.</i> 1998)
Typ-2-Lissenzephalie	<i>POMGnT1</i> (1p32-p34)	MEB (Muscle-eye-brain disease; OMIM 253280)	kongenitale Muskeldystrophie, Augenfehlbildungen (kongenitale Myopie, Glaukom, retinale Hypoplasie) und Hirnfehlbildungen (Pachygyrie, Kleinhirnhypoplasie, flacher Hirnstamm) mit mentaler Retardierung	Yoshida <i>et al.</i> 2001
Typ-2-Lissenzephalie	<i>POMT1</i> (9q); <i>POMT2</i> (14q24)	Walker-Warburg-Syndroms (WWS) (OMIM 236670)	kongenitale Muskeldystrophie, Fehlbildungen der Augen (Mikrophthalmus, Exophthalmus, Buphthalmus, Megalocornea, Glaukom, retinale Dysplasie) und schwere Entwicklungsstörungen des Gehirns	Beltrán-Valero de Bernabé <i>et al.</i> 2002; van Reeuwijk <i>et al.</i> 2005
Periventrikuläre Heterotopie	<i>FLNA</i> (Xq28)	Periventrikuläre Heterotopie (OMIM 300049)	Jungen sterben meist schon intrauterin, Frauen leiden unter therapieresistenter late-onset Epilepsie bei nodulärer Ansammlung grauer Substanz periventrikulär	Fox <i>et al.</i> 1998

2. Fragestellung

In der Gruppe der neuronalen Migrationsstörungen nimmt die Lissenzephalie eine entscheidende Rolle ein. Eine klinische Diagnosestellung ist erst durch die technische Weiterentwicklung der digitalen Bildgebung (Magnetresonanztomographie) möglich geworden. Durch die nun routinemäßig durchgeführte Bildgebung mental retardierter Patienten, oder entwicklungsverzögerter Kinder fallen jetzt immer öfter die typischen Merkmale der Lissenzephalien auf. Allein auf Grund der Bildgebung lässt sich aber die genaue Diagnose nicht stellen. Ein weiterer entscheidender Schritt zur Klärung der Ätiologie der Lissenzephalien und zur molekularen Diagnosestellung ist durch die Forschungsarbeit des letzten Jahrzehnts gelungen. Trotzdem ist das Wissen über die Funktion der an der neuronalen Migration beteiligten Gene noch sehr bruchstückhaft. Dieser Umstand hat dazu geführt, dass genaue Vorhersagen über Schweregrad (Genotyp–Phänotyp–Korrelation) und Verlauf der Erkrankungen bisher kaum möglich sind. Hauptanliegen dieser Arbeit war es deshalb eine routinemäßige Untersuchung von betroffenen Patienten auf DNA-Ebene zu ermöglichen. Hierfür mussten zunächst die molekulargenetischen Analyseverfahren (PCR, direkte Sequenzierung) für das *LIS1*-Gen etabliert werden. Für das *DCX*-Gen konnte auf bereits etablierte Methoden zurückgegriffen werden. Auf Grundlage dieser Methoden sollten Patienten mit Typ 1-Lissenzephalie nach klinischer Prüfung und je nach Diagnose auf Mutationen im *LIS1*- und/oder *DCX*-Gen untersucht werden. Da bisher nur wenige Mutationen bekannt sind, musste bei einem durch die direkte Sequenzierung detektiertem Basenaustausch gegebenenfalls geklärt werden, ob es sich bei diesem um eine krankheitsverursachende Mutation, oder um einen Polymorphismus handelt. Hierfür wurden 50 gesunde Kontrollpersonen untersucht. Die weitere Analyse der auf diese Art detektierten Mutationen konzentrierte sich, soweit möglich, auf die klinischen Auswirkungen der Mutation. Zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation sollte in gleichem Maß auch die internationale Datenlage hinzugezogen werden, um mögliche Parallelen, oder Widersprüche zu erkennen.

3. Material und Methoden

3.1 Material

Die in dieser Arbeit verwendeten Standardchemikalien, Enzyme, Puffer und Salzlösungen sowie verwendete Geräte sind, soweit nicht im Text erwähnt, in den Appendices eins, zwei und drei auf den Seiten 84-88 zu finden.

3.1.1 DNA-Proben: Patienten-DNA

Die von mir untersuchten Patienten zeigten klinische und radiologische Zeichen einer Typ 1- Lissenzephalie. Um die klinische Diagnose weiter zu erhärten, wurde im Einverständnis mit den betroffenen Personen, beziehungsweise deren Erziehungsberechtigten die Patienten-DNA von mir weiter untersucht. Blutproben der Patienten wurden verschlüsselt (D-Nummern) und registriert.

3.1.2 DNA-Proben: Kontrollpersonen

Als Kontroll-DNA verwendete Proben stammen von nichtverwandten, gesunden Individuen. Ein nordwesteuropäisches/elsässisches anonymisiertes Kollektiv liegt zugrunde. Es wurden 50 männliche und 24 weibliche Kontrollpersonen untersucht. Außerdem wurden 50 anonyme, gesunde Kontrollpersonen spanischer Herkunft untersucht.

3.1.3 Das *LIS1*-Gen

Die hier verwendete Referenzsequenz wurde an Hand der NCBI-Genbankinformationen (U72334, -35, -36, -37, -38, -39, -40, -41, -42) und der Ensemble Datenbank (ENSG00000007168; AC005696.1.1.177411) zusammengestellt (cDNA Nummerierung aus: <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/cdna>; basierend auf Genbank Zugangsnummer U72333; ATG = Translationsbeginn = Nr.1) (Tabelle 3).

Tabelle 3

Kodierende Exonsequenzen für die Exone 2 bis 11 des *LIS1*-Gens. Nicht-translatierte Abschnitte in der 3' und 5' Region wurden nicht weiter untersucht. Der Translationsbeginn in Exon 2 und das Translationsende in Exon 11 sind in Fettdruck hervorgehoben.

EXON	DNA-SEQUENZ : <i>LIS1</i> -GEN
Exon 2	...TATTTAAATTATAAGTCCACGGATCAAAAAGCTTTTTGATTTCCCAAAGGAGGGACATACCACTATATCAGATA AGCTTGACATTACAGCCAAG ATGGT GCTGTCCCAGAGACAACGAGATGAACT
Exon 3	AAATCGAGCTATAGCAGATTATCTTCGTTCAAATGGCTATGAAGAGGCATATTCAGTTTTTAAAAAGGAAGC TGAATTAGATGTG
Exon 4	AATGAAGAATTAGATAAAAAGTATGCTGGTCTTTTGGAAAAAATGGACATCTGTTATTAGATTACAAAAGAAG GTTATGGAATTAGAATCAAAGCTAAATGAAGCAAAAGAAGAATTTACGTCAGGTGGACCTCTTGGTCAGAA ACGAGACCCAAAAGAATGGATCCCCGTCGCCAGAAAAATATGCATTGAGTGGTCACAGGAGTCCAGTC ACTCGAGTCATTTCCATCCTGTGTTCACTGTTATGGTCTCTGCTTCAGAGGATGCTACAATTAAG GTGTGGGATTATGAGACTGGAGATTTTGAACGAACCTCTAAAGGACATACAGACTCTGTACAGGACATTT CATTGACACAGCGGCAAGCTTCTGGCTTCTGTTCTGCAGATATGACCATTAAACTATGGGATTTTCA GGGCTTTGAATGCATCAGAACCATGCACG
Exon 5	GCCATGACCACAATGTTTCTTCAGTAGCCATCATGCCAATGGAGATCATATAGTGTCTGCCTCAAGGGATA AAACTATAAAAATGTGGGAAGTGCAAACCTGG
Exon 6	CTACTGTGTGAAGACATTCACAGGACACAGAGAATGGGTACGTATGGTACGGCCAAATCAAGATGGCA CTCTGATAGCCAGCTGTTCCAATGACCAGACTGTGCGTGTATGGGTCGTAGCAACAAAGGAATGCAAG GCTGAGCTCCGAGAGCATGAGCATGTGGTAGAATGCATTTCTGGGCTCCAGAAAGCTCATATTCCTC CATCTCTGAAGCAACAGGATCTGAG
Exon 7	ACTAAAAAAGTGGTAAACCTGGGCCATTCTTGCTGTCTGGATCCAGAGACAAGACTATTAAGATGTGGGAT GTCAGTACTGGCATGTGCCTTATGACCCTC
Exon 8	GTGGGTCATGATAACTGGGTACGTGGAGTTCTGTTCCATTCTGGGGGAAGTTTATTTGAGTTGTGCTG ATGACAAGACCCTACGCGTATGGGATTACAAGAACAAGCGATGCATGAAGACCCTCAATGCGCATGAAC ACTTTGTTACCTCCTTGG
Exon 9	ATTTCCACAAGACGGCACCCCTATGTCGTCAGTGGCAGCGTAGATCAAACAGTAAAAGTGTGGGAGTGCCGT TGA TTGTGTCTCCTTCGGCCCCTCCTCCCTCTTTTCCT...
Exon 10	
Exon 11	

3.1.4 Primer für das *LIS1*-Gen

Die verwendeten Primer (Pilz *et al.* 1998) wurden im Labor Igloi (Biologie II, Universität Freiburg, Deutschland) synthetisiert. In Tabelle 4 sind die Primersequenzen aufgelistet.

Tabelle 4

Oligonukleotidsequenz der Primer für die amplifizierten *LIS1*-Exone und die spezifischen „Annealing“-Temperaturen (T_a) sowie die resultierende PCR-Produktgröße.

Primername	Primersequenz	T_a (°C)	PCR-Produkt- länge (bp)
Exon 2F	5' TGT GGA AGA CAC TTA GTG GCA 3'	55,8	234
Exon 2R	5' AAG AGA CCT CCC AAA GCT GTA 3'	55,8	
Exon 3F	5' AAG AGT ATC TTC AGG GTT AAT G 3'	55,8	266
Exon 3R	5' TTG TGC GTA ACT GTT AAC TAC A 3'	55,8	
Exon 4F	5' TCT TGA GGA TCA TAG TTA AGC C 3'	53,8	204
Exon 4R	5' TGC AGA AGA ATG TTA TTT TCA G 3'	53,8	
Exon 5F	5' GAA ATC TAT CTG TAC GTA ACT AC 3'	55,8	334
Exon 5R	5' ATC TCG GCT CAC TGC AAA CT 3'	55,8	
Exon 6F	5' AAG GAG TGA TGG AGT TGG TG 3'	53,8	302
Exon 6R	5' GGG ACA CTG TAC ACT GTT AG 3'	53,8	
Exon 7F	5' AAC CCC ATG GTA AAA TCC CAT 3'	60	310
Exon 7R	5' GGC TGG TCT TCA ATT CCT GA 3'	60	
Exon 8F	5' TTC TGG GAA GTG TCC TGA TG 3'	53,8	333
Exon 8R	5' CAG ATA TCA GCA ATA AAA CCA TG 3'	53,8	
Exon 9F	5' GTC CAT ACC TAA CTT TCT TGT G 3'	53,8	228
Exon 9R	5' CAT AAA GCA TTA ATC CCA AAA GG 3'	53,8	
Exon 10F	5' GAT GCT ATT TAA ACA TTT TGC C 3'	53,8	266
Exon 10R	5' TTT GTC TGG CAC TCC AAA ATC 3'	53,8	
Exon 11F	5' GGT CTC ACT ATG TTT GTT GTC CA 3'	55,8	198
Exon 11R	5' GGT ATC ATC AGA GTG CAT CCA G 3'	55,8	

3.1.5 Primer für allelspezifische PCR des Intron 7 des *LIS1*-Gens

Für die allelspezifische PCR des Introns 7 wurden von mir Primer neu ausgewählt und etabliert (Tabelle 5). Das Ziel war es, zwei „Forward“-Primer, die sich nur an der Stelle des Basenaustausches am 3`-Ende unterschieden, zu entwickeln. Die optimale Länge des Primers sollte ca. 20 Nukleotide betragen. Die Möglichkeit der Bindung der „Forward“- und „Reverse“-Primer untereinander wurde ausgeschlossen.

Tabelle 5

Oligonukleotidsequenz der Primer für die amplifizierte allelspezifischen Intron 7-PCR und die spezifischen „Annealing“-Temperaturen (T_a) sowie die resultierende PCR-Produktgröße.

Primername	Primersequenz	T_a (°C)	PCR-Produkt- länge (bp)
Exon 8FNor	5` CAC AGT GTA AGT TAT TAT TTA 3`	55,8	303
Exon 8FMut	5` CAC AGT GTA AGT TAT TAT TTC 3`	55,8	303
Exon 8R	5` CAG ATA TCA GCA ATA AAA CCA TG 3`	55,8	

3.1.6 Primer zur Amplifikation eines PCR-Produkts aus cDNA (*LIS1*-Gen)

Zur Amplifikation von Gensequenzen aus cDNA wurden Primer ausgewählt, die innerhalb des Exons liegen (Tabelle 6). Es galten alle allgemeinen Bedingungen für Primer, wie unter 3.1.5 beschrieben.

Tabelle 6

Oligonukleotidsequenz der Primer für die amplifizierte PCR aus cDNA und die spezifischen „Annealing“-Temperaturen (T_a) sowie die resultierende PCR-Produktgröße.

Primername	Primersequenz	T_a (°C)	PCR-Produkt- länge (bp)
Exon 6.1F	5`GCT TCC TGT TCT GCA GAT AT 3`	59	437
Exon 9.1R	5`AAG AAT GGC CCA GGT TTA CC 3`	59	

3.1.7 Das *DCX*-Gen

Die hier verwendete Referenzsequenz wurde an Hand der NCBI Genbankinformationen (AJ005592.1, -93.1, -94.1, -95.1, -96.1, -97.1) und der Ensembl Datenbank (ENSE00000674913, ENSE00000830388, -87, -84, -82, -81) zusammengestellt (cDNA-Nummerierung aus: <http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/cdna>; basierend auf Genbank Zugangsnummer AJ003112; ATG = Translationsbeginn = Nr. 43) (Tabelle 7).

Tabelle 7

Kodierende Exonsequenz des *DCX*-Gens. Der Translationsbeginn in Exon 4 und das Translationsende in Exon 9 sind in Fettdruck hervorgehoben. Exon 3 entsteht bei alternativem Spleißen.

EXON	DNA-SEQUENZ : <i>DCX</i> -GEN
Exon 3	...CCCCCTTCATAGTCATTGTA CTGAAATGCAAAGACTGCTTCCTAAGCTGGAGATGCTAACCTTGGGTAGC TCCTTCTGTTCTCTTCAAGGGGAATTTTGT CAGGCTATGGATTCATTTACA ACTGTTAGTCATGTGGGCAT GTGTGAGGAAACAGATGCCAGTTTTAATGATT TAGCCCCGAAGTTCCAATTTGATAGGAGCCACTGTCA
Exon 4	GGTCTCTGAGGTTCCACCAAAAT ATG GAACTTGATTTTGG ACTTTGACGAAAGAGATAAGACATCCAG GAACATGCGAGGCTCCCGGATGAATGGGTTGCCTAG CCCCACTCACAGCGCCCACTGTAGCTTCTAC CGAACCAGAACCTTGCAGGCACTGAGTAATGAGA AAGAAAGCCAAAGGTAAGTACGTTTCTACCGCAATGG GGACCGCTACTTCAAGGGGATTGTGTACGCTGTG TCTGACCGTTTTTCGAGCTTTGACGCCTTGC TGGCTGACCTGACGCGATCTGTCTGACAACATCA ACCTGCCTCAGGGAGTGCCTTACATTTACACC ATTGATGGATCCAGGAAGATCGGAAGCATGGATG AACTGGAGGAAG
Exon 5	GGGAAAGCTATGTCTGTTCCCTCAGACA ACTTCTTTAAAAAGGTGGAGTACACCAAGAATG TCAATCCCAAC TGGTCTGTCAACGTAAAAACATCTGCCAATATG AAAGCCCCCAGTCCTTGGCTAGCAGCAACAGTGC CACA GGCCAGGGGAGAACAAGGACTTTGTGCGCCCCA AGCTGTTACCATCATCCGCAGTGGGGTGAAGCCTCG GAAGGCTGTGCGTGTGCTTCTGAACAAGAAGAC AGCCCACTTTTTGAGCAAGTCTCACTGATATCACAG AAGCCATCAAACCTGGAGACCGGGGTTGTCA AAAAACTCTACACTCTGGATGGAAAAACAG
Exon 6	GTA ACTTGTCTCCATGATTTCTTTGGTGATGATGATG TGTATTATGCCTGTGGTCTGAAAAATTTGCTATG CTCAGGATGATTTTTCTCTGGATGAAAATG
Exon 7	AATG CCGAGTCATGAAGGGAAACCCATCAGCCACAGCT GGCCCCAAAGGCATCCCCAACACCTCAGAAAGAC TTCAGCCAAGAGCCCTGGTCCTATGCGCCGAAG CAAGTCTCCAGCTGACTCAG
Exon 8	CAAACGGAACCTCCAGCAGCCAGCTCTTAC CCCCAAGTCTAAGCAGTCTCCCATCTCTACG CCCACCAG TCCTGGCAGCCTCCGGAAGCACAAG
Exon 9	GACCTGTACCTGCCTCTGTCTTGGATGACTCG GACTCGTTGGTGATTCCATGT AA AGGAGGGGAGA GTGCTCAGAGTCCAGAGTACAAATCCAAGCCTAT CATTGTAGTAGGGTACTTCTGCTCAAGTGTCCAAC AGGGCTATTGGTGCTTTCAAGTTTTATTTGTTG TTGTTATTTGAAAAACACATTGTAATATGTTGG GTTTATTTTCTGTGATTTCTCCTCTGGGCCACT GATCCACAGTTACCAATTATGAGAGATAGATTGATA AACCATCTTTGGGGCAGCATTCCAGGGATGCA AAATGTGC...

3.1.8 Primer für das *DCX*-Gen

Die verwendeten Primer für die Exone 3, 6, 7, 8 und 9 wurden bei Aigner *et al.* (2000) beschrieben; die Sequenzen der Primer für die Exone 4 und 5 wurden uns von Dr. S. Das (Pers. comm., Dept. of Human Genetics, University of Chicago) übermittelt. Alle Primer wurden vom Labor Igloi (Biologie II, Universität Freiburg, Deutschland) hergestellt. In Tabelle 8 sind die Primersequenzen aufgelistet.

Tabelle 8

Oligonukleotidsequenz der Primer für die amplifizierten *DCX* Exone und die spezifischen „Annealing“-Temperaturen (T_a) sowie die resultierende PCR-Produktgröße.

Primername	Primersequenz	T_a (°C)	PCR-Produktlänge (bp)
Exon 3F	5' CCCCCTTCATAGTCATTGTAC 3'	57	285
Exon 3R	5' GGGAGGACTCTTGGCACT 3'	57	
Exon 4F	5' CTTACACCCCATCCCTTTCTCCCA 3'	61	469
Exon 4R	5' TAACCAATGATGCCACCTCC 3'	61	
Exon 5F	5'TTGGTTAGAATAATCCATATATCTGCT3'	56	503
Exon 5R	5' GGAGGAAGAGTCCGTCAA 3'	56	
Exon 6F	5' GGACCATCATATAACAATCAGTG 3'	54	329
Exon 6R	5' CCAGTCAGTCCTTCAGTCTTAC 3'	54	
Exon 7F	5' CCAGAGGCTGATAACATGCT 3'	57	375
Exon 7R	5' GCTGTGCCTCCATGACTCC 3'	57	
Exon 8F	5' CTTGTTTGAATGTTCTTAGTGT 3'	55	352
Exon 8R	5' CTGCTTGGATTGCGAGAAC 3'	55	
Exon 9F	5' GGGTACATTGGTACAAGGGT 3'	57	488
Exon 9R	5' GCACATTTTGCATCCCTGGA 3'	57	

3.2 Methoden

3.2.1 DNA-Extraktion

Die Extraktion genomischer DNA aus den EDTA-Blutproben folgte einem Protokoll des Nukleon Kits BACC2 (Amersham Biosciences) für Blutvolumina ab 3 ml Blut.

Hierbei wurde die vierfache Menge des Lysepuffers (Reagent A) zur Blutprobe gegeben und nach ca. vier Minuten mischen bei Raumtemperatur, für weitere vier Minuten bei 2600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet mit einem zweiten Puffer (Reagent B) resuspendiert. Hinzu kam 500µl Natrium-Perchlorat und 2 ml Chloroform, sowie nach dem Vermischen der Substanzen 300 µl Resin. Im Anschluss hierzu wurde erneut vier Minuten bei 2600 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Gefäß überführt und die zweifache Menge an kaltem, absolutem Ethanol zur Fällung der DNA zugegeben. Es folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt mit 6000 rpm für eine Minute. Nach dem Entfernen des absoluten Ethanols, wurde in 70% Ethanol gewaschen, danach ca. 15 Minuten luftgetrocknet. Die extrahierte DNA wurde in TE-Puffer gelöst und bei 4°C gelagert.

3.2.2 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion aus Zellkulturen folgte einem Protokoll des Qiagen-Rneasy Mini Kits (Qiagen, Hilden, Deutschland). Dabei wurde RNA aus ca. 6×10^5 Zellen extrahiert. Zunächst wurden die Zellen mit einem Lysepuffer vorbehandelt. Zur Entfernung der DNA wurde die lysierten Zellen durch Qiasredder Säulen (Qiagen, Hilden, Deutschland) zentrifugiert. In das Zentrifugat wurde ein gleicher Volumenanteil 70% Ethanol zugefügt. Das dadurch entstandene Volumen wurde durch Rneasy mini spin Säulen zentrifugiert (15s bei 10000 rpm). Das Zentrifugat wurde verworfen. Auf die Säulen wurde als nächster Schritt ein Puffer RW1 aufpipettiert, dieser dann bei 10000 rpm für 15s zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Dann wurde zweimal der Puffer RPE in die Säule pipettiert und für 15s bei 10000 rpm beziehungsweise zwei Minuten bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Zum Lösen der RNA wurden zwei mal 30 µl H₂O in die Säule pipettiert und je eine Minute bei 10000rpm zentrifugiert. Die Lagerung der so gewonnenen RNA erfolgte bei -20°C.

3.2.3 DNA-/RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration der extrahierten DNA/RNA (1:10 Verdünnung in HPLC-Wasser) wurde mit Hilfe des BioPhotometers 6131 (Eppendorf, Hamburg, Deutschland) bestimmt. Hierzu wird nach Lambert-Beer die Konzentration von Nukleinsäuren durch deren Absorption bei einer Wellenlänge von 260 nm (A_{260}) ermittelt. Bei Wellenlängen von 280 nm absorbieren außerdem auch aromatische Gruppen von Aminosäuren. Aus einem Quotient A_{260} / A_{280} lässt sich somit die Reinheit der extrahierten DNA, bzw. die Verunreinigung mit Proteinen, feststellen. Als Zielwert für die Reinheit der DNA gilt ein Wert des Quotienten zwischen 1,8 und 2,0.

3.2.4 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR-Reaktion erlaubt, gezielt einzelne Abschnitte aus dem Genom zu vervielfältigen. Hierzu werden spezifische einzelsträngige Primer, die die gewünschte Region flankieren und an DNA binden, eingesetzt. Die Synthese von PCR-Produkt folgt wiederkehrenden Abläufen (Zyklen). Zuerst werden die DNA-Stränge durch Erhitzen aufgetrennt (Denaturierung). An die nun als Einzelstrang vorliegende DNA binden die spezifischen Primer („Annealing“). Eine hitzestabile Polymerase (*Taq*-Polymerase) verlängert nun mit Hilfe von dNTPs, die in Richtung 5` nach 3` angebaut werden („Elongation“). Die Schritte „Denaturierung – Bindung – Verlängerung“ werden wiederkehrend wiederholt.

Amplifikation der Exone

Zur Amplifikation der einzelnen Exone der Gene *LIS1* und *DCX* wurden primer-spezifische PCR-Bedingungen etabliert. Zur Optimierung der PCR-Reaktion wurde bei Bedarf ein „Temperaturscreening“ durchgeführt. Hierbei wurde für den Schritt der spezifischen Primerbindung an die DNA-Matrize („Annealing“-Temperatur) ein Temperatur-Gradient aufgestellt.

Für das ***LIS1*-Gen** fand die Reaktion in einem Reaktionsvolumen von 50 μ l, in 1 X PCR-Puffer mit einer Primerkonzentration von 15 pmol/ μ l, 1,5 μ l dNTPs (2 mM), 1 μ l $MgCl_2$ (25 mM), 0,25 μ l *Taq*-Polymerase (5U/ μ l), 10 μ l Q-Solution, H_2O_{dd} und einer DNA Menge von 150 - 300 ng statt.

Die PCR-Bedingungen im PCR-Gerät DYAD (MJ Research, Biozym, Oldendorf, Deutschland) wurden wie folgt gewählt:

Anfangsdenaturierung:	94°C für zwei min
30 Zyklen: Denaturierung:	94°C für 45 sek
Bindung:	primer-spezifische Temperatur für 45 sek
Verlängerung:	72°C für 45 sek
Abschließende Verlängerung:	72°C für 8 min.

Für das **DCX-Gen** fand die Reaktion in einem Reaktionsvolumen von 50 µl, in 1X PCR-Puffer mit einer Primerkonzentration von 15 pmol/µl, in Anwesenheit von 2,5 µl dNTPs (2 mM), 0,25 µl Taq-Polymerase (5U/µl), 10 µl Q-Solution, H₂O_{dd} und einer DNA Menge von 150 - 300 ng statt.

Die PCR-Bedingungen im PCR-Gerät PTC 200 (MJ Research, Biozym, Oldendorf, Deutschland) waren:

Anfangsdenaturierung:	94°C für zwei min
30 Zyklen: Denaturierung:	94°C für 45 sek
Bindung:	primer-spezifische Temperatur für 1 min
Verlängerung:	72°C für 1 min
Abschließende Verlängerung:	72°C für 8 min.

3.2.5 Agarosegelelektrophorese

Zur Überprüfung der PCR-Reaktion wurde die Gelelektrophorese eingesetzt. Dazu wurden 1,5-2%ige LE-Agarosegele verwendet. Hierfür wurde 1,5-2g Agarose in 100ml 1 X TBE-Puffer aufgekocht und nach Abkühlen auf ca 40°C mit 3µl Ethidiumbromid versetzt.

Es wurden 10 µl des PCR-Produkts und 3 µl Ladepuffer aufgetragen. Die Produktgröße wurde mit Hilfe eines 100 bp Markers bestimmt. Die Elektrophorese wurde bei 150V durchgeführt. Zur Dokumentation wurden die Gele unter Durchleuchtung eines UV-Transilluminators mit der digitalen Kamera des AlphaDigiDoc (Biozym, Oldendorf, Deutschland) photographiert.

3.2.6 Aufreinigung der PCR-Produkte

Zur weiteren Analyse mussten die PCR-Produkte mittels Montage™ PCR Centrifugal Filter Devices (Millipore, Eschborn, Deutschland) aufgereinigt werden. Dazu wurden 400 µl HPLC-Wasser und 40 µl PCR-Produkt in die Säulen pipettiert und 20 Minuten bei 3800 rpm zentrifugiert (Zentrifuge: Centrifuge 5415 D; Eppendorf, Hamburg, Deutschland). Das Zentrifugat wurde verworfen. Dann wurden die Säulen umgedreht, um 10 µl HPLC Wasser auf die Membran zu geben. Nach 2-minütiger Zentrifugation bei 3800 rpm wurde kontrolliert, ob die gesamte aufpipettierte Menge die Membran passiert hatte. Falls Teile der aufpipettierten Menge die Membran nicht passierte, wurde diese nochmals auf die Membran gegeben. Dann folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (2 min, 3800 rpm). Das Eluat bildete nun die Grundlage für die weitere Analyse der Proben.

Zur Kontrolle wurden 10 µl HPLC Wasser, 1 µl Eluat und 3 µl Ladepuffer auf ein 1,5-2 % Agarosegel aufgetragen.

3.2.7 Sequenzierung von DNA

Die Sequenzierungsreaktion nach der Kettenabbruchmethode erlaubt die Darstellung der genauen Basenabfolge z.B. eines Genabschnitts. Dazu werden fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotidtriphosphate (ddNTPs) der Reaktion zugesetzt, die zum basenspezifischen Abbruch des Elongationsschritts führen. Dies führt zu unterschiedlichen Fragmentlängen, die der automatische Sequenzierer mit Hilfe der Kapillarelektrophorese auftrennt. Da jedes ddNTP mit einem anderen Fluoreszenzfarbstoff markiert ist, kann der automatische Sequenzierer mit Hilfe eines Lasers die Basenabfolge ermitteln und an einen Computer weiterleiten.

Zur Sequenzierung der aufgereinigten PCR- Eluate folgte ich einem Protokoll des „BigDye Cycle-Sequencing Kit“ der Firma Applied Biosystems (Foster City, USA). Hierbei wurden zu 1 µl Fertigmix 1 µl DMSO, 5 pmol Primer, 200-500 ng DNA gegeben und mit H₂O auf 10 µl aufgefüllt.

Die Bedingungen im DYAD wurden wie folgt festgelegt:

96°C für 1 min

25 Zyklen: 96°C für 10 s

55°C für 5s

60°C für 4 min.

3.2.8 Aufbereitung der sequenzierten Eluate

Zur Vorbereitung der Proben auf die Analyse im Sequencer (ABI, Prism 310 automatic DNA Sequencer) wurden die sequenzierten Eluate über MicroSpin™ S-200 HR Columns (Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland) aufgereinigt. Hierzu wurden die Säulen mit 700 µl 7%igem Sephadex G50 gefüllt und 2 Minuten bei 3800 rpm zentrifugiert. Danach folgten zwei Waschschriffe, wobei je 400 µl H₂O in die Säulen gegeben wurden, um sie dann 2 min bei 3800 rpm zu zentrifugieren. Als Kalibrierungsschritt wurden 10 µl H₂O direkt auf die Sephadexsäule pipettiert. Eine erneute Zentrifugation von 2 Minuten bei 3800 rpm folgte.

Die Sephadexsäulen wurden nun auf ein mit 20 µl Template Suppression Reagent (TSE) gefülltes Eppendorf-Reaktionsgefäß gesetzt. Jetzt wurde auf die Sephadexsäule die gesamte Menge (10 µl) des sequenzierten Produkts pipettiert und 2 Minuten bei 3800 rpm zentrifugiert. Die Proben wurden auf Eis gestellt.

Die aufgereinigten Proben wurden vor der Analyse im Sequencer 2 Minuten bei 93 °C denaturiert und direkt danach wieder auf Eis gestellt.

3.2.9 Analyse und Auswertung der sequenzierten Proben

Die Proben wurden im ABI Prism 310 automatic DNA Sequencer analysiert.

Zur Auswertung der gewonnenen Daten wurden diese mit dem Computer Programm SeqMan (Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland) bearbeitet.

3.2.10 Restriktionsverdau mit *Ddel*, *ApoI*, *MnII* und *TseI*

Hierfür wurde jeweils eine PCR nach den oben genannten Bedingungen erstellt. Das PCR-Produkt wurde mit dem Restriktionsenzym und Reaktionspuffer (BioLabs, Frankfurt, Deutschland) zusammenpipettiert (je nach Protokoll mit 100 µg/ml BSA) und mit Wasser auf das Endvolumen aufgefüllt. Der Spaltungsansatz wurde über Nacht inkubiert. Die gesamte Menge des Restriktionsprodukts wurde mit Ladepuffer auf ein 3-4%iges Agarosegel (2%-3% Nusieve +1% LE-Agarose) aufgetragen (Tabelle 9). Durch Gelelektrophorese und anschließende Photographie der Gele wurde das Ergebnis dokumentiert.

Tabelle 9

Reaktionsbedingungen der verschiedenen Restriktionsverdau.

Gen	Exon	Enzym	Temperatur	Endvolumen	PCR-Produkt	Puffer	BSA
<i>DCX</i>	4	10U <i>Ddel</i>	37°C	20µl	8µl	3	-
<i>LIS1</i>	3	15U <i>ApoI</i>	50°C	30µl	20µl	3	+
<i>LIS1</i>	4	15U <i>MnII</i>	37°C	30µl	20µl	2	+
<i>LIS1</i>	11	9U <i>TseI</i>	65°C	20µl	10µl	3	-

3.2.11 Allelspezifische PCR

Für die allelspezifische PCR im Bereich des Intron 7 / Exon 8 im *LIS1*-Gen wurde ein neuer, allelspezifischer „Forward“-Primer zu diesem Zweck ausgewählt. Die Bedingungen der allelspezifischen Exon8-PCR entsprachen denen der Exone 2,3,11. Nur Proben mit dem Basenaustausch wurden amplifiziert. Die PCR-Produkte wurden auf ein 2%iges LE-Agarose-Gel geladen und zur Dokumentation photographiert.

3.2.12 RT-PCR

Die RT-PCR wurde mit Ready-to-go RT-PCR Beads der Firma Amersham Biotec, Freiburg, Deutschland hergestellt. Dazu wurden ca 2000 µg/µl der extrahierten RNA mit Rnase freiem Wasser in einem Gesamtvolumen von 25 µl für 10 Minuten bei 65°C denaturiert. Nach drei Minuten auf Eis und einem Zentrifugationsschritt, wurde das

gesamte Volumen in die Ready-to-go RT-PCR Beads pipettiert. Hinzu kam außerdem 20 pmol des *LIS1*-Exon11F-Primers. Die Beads wurden mit Wasser auf ein Endvolumen von 33 µl aufgefüllt. Die Beads wurden dann eine Stunde bei Raumtemperatur und eine Stunde bei 37°C inkubiert. Eine weitere Aufreinigung war nicht erforderlich. Die cDNA wurde bei -20°C gelagert.

3.2.13 PCR mit cDNA

Für die PCR mit cDNA konnten die Bedingungen der PCR für *LIS1*-Exone mit genomischer DNA übernommen werden. Die benötigten spezifischen Primer im Exon-Bereich wurden von mir neu entworfen. Es wurde 1 µl des RT-PCR-Produkts in den PCR-Ansatz eingesetzt.

Die weiteren Arbeitsschritte waren mit denen der PCR mit genomischer DNA identisch.

3.2.14 Southern Blot

1. Spaltung der genomischen DNA

Für die Spaltung wurde 5,0 µg DNA eingesetzt.

Die Spaltungsansätze mit *Bam HI*, *Eco RI* und *Hind III* wurden auf ein Endvolumen von 50µl ausgelegt. Außer der DNA und den Restriktionsendonukleasen (je 25 U) wurde spezifischer Enzympuffer, 1 µl Spermidin (0,1 M), 1 µl BSA (10 mg/ml) und H₂O_{dd} zugefügt. Die Spaltungsansätze wurden bei 37°C über Nacht inkubiert.

Die Vollständigkeit der Spaltung wurde mit einem 0,8% LE-Agarose Probelgel überprüft.

2. Southern Blot Gel

Der gesamte Rest der Spaltungsansätze (mit 20 µl Ladepuffer vermischt) wurde nun auf ein 0,8% LE-Agarosegel aufgetragen, wobei auf jeder Außenspur ein 1 kb Leiter als Größenstandard mitlief. Die Elektrophorese erfolgte bei 50 V über Nacht.

3. Southern Blot

Nach der Photodokumentation, wurde das Gel in 0,25M HCl zwei mal zehn Minuten im Schüttler depurinisiert. Es folgte ein kurzer Waschschrift mit H₂O_{dd} und die Denaturierung mit 0,4M NaOH (2 mal 15 Minuten).

Sodann wurde der Blot mittels Hybond N⁺ Filter, Schleicher und Schüll Gel Blotting Paper GB003 („dickes Blotting Papier“), Schleicher und Schüll Gel Blotting Paper GB002 („dünnere Blotting Papier“), Zellstofflagen und einer Plexiglasplatte sowie einem schweren Buch aufgebaut und über Nacht geblottet.

Am nächsten Tag wurde die Filtermembran in 50mM Natrium-Phosphatpuffer gewaschen, bis ein pH von 6,5 bis 7,0 erreicht war.

4. Hybridisierung

Zur Vorbereitung auf die Hybridisierung wurden die Filter mit 10 ml Hybridisierungspuffer im Hybridisierungssofen auf 65°C für 2 Stunden prähybridisiert.

Die Sonden-DNA (für *LIS1* und *DCX*) wurden mit Hilfe von Rediprime (Rediprime II Random Prime labeling System Amersham RPN 1633), Sephadex Säulen (Micro Spin S-200HR Collums, Amersham) und [α -³²P]-dCTP (10 μ Ci/ μ l) (Redivue, Amersham) vorbereitet.

Dazu wurde 50 ng Sonden-DNA in HPLC-Wasser im kochenden Wasserbad 10 Minuten denaturiert, danach gleich auf Eis gestellt. Dann wurde die denaturierte DNA dem Rediprime zugegeben. Außerdem wurde 3 μ l [α -³²P]-dCTP (10 μ Ci/ μ l) zugeführt. Die Reaktion wurde 10 Minuten bei 37°C inkubiert. 35 μ l Stopplösung beendete die Reaktion. Das ganze Volumen wurde in die Sephadex Säulchen mit 100 μ L Wasser überführt. Nun folgte ein Zentrifugationsschritt mit 1700rpm für 2,5 Minuten, um das nicht eingebaute [α -³²P]-dCTP vom radioaktiv-markierten Fragmentgemisch zu trennen. Die markierte Sonde wurde mit markiertem 1kb Marker gemischt und 15 Minuten bei 95°C denaturiert.

Die Hybridisierung der Blotmembran fand bei 65°C mit den mit [α -³²P]-dCTP (10 μ Ci/ μ l) markierten Sonden über Nacht statt.

5. Waschen und Exponieren

Der hybridisierte Filter wurde zweimal für 5 Minuten mit 2x SSC Puffer bei Raumtemperatur, 15 Minuten mit Waschpuffer (50mM Natrium-Phosphatpuffer) bei 45°C im Wasserbad, danach 15 Minuten bei 50°C, 15 Minuten bei 55°C, 15 Minuten bei 60°C, 15 Minuten bei 65°C in einem 20 mM Natrium-Phosphatpufferbad gewaschen, bis die Radioaktivität bei etwa 40-90 ips/min lag.

Die Filter wurden nun in eine Filmkassette mit einem Fuji-Röntgen Film eingelegt und für 24h bei -80°C inkubiert. Anschließend wurde der Film entwickelt. Danach wurde gegebenenfalls bei -80°C weiter exponiert.

4. Ergebnisse

4.1 Fallbeschreibungen

Patient **D2946** wurde am 17.08.98 geboren. Wegen Pachygyrie und Lissenzephalie bei Mikrozephalie wurde die Diagnostik auf molekularer Ebene eingeleitet: eine Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisation (FISH) mit einer spezifischen Sonde (LSI *LIS1* DNA FISH probe; VYSIS), die das *LIS1*-Gen überspannt, zeigte keine Deletion des *LIS1*-Gens. Auch die Untersuchung des *DCX*-Gens durch direkte Sequenzierung zeigte keine Auffälligkeiten.

Bei Patientin **D2947** (*18.03.86) wurden ab dem 9. Lebensjahr Myoklonien der Unterarme und Hände, sowie Absencen beobachtet. Ihre Epilepsie war nur ungenügend mit Medikamenten zu therapieren. In der Bildgebung fiel eine Bandheterotopie auf. Deswegen wurde zunächst nach Mutationen im *DCX*-Gen gesucht. Dabei zeigten sich keinerlei Auffälligkeiten. Im Alter von circa 15 Jahren fielen eine Verschlechterung der Leistungsfähigkeit, der Konzentrationsfähigkeit und eine deutliche Antriebslosigkeit auf.

Wegen schwerster psychomotorischer Retardierung wurde bei Patient **D2954** (*11.02.81) ein craniales Computertomogramm (CCT) durchgeführt. Eine lissenzephalie Anlagestörung wurde daraufhin diagnostiziert. Sowohl die Untersuchung mittels FISH mit der *LIS1*-Sonde, als auch die direkte Sequenzierung des *DCX*-Gens blieben unauffällig.

Bei Patient **D2981** fiel nach unauffälliger Schwangerschaft und Entbindung schon bei der U₃ ein beschleunigtes Kopfwachstum auf. Ein Elektroenzephalogramm (EEG) zeigte rechtshemisphärisch betonte hypersynchrone Aktivität, vor allem in der Region des Schläfen- und Hinterhauptbeins. Schon seit dem ersten Lebensmonat bestand eine Hemisymptomatik links. Im Alter von 6 Monaten wurde ein MRT des Schädels durchgeführt, welches Gyrierungsanomalien der rechten Zentralregion und Pachygyrie, sowie periventrikuläre noduläre Heterotopien zeigte. Bisher wurden noch keine Krampfanfälle beobachtet. Es konnte keine Mutation im *DCX*-Gen nachgewiesen werden. Die Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisation mit der *LIS1*-Sonde detektierte keine Auffälligkeiten.

Wegen Pachygyrie und Mikrozephalie wurde die Diagnostik bei Patient **D3000** (*28.06.01) eingeleitet. Schon seit der Geburt war der Kopfumfang unter der 3. Perzentile gelegen.

Der Patient litt unter Reflux. Ein Miller- Dieker- Syndrom/größere Deletionen wurden über Fluoreszenz-*in-Situ*-Hybridisation mit der *LIS1*-Sonde ausgeschlossen. Das Mutationsscreening im *DCX*-Gen war ohne pathologischen Befund.

Über Patient **D3050** (*02.02.81) ist außer einer schweren mentalen Retardierung und der Diagnose Lissenzephalie leider nichts weiteres über Klinik und Verlauf der Erkrankung bekannt. Auf Grund seiner Namensgebung schlossen wir auf eine spanische oder portugiesische Abstammung. Der Kontakt zur behandelnden Ärztin war nur begrenzt möglich.

Patientin **D3077** (*13.06.00) war schwer entwicklungsverzögert und –gestört. Sie war blind und taub. Die Patientin litt seit etwa dem dritten Lebensmonat unter Epilepsie. Ihr EEG zeigte ein pathologisches Muster. Sie musste mit Hilfe einer Magensonde ernährt werden. Eine zentralnervöse Unruhe und Muskelhypotonie ohne spastische Komponenten machten ihr zu schaffen. Die MRT-Bilder (Abbildung 8A) zeigten eine Typ 1-Lissenzephalie Grad 3, mit okzipitaler und temporaler Pachygyrie und milder zerebellärer Hypoplasie.

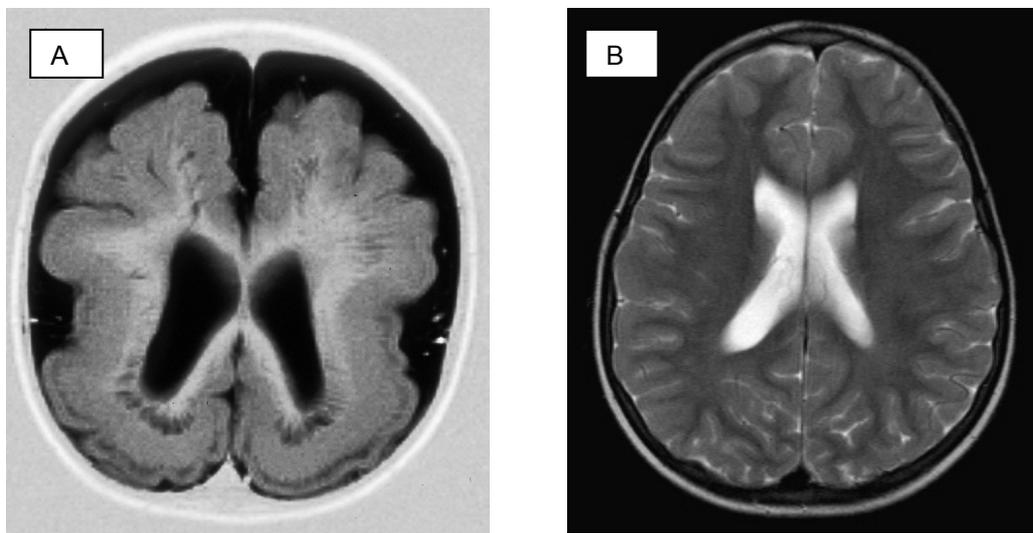


Abbildung 8 A T₁ – MRT-Bild der Patientin D3077. B T₂ –MRT Normalperson (2-jähriges Kind).

Patient **D3097** (*21.05.01) wurde in der 32. Schwangerschaftswoche geboren. Seit diesem Zeitpunkt war ein zerebrales Anfallsleiden bei Muskelhypotonie bekannt. Während diesem ersten Klinikaufenthalt fiel eine praktisch fehlende psychomotorische Entwicklung auf. Im MRT zeigte sich dann ein Agyrie – Pachygyrie – Komplex. Im Alter von 9 Monaten, wurde eine schwere psychomotorische Retardierung mit zentraler Koordinationsstörung

diagnostiziert. Auf Grund von fazialen Auffälligkeiten (hohe Stirn, flacher breiter Nasenrücken mit angedeutetem Epikanthus, asymmetrischer Schädel und einem Kopfumfang unter der dritten Perzentile) und damit dem Verdacht auf ein Miller-Dieker-Syndrom wurde eine FISH-Untersuchung mit der *LIS1*-Sonde durchgeführt. Diese zeigte sich jedoch unauffällig.

Im Alter von sechs Monaten wurde bei Patientin **D3133** (*11.05.01) eine Lissenzephalie klinisch diagnostiziert. Im Alter von zwei Jahren zeigte sie eine deutliche Entwicklungsverzögerung. Sie zeigte eine Muskelhypotonie mit plötzlichen spastischen Krämpfen. Im EEG wurde eine erniedrigte Krampfschwelle festgestellt. Im MRT (Abbildung 9A) stellte sich eine Typ 1- Lissenzephalie Grad 2 dar. Der Kortex war verbreitert, eine Gyrierung der Großhirnoberfläche war fast komplett fehlend. Trotz der relativ geringen Menge an weißer Substanz, gab es keinen Hinweis auf eine Agenesie des Corpus callosum.

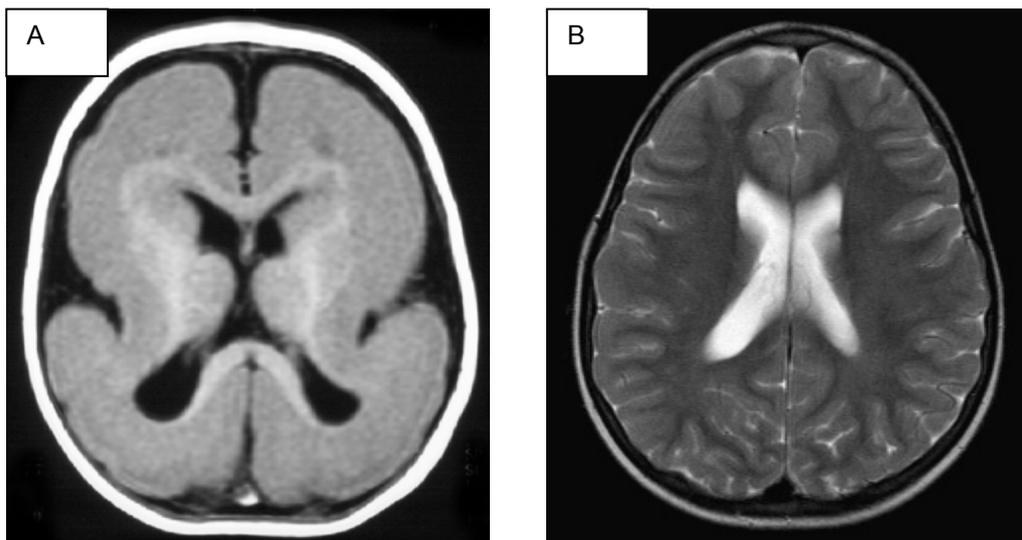


Abbildung 9 A T₁–MRT-Bild der Patientin D3133. B T₂–MRT-Bild einer Normalperson (2-jähriges Kind).

Der Patient **D3196** (*16.10.99) litt seit seinem dritten Lebensjahr an einer generalisierten Epilepsie mit Myoklonien jeden dritten bis vierten Tag. Auch aus dem Wachzustand traten Krampfanfälle auf. Die Epilepsie reagierte nur schlecht auf eine medikamentöse Therapie. Außerdem wurden vereinzelte Absenzen-ähnliche Zustände beschrieben. Im Alter von fünf Jahren zeigte der psychomotorisch retardierte Patient folgendes Bild: Laufen an der Hand war möglich, er konnte selbständig essen, sprach aber nur sechs bis zehn Wörter, er saß stabil, griff gezielt und nahm seine Umwelt wahr. Es bestand ein leicht hypotoner Muskeltonus. Die Bildgebung zeigte eine Gyrierungsstörung im Sinne einer Pachygyrie, ein verdicktes Rindenband im Parietal- und Okzipitallappen, in geringerem Ausmaß auch im

Temporal- und Frontallappen. Im parietookzipitalem Marklager ließen sich bandförmige periventrikuläre Heterotopien darstellen. Wegen der periventrikulären Heterotopien wurden die Exone des Filamin 1 (*FLNA*) Gens, in denen schon Mutationen beobachtet worden waren untersucht, es wurde keine Mutation gefunden. Die Untersuchung mittels FISH mit der *LIS1*-Sonde blieb unauffällig.

Patientin **D3234** (*15.11.97) stammt aus Saudi-Arabien. Seit dem 15. Lebensmonat sind bei ihr Krampfanfälle und eine Entwicklungsretardierung bekannt. Im Alter von fast fünf Jahren zeigte ein MRT des Schädels Band-Heterotopien, die supratentoriell in allen Lappen nachweisbar, jedoch fronto-basal am geringsten ausgeprägt waren. Es lag keine Gyrierungsstörung vor, Kleinhirn, Hirnstamm und Liquorräume stellten sich regelrecht dar. Die Balkenanlage war kräftig.

Wegen der zunehmenden Anfallshäufigkeit der schwer mental retardierten Patientin **D3242** (*14.04.1936) wurde im Alter von 65 Jahren ein CT des Schädels angefertigt (Abbildung 10A). Dieses zeigte zur Überraschung aller (man hatte Gehirnmetastasen eines bekannten Primärtumors erwartet) einen verdickten Kortex und eine reduzierte Anzahl Gyri.

Schon seit dem neunten Lebensjahr litt die Patientin unter generalisierten tonisch-klonischen Krampfanfällen. Diese blieben immer schwer medikamentös zu therapieren. Eine Schwester (D3429) leidet unter leichter mentaler Retardierung.

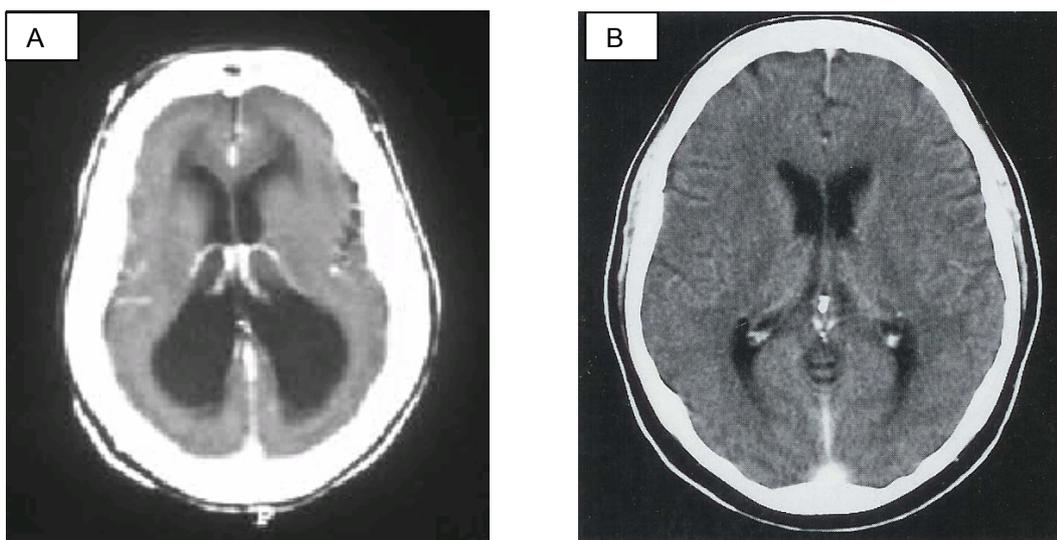


Abbildung 10 A zeigt ein CCT-Bild der Patientin D3242. B CCT einer Normalperson (Hofer 2000).

4.2 Ergebnisse der Mutationsanalyse durch direkte DNA-Sequenzierung

Um das *LIS1*-Gen auf Mutationen zu untersuchen etablierte ich für alle kodierenden Exone (Exone 2 bis 11) und ihre flankierenden Intronsequenzen spezifische PCR-Reaktionen. Dazu wurden die bei Pilz *et al.* (1998) beschriebenen Primer verwendet. Nach einem Aufreinigungsschritt wurden die PCR-Produkte unter Verwendung eines Sequenzierungskits (siehe Material und Methoden) mit fluoreszenzmarkierten dNTPs sequenziert. Mit Hilfe dieser Methode und dem Vergleich mit Normalsequenzen lassen sich Basenaustausche, kleinere Deletionen oder Insertionen darstellen. Tabelle 10 zeigt die Sequenzveränderungen, die ich bei den von mir untersuchten Patienten feststellte. Die Nummerierung der cDNA basiert auf der GenBank Zugangsnummer U72333 (<http://archive.uwcm.ac.uk/uwcm/mg/cdna>) Translationsbeginn A des ATG=Nr.1).

Zur Untersuchung des *DCX*-Gens konnte ich bereits etablierte Bedingungen nutzen. Analog zu den Arbeitsgängen für das *LIS1*-Gen, wurden die Proben auf die Analyse im Sequenzer vorbereitet. Bei den Patienten D3196, D3234 und D3242 wurden alle kodierende Exone samt der flankierenden Intronsequenz amplifiziert und analysiert. Tabelle 11 zeigt alle Basenaustausche, die durch die direkten Sequenzierung des *DCX*-Gens auffielen.

Im menschlichen Erbgut kommen multiple Allele als stabile Bestandteile der Population vor, diese nennt man bei einer jeweiligen Frequenz von mehr als 1% Polymorphismus (Lewin 1998b). Deswegen muss zwischen krankheitsauslösenden Basenaustauschen und in aller Regel funktionell unbedeutenden Polymorphismen unterschieden werden. Zur genauen Klärung dieser Frage, musste ich für die durch direkte Sequenzierung gefundenen Basenaustausche weitere Assays entwickeln.

Tabelle 10

Ergebnisse der direkten Sequenzierung des *LIS1*-Gens bei Patienten. Mögliche Mutationen sind rot hervorgehoben. N = Normalsequenz

<i>LIS1</i> -Gen	Ex 2 c.1-32	Ex 3 c.33-117	Ex 4 c.118-192	Ex 5 c.193-399	Ex 6 c.400-568	Ex 7 c.569-670	Ex 8 c.672-900	Ex 9 c.901-1002	Ex 10 c.1003-1159	Ex 11 c.1160-1233
D2946	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D2947	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D2954	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
D2981	N	N	N	N	N	N	N	N	N	c.1233 +17C>T
D3000	N	N	N	N	c.568+27 T>C	N	N	N	N	N
D3050	N	c.33 -38 G>A	c.118 -14 T>C	N	c.568+27 T>C	N	c.672 -10 A>C	N	N	N
D3077	N	N	N	N	N	N	N	N	c.1050delG p.K351SfsX354	N
D3097	N	N	N	N	c.568+27 T>C	N	N	N	N	N
D3133	N	N	N	N	N	N	N	N	N	c.1197C>A p.S399R
D3196	N	N	N	N	c.568+27 T>C	N	N	N	N	c.1233 +17C>T

Tabelle 11

Ergebnisse der direkten Sequenzierung des *DCX*-Gens bei Patienten.

<i>DCX</i> -Gen	♂/♀	Ex 3 c.1-42	Ex 4 c.43-406	Ex 5 c.407-747	Ex 6 c.748-850	Ex 7 c.851-973	Ex 8 c.974-1068	Ex 9 c.1069-1125
D3196	♂	N	N	N	N	N	N	N
D3234	♀	N	N	N	N	N	N	N
D3242	♀	N	c.236C>G p.T88R	N	N	N	N	N
D3429	♀	-	N	-	-	-	-	-

4.2.1 Mutationen im *LIS1*-Gen

4.2.1.1 Mutation c.1197C >A (p.S399R) bei Patientin D3133

Bei der Patientin D3133 wurde im Exon 11 des *LIS1*-Gens ein heterozygoter C zu A Basenaustausch im Codon 399 (c.1197C>A) gefunden (Abbildung 11). Das Codon 399 befindet sich im siebten WD-Repeat. Der Basenaustausch bedingt den Austausch der polaren Aminosäure Serin zur basischen Aminosäure Arginin (S399R). Da diese Basenvariante nicht in der Literatur beschrieben ist, wurden auch beide Eltern der Patientin untersucht. Die Mutation wurde bei den Eltern der Patientin nicht gefunden.

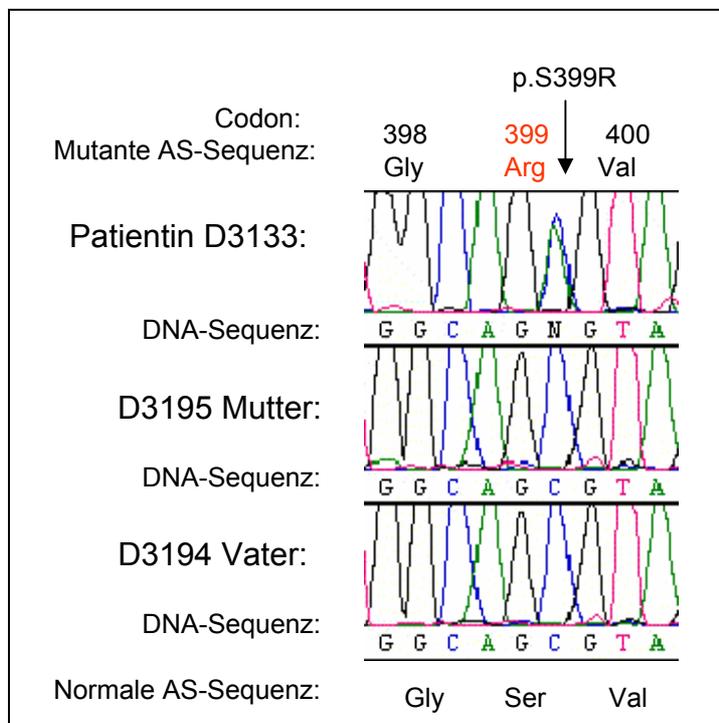


Abbildung 11 c.1197C>A Mutation der Patientin D3133. Ihre Eltern weisen den Basenaustausch nicht auf.

Um zu klären, ob die C zu A Basenänderung an Position 1197 der cDNA eine Mutation und kein Polymorphismus ist, wurden 50 gesunde Kontrollpersonen (24 weibliche und 26 männliche) mit Hilfe des dafür etablierten Restriktionsverdau untersucht. Das Restriktionsenzym *TseI* hat die Erkennungssequenz **5'G*CA/TGC 3'**. Im PCR-Produkt (Exon 11) einer Normalperson schneidet es einmal, und führt so zu zwei Fragmenten: 97 bp und 101 bp (Abbildung 12). Diese beiden Fragmente erscheinen im Agarosegelbild als

eine Bande (Abbildung 13 Spuren 3-6). Bei der Patientin fällt durch den Basenaustausch an Position 106 des PCR-Produkts auf einem Allel die Schnittstelle weg. Deswegen zeigt sich bei der Patientin ein heterozygotes Bild mit zwei Banden in der Gelelektrophorese (Abbildung 13 Spur 2): das nicht geschnittene Allel auf Höhe des PCR-Produkts bei 198bp und das Normalallel mit seinen zwei Fragmenten bei 101/97bp.

Bei keinem der 50 Personen konnte im Bild der Gelelektrophorese eine Doppelbande als Zeichen des Basenaustauschs gezeigt werden. Es handelt sich also aller Wahrscheinlichkeit nach nicht um einen Polymorphismus. Da die Eltern die Mutation nicht aufweisen, handelt es sich vermutlich um eine *de novo* Mutation. Bisher wurde nur eine weitere Punktmutation näher am 3' Ende des *LIS1*-Gens gelegen gefunden (Uyanik *et al.* in prep.).

Exon 11 Amplikon

Kontrollperson
GGTCTCACTATGTTTGTGTCAGGCTTACGTGTGAGTTTTAAATAAACCATTTCTTTTTCTTTCAGA
TTTCCACAAGACGGCACCCATATGTCGTCAGTG***CAGC**GTAGATCAAACAGTAAAAGTGTGGGAGT
GCCGTTGATTGTGTCTCCTTCGGCCCCCTCCTCCCTCTTTTCTCTGGATGCACTCTGATGATACC
(198bp)
Verdau mit *TseI*: 2 Fragmente: **97bp, 101bp**

Heterozygote Patientin D3133
GGTCTCACTATGTTTGTGTCAGGCTTACGTGTGAGTTTTAAATAAACCATTTCTTTTTCTTTCAGA
TTTCCACAAGACGGCACCCATATGTCGTCAGT**G**CAG**A**GTAGATCAAACAGTAAAAGTGTGGGAGT
GCCGTTGATTGTGTCTCCTTCGGCCCCCTCCTCCCTCTTTTCTCTGGATGCACTCTGATGATACC
Verdau mit *TseI*: 3 Fragmente: **97bp, 101bp, 198bp**

Abbildung 12 Fragmententstehung bei Verdau mit *TseI*. Die Erkennungssequenz für *TseI* ist unterstrichen, die Schnittstelle mit einem Stern markiert. Da die Patientin heterozygot ist, fällt die Schnittstelle auf Grund der Mutation auf einem Allel weg.

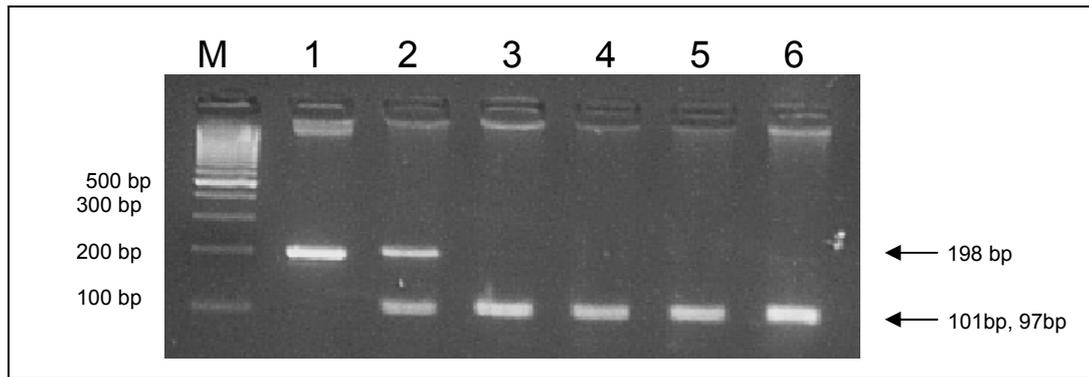


Abbildung 13 3% Nusieve-LE-Agarosegel des *TseI*-Verdau.

M: 100bp Marker **1:** unverdautes PCR-Produkt (Exon 11 des *LIS1*-Gens)(198bp) **2:** Patientin D3133 (heterozygot) **3:** männliche Kontrolle **4-6:** weibliche Kontrollen. Bei der heterozygoten Patientin fällt durch die Mutation eine Schnittstelle für *TseI* weg.

4.2.1.2 Mutation c.1050delG bei Patientin D3077

Im Fall D3077 konnte im Exon 10 des *LIS1*-Gens durch Sequenzierung eine heterozygote Deletion eines Guanins an Position 1050 der cDNA detektiert werden (c.1050delG) (Abbildung 14). Daraus resultierte ein Frameshift ab dem Codon 351 und führte zu einem Stop-Codon an Position 354 (p.Lys351SerfsX354). Diese Mutation führt zu einem unvollständigen LIS1-Protein, das im sechsten WD-Repeat unterbrochen ist. Die untersuchten Eltern zeigten keinerlei Auffälligkeiten an der betreffenden Stelle. Die Mutation ist also *de novo*.

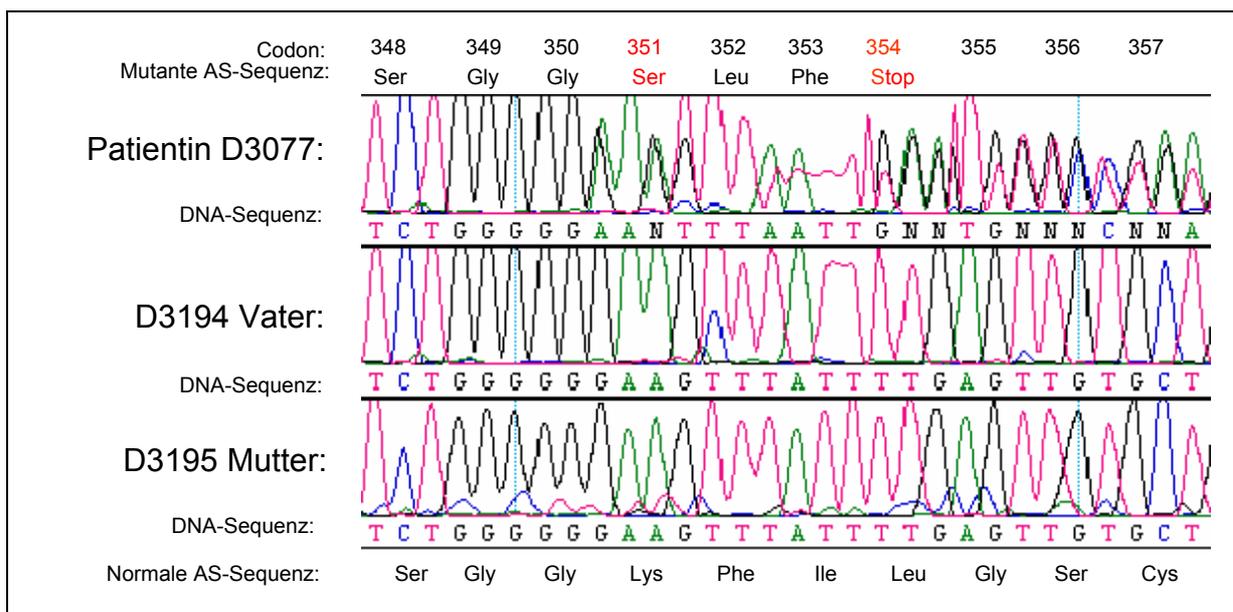


Abbildung 14 p.Lys351SerfsX354 (c.1050delG) Mutation der Patientin D3077. Beide Eltern zeigen diese Veränderung nicht.

4.2.2 Mutationen im *DCX*-Gen

4.2.2.1 Mutation c.236C>G bei Patientin D3242

Bei der Patientin D3242 fiel im Exon 4 des *DCX*-Gens ein C zu G Basenaustausch an Position 236 auf (Abbildung 15). Das führt im 88. Codon zur Änderung der polaren Aminosäure Threonin zur basischen Aminosäure Arginin (p.T88R). Da die Eltern der Patientin bereits verstorben waren, konnte keine Untersuchung ihrer DNA vorgenommen werden. Auf Grund der leichtgradigen geistigen Behinderung der Schwester der Patientin wurde auch deren DNA untersucht. Die Mutation wurde bei der Schwester der Patientin nicht gefunden.

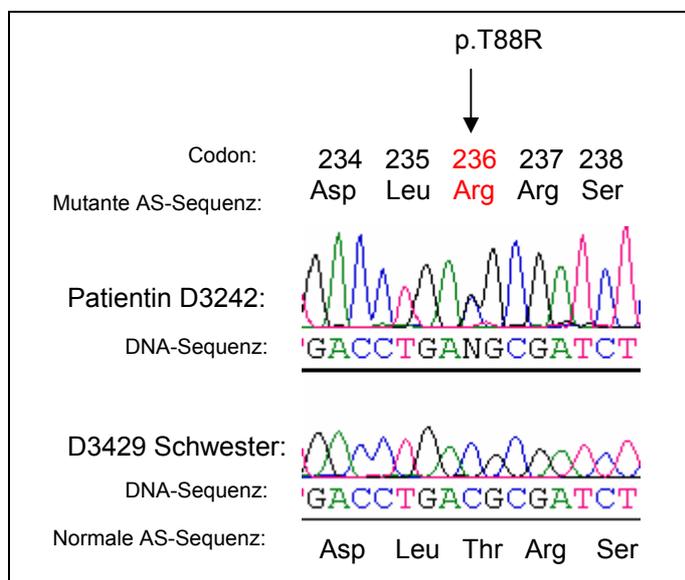


Abbildung 15 Mutation c.236C>G der Patientin D3242. Dies führt zu einer Änderung der Aminosäuresequenz von Threonin zu Arginin. Die DNA ihrer Schwester weist die Normalsequenz auf.

Um zu klären, ob die C zu G Basenänderung an Position 236 der cDNA eine Mutation und kein Polymorphismus ist, wurden 101 Chromosomen (49 gesunde männliche und 26 gesunde weibliche Kontrollpersonen) auf diesen Basenaustausch untersucht. Hierzu etablierte ich einen Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym *DdeI*. *DdeI* hat die Erkennungssequenz **5' C*TNAG 3'**, und schneidet das Amplikon (Exon 4) einer Normalpersonen vier mal (Abbildung 16). Es entstehen Fragmente der Größe 9bp, 27bp, 123bp, 153bp und 157bp. Bei der Patientin entsteht durch die Mutation eine zusätzliche Schnittstelle, das Enzym schneidet fünf mal. Die Fragmente haben die Größe 9bp, 27bp, 34bp, 123bp (2X), 153bp.

Im Bild der Gelelektrophorese können bei Normalpersonen drei Banden (27bp, 123bp, 153bp/157bp) unterschieden werden (Abbildung 17 Spur 3). Im 3%igen Agarosegel erscheinen die Fragmente 153bp und 157bp als eine Bande, das Fragment mit 9bp bildet sich nicht ab. Die Patientin zeigt außerdem zusätzlich ein 34bp Fragment als spezifischen Unterschied (Abbildung 17 Spur 2).

Keine der Kontrollpersonen zeigte die Bande der Größe 34bp, das heißt, dass bei keiner der Kontrollpersonen die zusätzliche Schnittstelle durch den Basenaustausch c.305C>G vorkommt. Da diese Sequenzvarianz außerdem zu einem Aminosäureaustausch führt, handelt es sich bei p.T88R vermutlich um eine krankheitsverursachende Genveränderung. Ob diese aber *de novo* aufgetreten ist, lässt sich durch den Tod der Eltern nicht mehr klären.

Exon 4 Amplikon

Kontrollperson

CTTCACCCCATCCCTTTCTCCCACGC***TCAG**GTCTC***TGAG**GTTCCACCAAAATATGGAACCTGATTTTGGACACTTTGACGAAA
GAGATAAGACATCCAGGAACATGCGAGGCTCCCGGATGAATGGGTTGCCTAGCCCCACTCACAGCGCCCACTGTAGCTTCTAC
CGAACCCAGAACCTTGCAGGCAC***TCAG**TAATGAGAAGAAAACCAAGAAGGTACGTTTCTACCGCAATGGGGACCGCTACTTCAA
GGGGATTGTGTACGCTGTGTCTCTGACCGTTTTTCGCAGCTTTGACGCCTTGCTGGCTGACCTGACCGGATCTCTGTCTGACAA
CATCAACCTGCC***TCAG**GGAGTGCGTTACATTTACACCATTGATGGATCCAGGAAGATCGGAAGCATGGATGAACCTGGAGGAAG
GTAATTTAAATAGTGGGTGGTGGCCGTTGGTGGGAGGTGGCATCATTGGTTA (469 bp)

Verdau mit *DdeI*: 5 Fragmente der Größe: **9bp, 27bp, 123bp, 153bp, 157bp**

Heterozygote Patientin

CTTCACCCCATCCCTTTCTCCCACGC***TCAG**GTCTC***TGAG**GTTCCACCAAAATATGGAACCTGATTTTGGACACTTTGACGAAA
GAGATAAGACATCCAGGAACATGCGAGGCTCCCGGATGAATGGGTTGCCTAGCCCCACTCACAGCGCCCACTGTAGCTTCTAC
CGAACCCAGAACCTTGCAGGCAC***TCAG**TAATGAGAAGAAAACCAAGAAGGTACGTTTCTACCGCAATGGGGACCGCTACTTCAA
GGGGATTGTGTACGCTGTGTCTCTGACCGTTTTTCGCAGCTTTGACGCCTTGCTGGCTGAC**C*TCAG**GCGATCTCTGTCTGACAA
CATCAACCTGCC***TCAG**GGAGTGCGTTACATTTACACCATTGATGGATCCAGGAAGATCGGAAGCATGGATGAACCTGGAGGAAG
GTAATTTAAATAGTGGGTGGTGGCCGTTGGTGGGAGGTGGCATCATTGGTTA

Verdau mit *DdeI*: 6 Fragmente: **9bp, 27bp, 34bp, 123bp (2X), 153bp**

Abbildung 16 Fragmente, die durch einen Verdau des Exon 4 PCR-Produkts mit *DdeI* entstehen. *DdeI* hat die Erkennungssequenz C*TNAG, sie ist jeweils unterstrichen, die Schnittstelle mit einem Stern markiert.

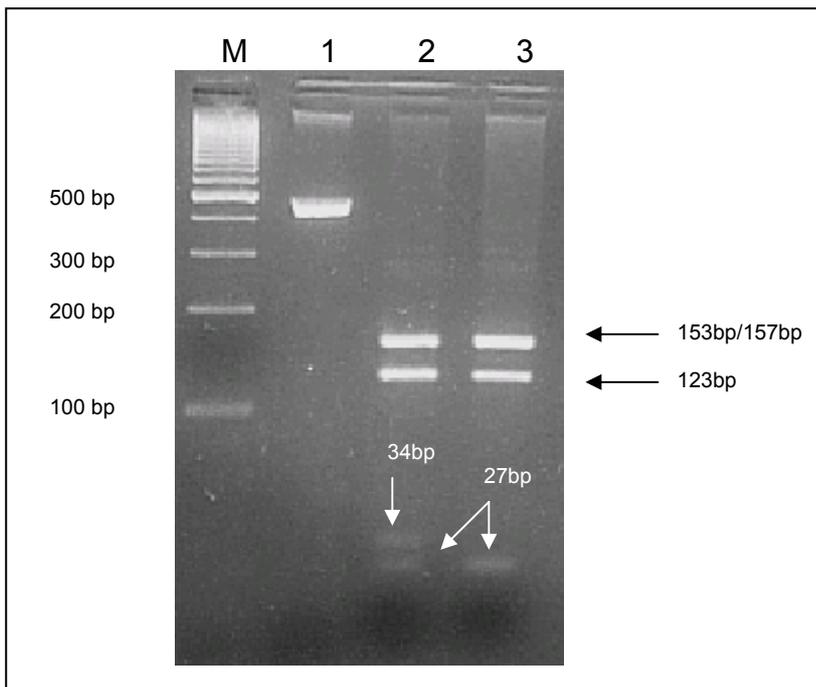


Abbildung 17 Restriktionsverdau mit *DdeI* nach Auftrennung in 3%-Agarose. **M**: 100bp Marker
1: unverdautes PCR-Produkt (Exon 4 des *DCX*-Gens) (469bp) **2**: Patientin D3242 **3**: Kontrollperson

4.2.3 Polymorphismen im *LIS1*-Gen

4.2.3.1 c.568+27T>C

Der bekannte Polymorphismus c.568+27T>C im Intron 6 des *LIS1*-Gens (Cardoso *et al.* 2002) fiel bei vier Patienten-Proben (D3000 (♂), D3050 (♂), D3196 (♂) und D3097 (♂)) auf (Abbildung 18). Cardoso *et al.* (2002) schätzte die Häufigkeit dieses Polymorphismus auf circa 1,5%, anhand der von mir gefundenen Häufigkeit bei Patienten, lässt sich jedoch eine deutlich höhere Frequenz von annähernd 40% vermuten.

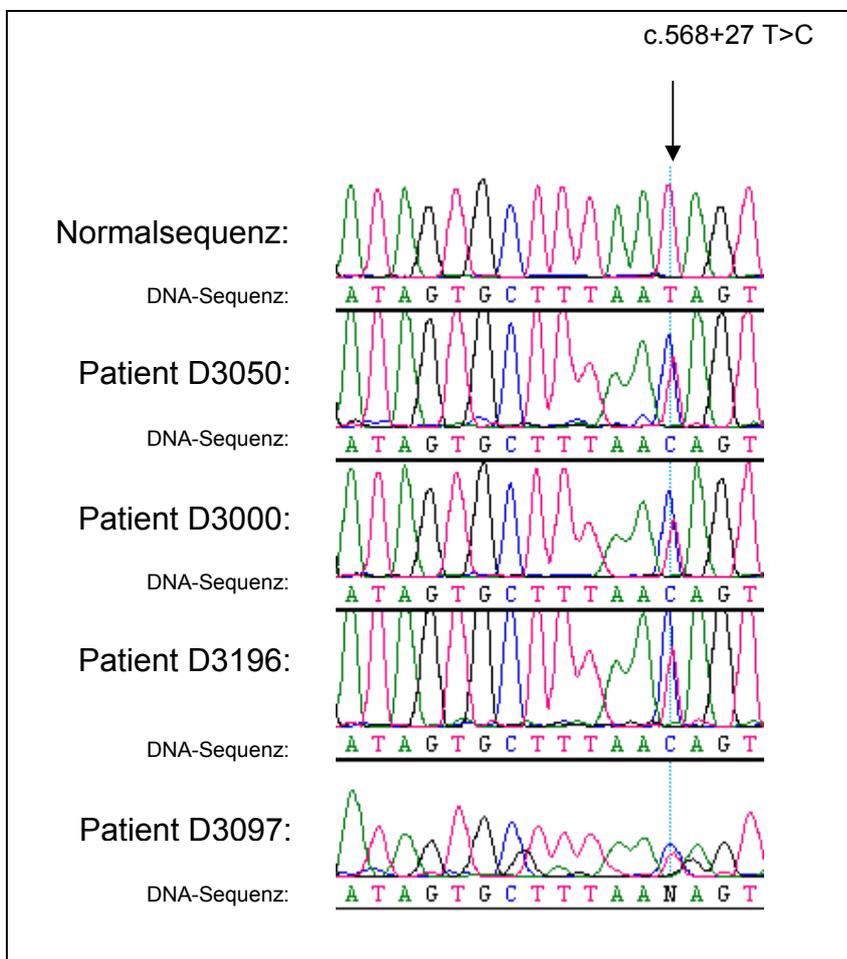


Abbildung 18 Ausschnitt der Intron 6 Sequenz. Die Patienten sind heterozygot an Position 568+27.

4.2.3.2 c.1233+17 C>T

Ein weiterer Basenaustausch zeigte sich in der DNA auf einem Allel der Patienten D2981(♂) und D3196(♂). Im 3'UTR Bereich des *LIS1*-Gens fand ich an Position c.1233+17 der cDNA einen C zu T Austausch (Abbildung 19). Diese Basenvariation wurde bereits als Polymorphismus identifiziert und publiziert (Cardoso *et al.* 2002). Die Häufigkeit wird auf circa 40% geschätzt (Cardoso *et al.* 2002).

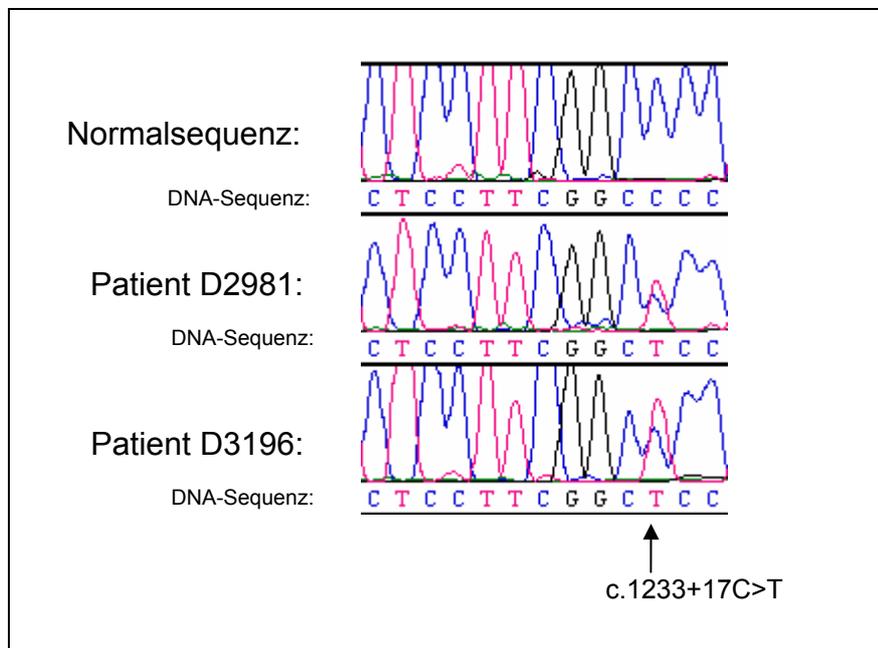


Abbildung 19 Ausschnitt aus der 3'UTR Region des *LIS1*-Gens. An Position c.1233+17 der cDNA findet sich ein C>T Basenaustausch. Beide Patienten sind heterozygot.

4.2.4 Neue Polymorphismen im *LIS1*-Gen – Der Fall D3050

In besonderem Maße interessant ist der Fall D3050. Es fand sich sowohl der oben erwähnte Polymorphismus c.568+27T>C als auch drei weitere heterozygote Basenaustausche im *LIS1*-Gen.

> Im Intron 2 auf Position –38 vor Beginn des Exons 3 ein G>A (c.33 -38G>A; Abb. 20,

> im Intron 3 auf Position –14 vor Beginn des Exons 4 ein T>C (c.118 -14T>C; Abb. 23),

> im Intron 7 auf Position –10 vor Beginn des Exons 8 ein A>C (c.672 –10A>C; Abb. 26).

Alle Basenaustausche konnten auch bei der heterozygoten Mutter nachgewiesen werden. Zur Untersuchung der drei Veränderungen entwickelte ich zwei Assays mit Restriktionsenzymen und eine allelspezifische PCR. Aus Mangel an Patienten-DNA wurden für diese Untersuchungen mütterliche DNA verwendet. Da eine mütterliche Erkrankung nicht bekannt ist, erwarteten wir, dass es sich bei den oben erwähnten Basenaustauschen um Polymorphismen handelte. Auf Grund der Namensgebung der Familie schien es wahrscheinlich, dass sie spanischer Herkunft waren. Weder im nordwesteuropäischen Kontrollkollektiv (24 weibliche, 26 männliche gesunde Kontrollen) noch im spanischen Kontrollkollektiv konnten die oben genannten Basenaustausche nachgewiesen werden.

Basenaustausch –38 vor Beginn des 3. Exon (c.33 –38G>A)

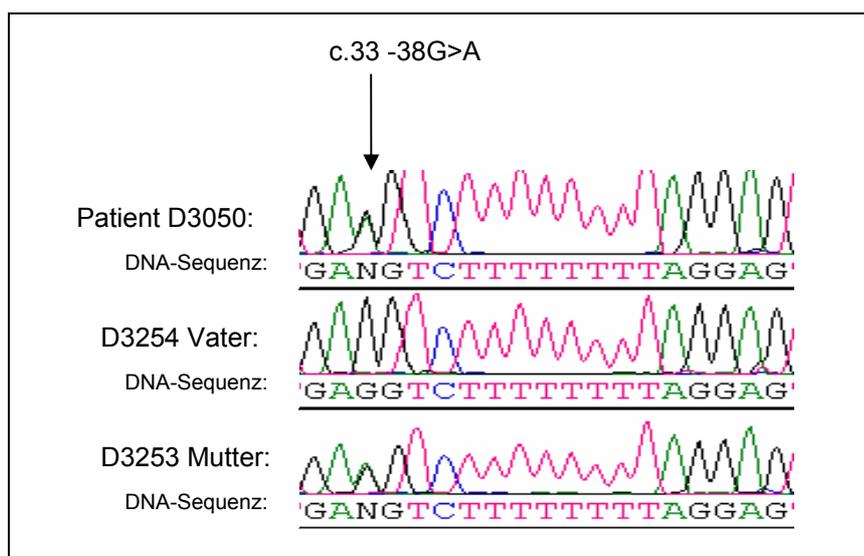


Abbildung 20 Basenaustausch 33 –38G>A. Sowohl die Mutter als auch der Patient D3050 sind heterozygot für diese Position. Der Vater zeigt die Normalsequenz.

Um die Möglichkeit eines Polymorphismus im Intron 2 des *LIS1*-Gens (D3050) an Position –38 vor Beginn des Exon 3 zu untersuchen, wurden 50 DNA-Kontrollproben nordwesteuropäischer Herkunft mit Hilfe eines dafür etablierten Restriktionsenzym-Assay überprüft. Zusätzlich zu den nordwesteuropäischen Kontrollpersonen wurden auch 50 spanische DNA-Kontrollproben untersucht.

Das Restriktionsenzym *MnII* hat die Erkennungssequenz **5`*(N)₆GAGG`3**. Im PCR-Produkt (Exon 3) einer Normalperson schneidet *MnII* zweimal, und führt zu 3 Fragmenten (53bp, 83bp, 129bp) (Abbildung 21). Beim heterozygoten Patienten fällt auf einem Allel an Position 53 des Amplikons die zweite Schnittstelle weg, deswegen entsteht ein zusätzliches Fragment der Größe 136bp und Fragmente der Größe 53bp und 83bp in halber Dosis.

Beim Patienten sind die Banden bei 53bp, 83bp und 129bp nur sehr schwach, die Bande bei 136bp kräftig (Abbildung 22). Doch zusätzlich zu dem erwarteten Banden zeigen sowohl die Kontrollen, als auch der Patient eine Bande zwischen 150bp und 200bp. Dies hängt vermutlich mit einer unvollständigen Restriktion des PCR-Produkts trotz mehrfach variiertes Enzymmenge zusammen.

Bei keiner der Kontrollpersonen zeigte sich ein Intensitätsmuster wie beim Patienten. Daraus schließe ich, dass die Sequenzvarianz des Patienten einen Unterschied im Verdauverhalten bewirkt, den keine der Kontrollen nachvollzieht. Keine der DNA-Kontroll-Sequenzen stimmt mit der Patientensequenz überein.

Exon 3 PCR-Produkt

Kontrollperson
AAGAGTATCTTCAGGGTTAATGAGATTTTAAATAAATTCTATTTCTTCAGAAAT***AGAAATGAGG**TCTTTTTTTTAGGAGTC
ATTTGAATTTTTCTTCAGAAATCGAGCTATAGCAGATTATCTTCGTTCAAATGG**C*TATGAAGAGG**CATATTCAGTTTTT
AAAAAGGAAGCTGAATTAGATGTGGTATGTTTTACTTTTTACAATTCAAAGTATAGTTAATGAGTGGATTTTCACTCAAGT
ATCTGTAGTTAACAGTTACGCACA (266bp)

Nach Verdau *MnII*: 3 Fragmente: **53bp, 83bp, 129bp**

Heterozygoter Patient D3050
AAGAGTATCTTCAGGGTTAATGAGATTTTAAATAAATTCTATTTCTTCAGAA**TAGAAATGAAG**TCTTTTTTTTAGGAGTC
ATTTGAATTTTTCTTCAGAAATCGAGCTATAGCAGATTATCTTCGTTCAAATGG**C*TATGAAGAGG**CATATTCAGTTTTT
AAAAAGGAAGCTGAATTAGATGTGGTATGTTTTACTTTTTACAATTCAAAGTATAGTTAATGAGTGGATTTTCACTCAAGT
ATCTGTAGTTAACAGTTACGCACA

Nach Verdau *MnII*: 4 Fragmente: **53bp, 83bp, 129bp, 136bp**

Abbildung 21 Fragmentlängen, die bei Verdau mit *MnII* entstehen. Die Erkennungssequenz des Restriktionsenzym *MnII* ist unterstrichen, die Schnittstellen sind jeweils durch einen Stern gekennzeichnet.

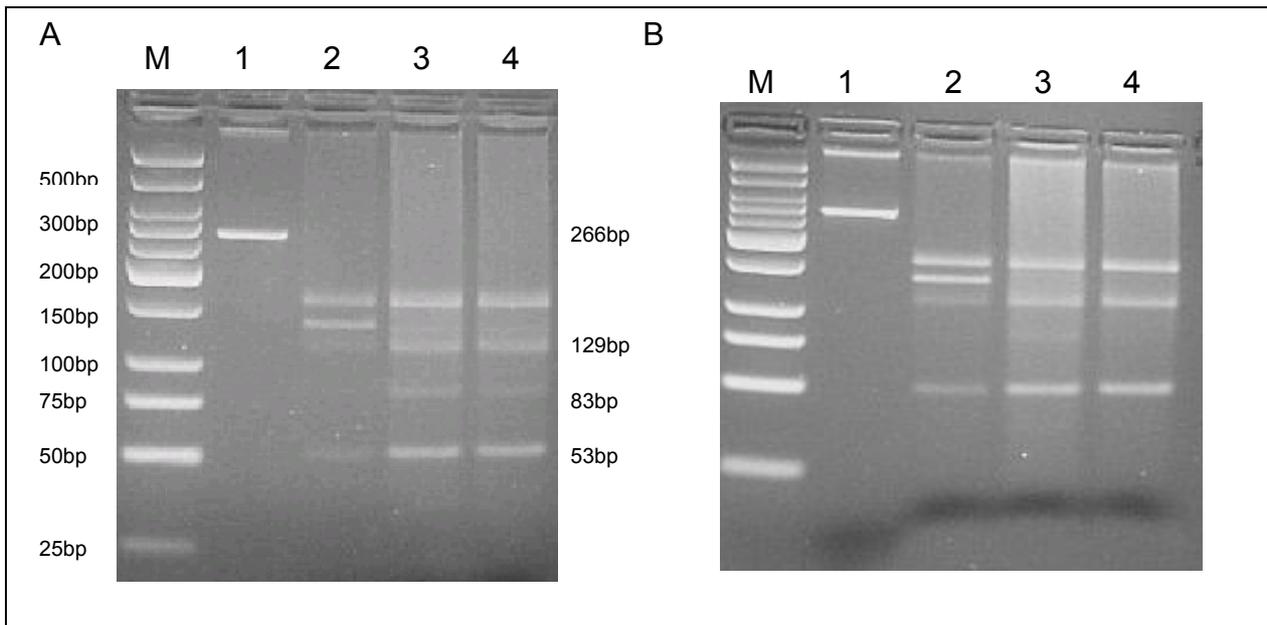


Abbildung 22 A und B zeigen die Gelelektrophorese nach Verdau mit *MnlI*. In A sind die Banden bei 83bp deutlicher zu erkennen, in B lässt sich der heterozygote Zustand des Patienten nachvollziehen. **M**: Low Molecular Weight DNA Marker 1: unverdautes PCR-Produkt (266bp) 2: heterozygoter Patient D3050 3-4: Kontrollpersonen.

Basenaustausch – 14 vor Beginn Exon 4 (c.118 –14 T>C)

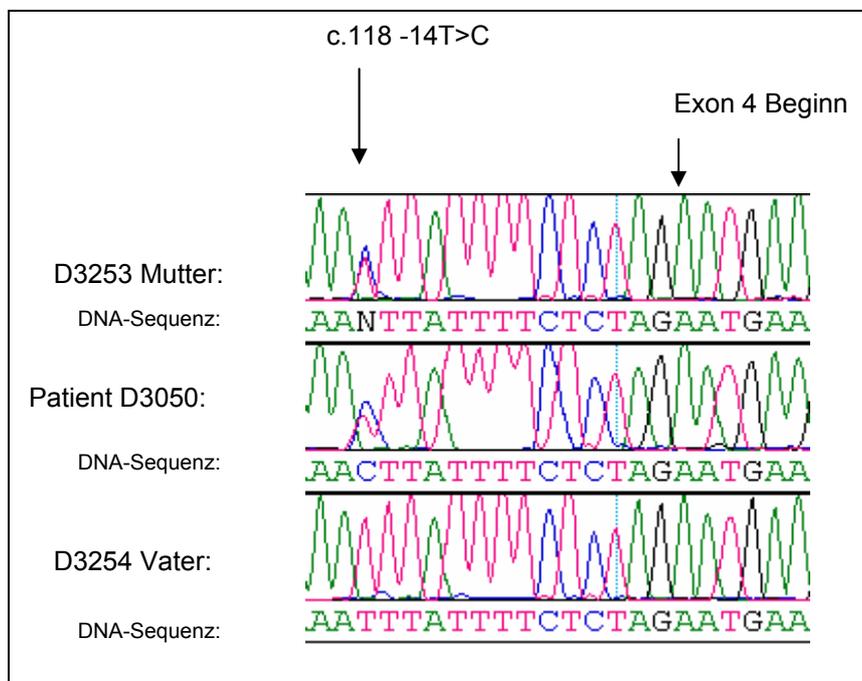


Abbildung 23 Heterozygoter T>C Basenaustausch bei Patient D3050 und seiner Mutter (D3253). Diese befindet sich 14 Basenpaare vor dem Beginn des vierten Exons des *LIS1*-Gens. Der Vater zeigt die Normalsequenz.

Um die Möglichkeit eines Polymorphismus in Intron 3 des *LIS1*-Gens (D3050) an Position -14 vor Beginn des Exon 4 zu untersuchen, wurden 50 DNA Kontrollproben nordwesteuropäischer Herkunft und 50 spanische DNA Kontrollproben mit dafür etablierten *ApoI* Restriktionsverdau überprüft.

ApoI hat die Erkennungssequenz **5'Pu*AATTPy`3**. Das Enzym schneidet das PCR-Produkt einer Normalperson zwei mal. Es können drei Fragmente der Größe 7 bp, 32bp, 165bp unterschieden werden (Abbildung 24). Im Agarosegelbild kann eine Bande mit 165bp nachgewiesen werden (Abbildung 25 Spuren 3-5).

Durch den Basenaustausch des Patienten an Position 42 des Amplikons fällt die zweite Schnittstelle auf einem Allel weg, es entsteht ein heterozygotes Bild. Zu den oben genannten Fragmenten kommt ein Fragment der Größe 172bp hinzu. Im Bild der Gelelektrophorese zeigt der Patient zwei Banden (165bp,172bp) (Abbildung 21B Spur 2).

Exon 4 PCR-Produkt

Kontrollperson
TCTTGAGGATCATAGTTAAGCCATTTTTAAA*AATTCTA*AATTTATTTTCTCTAGAATGAAGAATTAGAT
AAAAAGTATGCTGGTCTTTTGGAAAAAAATGGACATCTGTTATTAGATTACAAAAGAAGGTAAGTAACT
CTTTTTCTTTAAAATTAGTTGTATTCAGTTATATAAACTTTCTGAAAATAACATTCTTCTGCA (204bp)

Nach Verdau mit *ApoI*: 3 Fragmente: **32bp, 7bp, 165bp**

Heterozygoter Patient D3050
TCTTGAGGATCATAGTTAAGCCATTTTTAAA*AATTCAAACTTATTTTCTCTAGAATGAAGAA
TTAGATAAAAAGTATGCTGGTCTTTTGGAAAAAAATGGACATCTGTTATTAGATTACAAAAGA
AGGTAAGTAACTTTTCTTTAAAATTAGTTGTATTCAGTTATATAAACTTTCTGAAAATAACA
TTCTTCTGCA

Nach Verdau mit *ApoI*: 4 Fragmente: **32bp, 7bp, 165bp, 172bp.**

Abbildung 24 DNA-Sequenz des Exon 4 PCR-Produkts mit den *ApoI*-Schnittstellen. Die Erkennungssequenz für *ApoI* ist unterstrichen, die Schnittstellen sind mit einem Stern markiert. Beim heterozygoten Patient fällt auf Grund der Mutation auf einem Allel die 2.Schnittstelle weg.

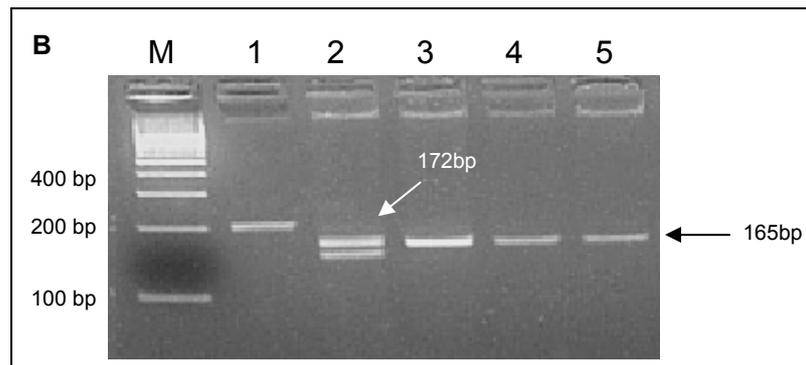


Abbildung 25 3% Nusieve-LE-Agarosegel des *ApoI*-Verdau.

M: 100bp Marker **1:** unvedautes PCR-Produkt (204bp) **2:** Patient D3050 (heterozygot) **3-6:** Kontrollen. Beim heterozygoten Patient fällt durch die Mutation eine Schnittstelle für *ApoI* weg.

Bei keiner der 100 Kontrollpersonen konnte eine Doppelbande im Gelbild gezeigt werden. Das heißt, dass bei keiner der Kontrollpersonen die Schnittstelle für *ApoI* auf einem Allel wegfällt. Im Umkehrschluss bedeutet das, dass bei keiner der Kontrollen der Basenaustausch –14 vor Beginn des Exon 4 vorgekommen ist.

Basenaustausch –10 vor Beginn des achten Exons (c.672 –10A>C)

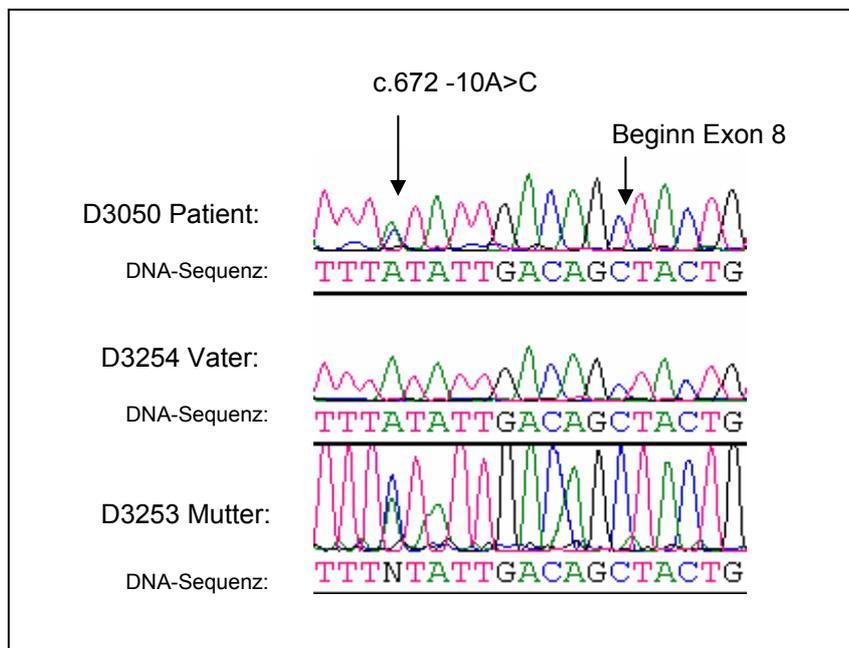


Abbildung 26 A zu C Basenaustausch beim heterozygoten Patienten D3050 und seiner heterozygoten Mutter. Diese befindet sich 10 Basenpaare vor dem Beginn des achten Exons des *LIS1*-Gens. Der Vater zeigt die Normalsequenz.

Um die Möglichkeit eines Polymorphismus in Intron 7 des *LIS1*-Gens (D3050) an Position –10 vor Beginn des Exon 8 zu untersuchen, wurden 50 DNA-Kontrollproben nordwesteuropäischer Herkunft und 50 spanische DNA-Kontrollproben mit der hierfür etablierten allelspezifischen PCR überprüft. Beim heterozygoten Patienten entstand sowohl mit dem Primer für das Normalallel (Exon 8FNor), als auch mit dem mutationsspezifischen Primer (Exon 8FMut) ein PCR-Produkt (Abbildung 27, 28). Bei den Kontrollpersonen kann nur mit dem Primer für das Normalallel ein Produkt entstehen. Keine der Kontrollpersonen zeigte ein Produkt mit dem mutationsspezifischen Primer, das heißt, dass dieser Basenaustausch bei 100 Kontrollpersonen nicht vorgekommen ist.

Allelspezifische PCR Normalperson Exon 8 Amplikon (303bp)

Exon 8FNor

CACAGTGTAAGTTATTATTTATATTGACAGTACTGTGTGAAGACATTACAGGA
CACAGAGAATGGGTACGTATGGTACGGCCAAATCAAGATGGCACTCTGATAG
CCAGCTGTTCCAATGACCAGACTGTGCGTGTATGGGTCGTAGCAACAAAGGA
ATGCAAGGCTGAGCTCCGAGAGCATGAGCATGTGGTAGAATGCATTTCTGG
GCTCCAGAAAGCTCATATTCCTCCATCTCTGAAGCAACAGGATCTGAGGACT
GTATATACAAATGTCTTCATGGTTTTATTGCTGATATCTG

Exon 8R

Allelspezifische PCR Patient D3050 Exon 8 Amplikon (303bp):

Exon 8FMut

CACAGTGTAAGTTATTATTT**C**TATTGACAGTACTGTGTGAAGACATTACAGGA
CACAGAGAATGGGTACGTATGGTACGGCCAAATCAAGATGGCACTCTGATAG
CCAGCTGTTCCAATGACCAGACTGTGCGTGTATGGGTCGTAGCAACAAAGGA
ATGCAAGGCTGAGCTCCGAGAGCATGAGCATGTGGTAGAATGCATTTCTGG
GCTCCAGAAAGCTCATATTCCTCCATCTCTGAAGCAACAGGATCTGAGGACT
GTATATACAAATGTCTTCATGGTTTTATTGCTGATATCTG

Exon 8R

Abbildung 27 DNA-Sequenz der allelspezifischen PCR bei einer Normalperson und dem Patienten D3050. Die Primersequenzen sind unterstrichen. Der Basenaustausch ist fett rot markiert.

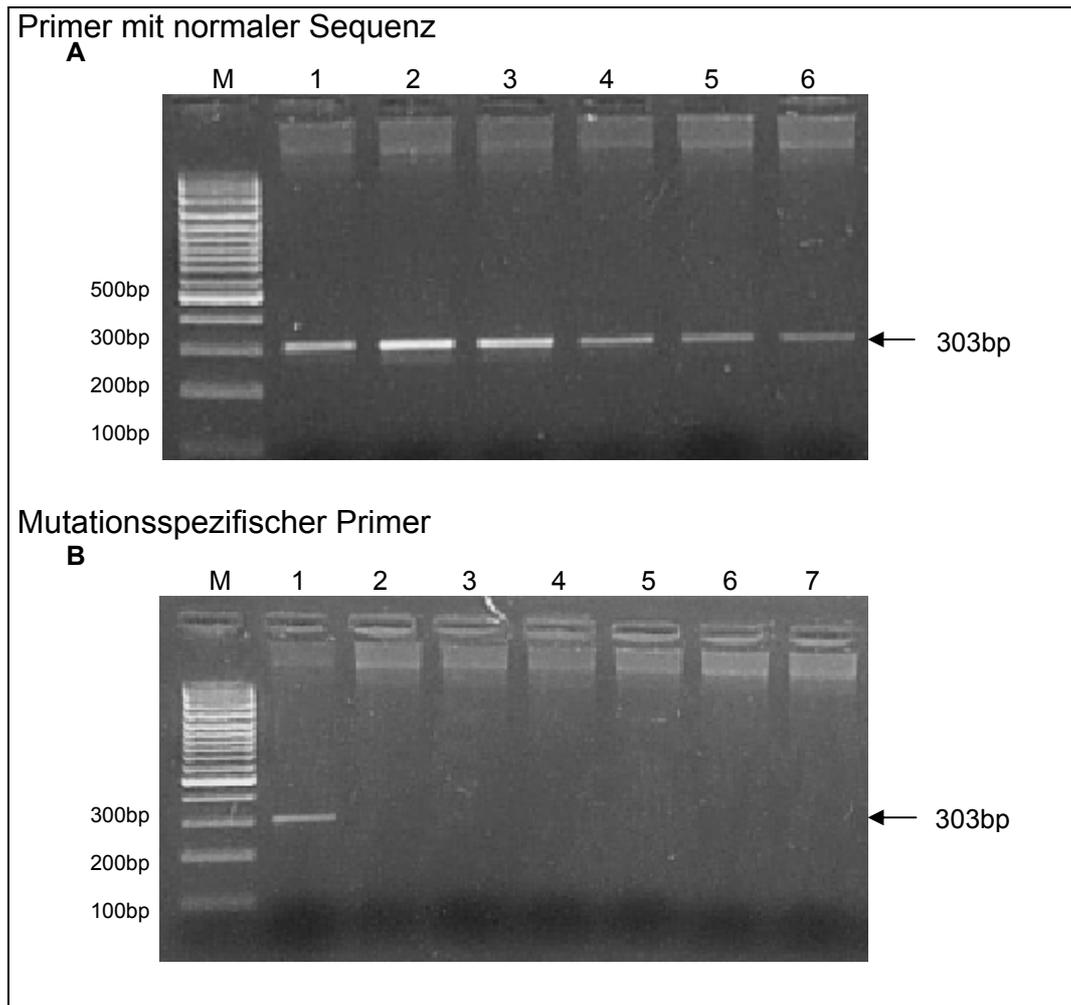


Abbildung 28 Gelelektrophorese-Bilder der allelspezifischen PCR.

A allelspezifische PCR mit Normalprimer. **M**: 100bp Marker **1**: Patient D3050 **2-6**: Kontrollpersonen

B allelspezifische PCR mit dem mutationsspezifischen Primer. Ein Produkt war nur beim Patient amplifizierbar. **M**: 100bp Marker **1**: Patient **2-7**: Kontrollpersonen

Auf Grund der Lokalisation des Basenaustausches kurz vor dem Beginn des Exons im Bereich der Spleißstelle, und, weil durch den A zu C Austausch die Übereinstimmung mit der Erkennungssequenz für eine Spleißstelle zunahm (Tabelle 12), haben wir diesen Basenaustausch noch eingehender untersucht. Obwohl ein detektierbarer Effekt nicht definitiv darstellbar ist, untersuchten wir, ob die Basenvariation zu einer Veränderung auf Ebene der RNA führte. Um dies zu untersuchen, extrahierte ich RNA aus Lymphozyten der Mutter des Patienten, die die gleiche Basenvariation trägt, stellte cDNA her, die das *LIS1*-Gen enthielt und führte eine PCR mit spezifischen Primern mit dieser cDNA durch. Im Anschluss daran habe ich das entstandene PCR-Produkt sequenziert.

Tabelle 12

Erkennungssequenz für Spleißstellen im Intron und die heterozygote Patienten-Sequenz. Der Basenaustausch des Patienten D3050 ist farblich markiert. Die Erkennungssequenz kann variieren, die vom Patienten abweichenden Basenpaare sind tiefgestellt.

Patient Allel 1	T T T A T A T T G A C A G
Normalallel	
Patient Allel 2	T T T C T A T T G A C A G
mit Austausch	
Spleißstellen-Erkennungssequenz	T _C T _C T _C C _T T _C C _T T _C T _C C _T N C A G

Im Bild der Sequenzierung zeigte sich eine regelrechte Abfolge der Exone sechs, sieben, acht und neun. Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass ein Allel auf Ebene der RNA (mit dem Basenaustausch) verändert gespleißt wurde. Der Basenaustausch –14 vor Beginn des achten Exons führte somit nicht zu einer mit dieser Methode nachweisbaren Variation im Spleißgeschehen (Abbildung 29). Mehr Informationen könnte allerdings die quantitative Darstellung des Spleiß- Produkts unter Differenzierung der beiden Allele liefern.

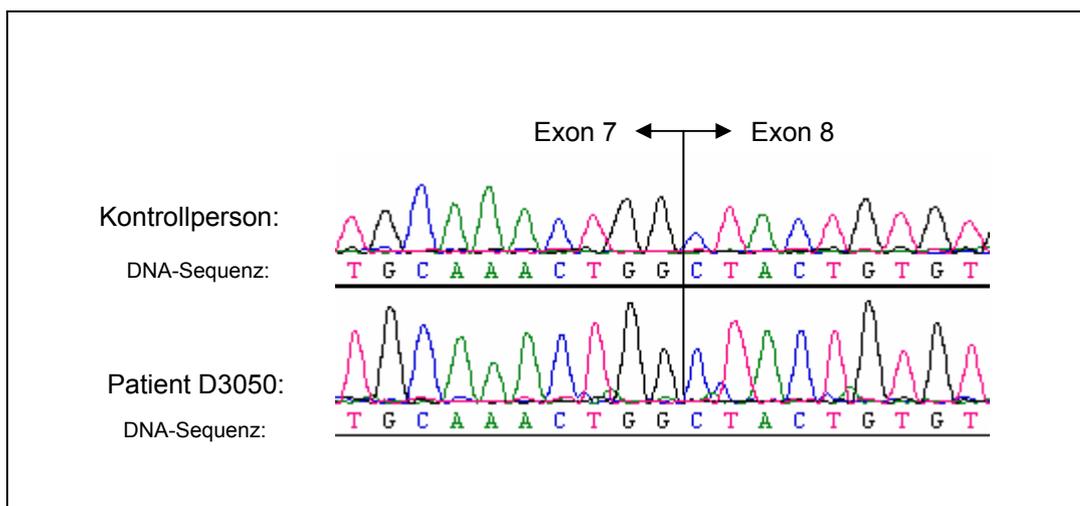


Abbildung 29 cDNA-Sequenz des Exon 7 - Exon 8 Übergangs. Es zeigt sich keine Auffälligkeit des Spleißgeschehens bei Patient D3050.

4.3 Southern Blot

Ein Drittel der bisher weltweit untersuchten Patienten zeigte größere Deletionen im *LIS1*-Gen (Lo Nigro *et al.* 1997). Größere Deletionen können nur mittels Southern Blot oder quantitativer PCR detektiert werden. Für die Proben D2946(♂), D2947(♀), D2954(♂), D3000 (♂), D3050(♂), D3097(♂), D3196(♂) und D3234(♀) bei denen bei der Sequenzierung der einzelnen Exone keinerlei krankheitsverursachende Auffälligkeiten gefunden wurden, konnten demnach größere Deletionen zum Beispiel ganzer Exone im *LIS1*-Gen und bei Frauen im *DCX*-Gen nicht ausgeschlossen werden. Zum Nachweis von Deletionen im *LIS1*- und *DCX*-Gen, wurde mit diesen Proben ein Southern Blot durchgeführt (Abbildung 30, 31, 32, 33). Hierfür wurde die Patienten-DNA mit drei verschiedenen Restriktionsenzymen (*Bam*HI, *Eco*RI, *Hind*III) gespalten.

Weder nach Hybridisierung mit der *LIS1*-Sonde noch nach Hybridisierung mit der *DCX*-Sonde, konnten Auffälligkeiten gefunden werden.

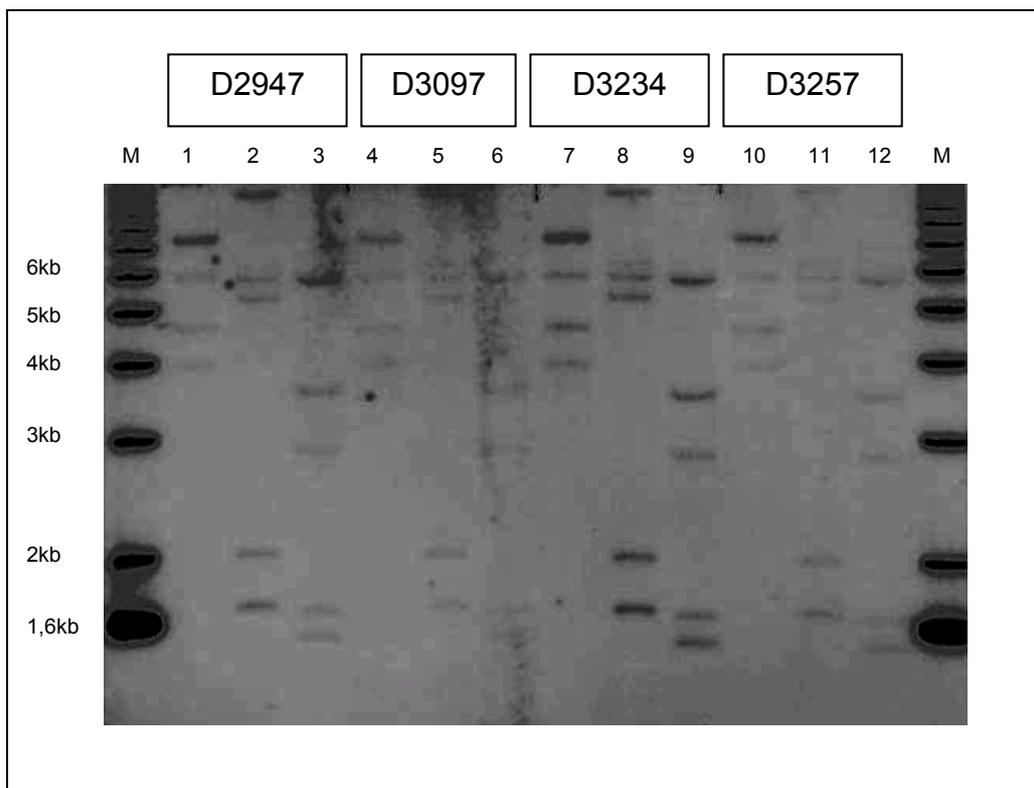


Abbildung 30 DCX-Blot 1. Nach Hybridisierung mit der *DCX*-Sonde M:1kb Leiter 1-3: D2947 4-6: D3097 7-9: D3234 10-12: D3257
Enzymverteilung: 1,4,7,10: *Bam*HI 2,5,8,11: *Eco*RI 3,6,9,12: *Hind*III

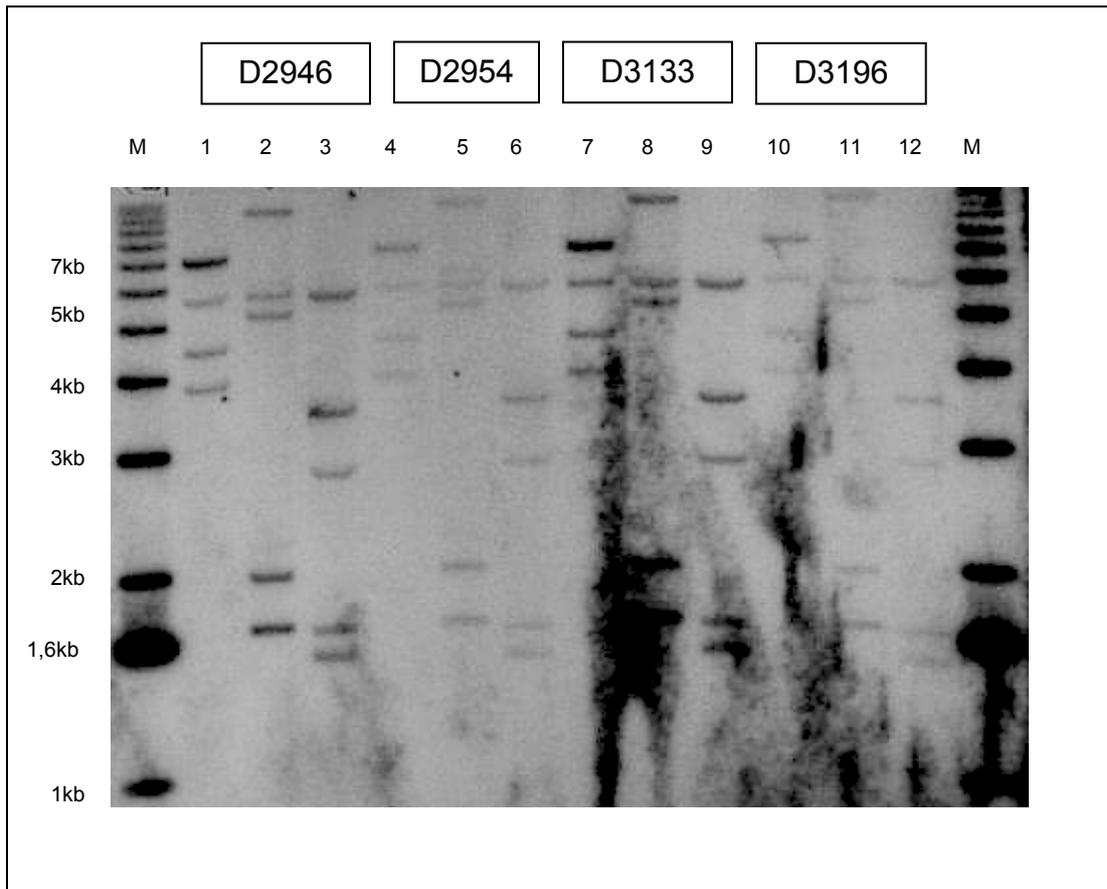


Abbildung 31 DCX-Blot 2. Nach Hybridisierung mit der DCX-Sonde -10 Tage exponiert. M:1kb Leiter 1-3: D2946 4-6 : D2954 7-9 D3133 10-12: D3196 Enzymverteilung: 1,4,7,10: *BamHI* 2,5,8,11: *EcoRI* 3,6,9,12: *HindIII*

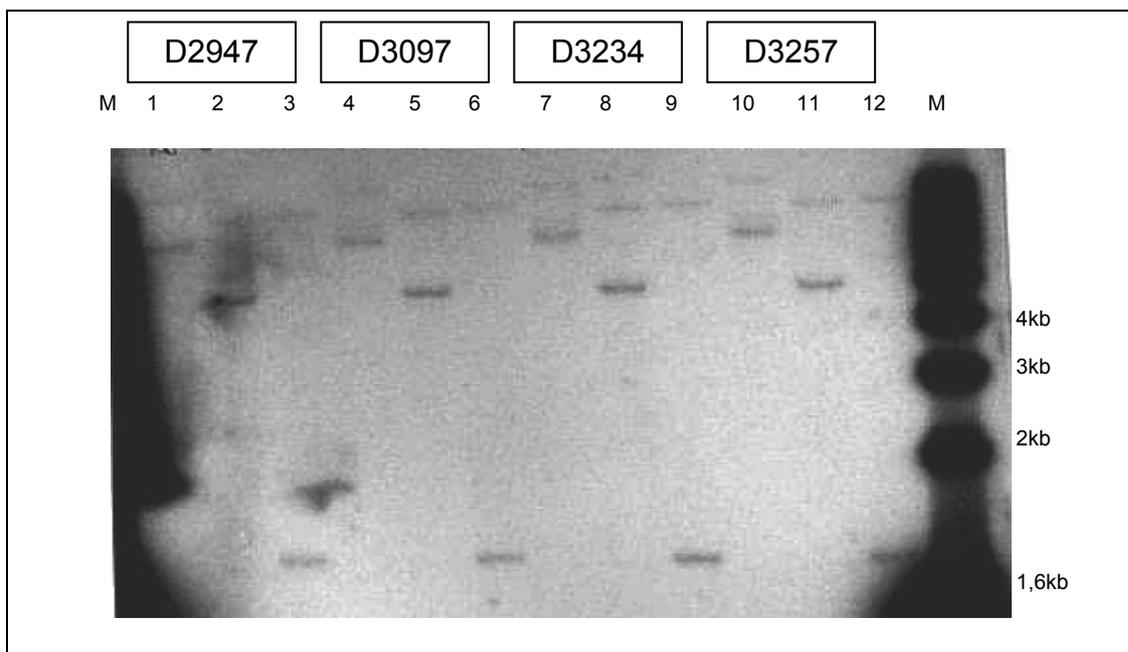


Abbildung 32 LIS1-Blot 1. Nach Hybridisierung mit der LIS1-Sonde M:1kb Leiter 1-3: D2947 4-6: D3097 7-9: D3234 10-12: D3257 Enzymverteilung: 1,4,7,10: *BamHI* 2,5,8,11: *EcoRI* 3,6,9,12: *HindIII*

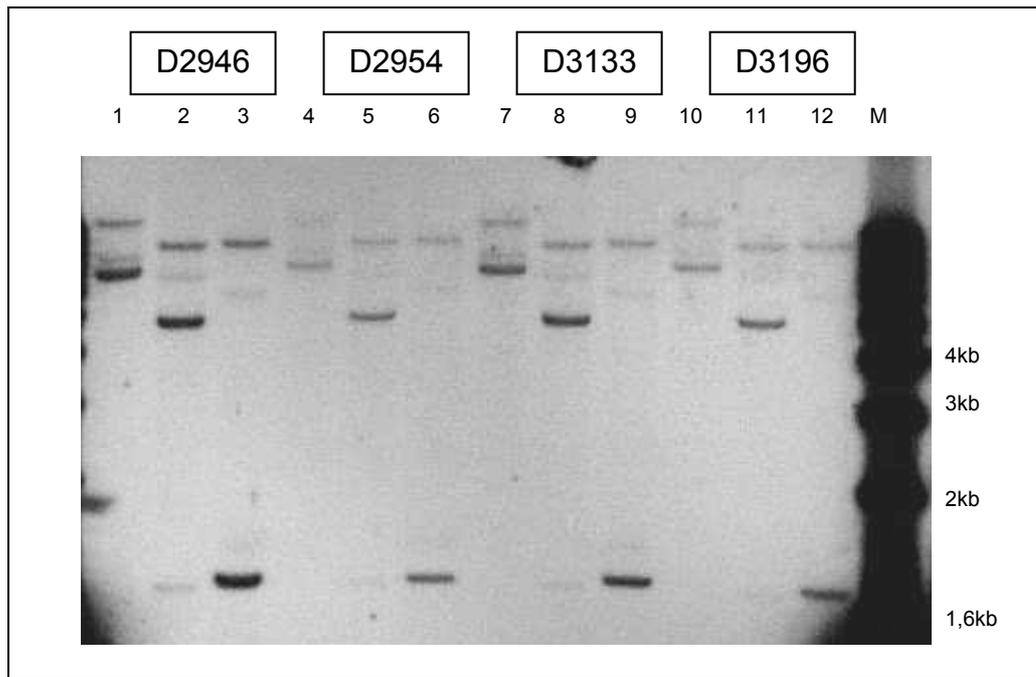


Abbildung 33 LIS1-Blot 2. Nach Hybridisierung mit der *LIS1*-Sonde M:1kb Leiter 1-3: D2946 4-6 : D2954 7-9 D3133 10-12: D3196
Enzymverteilung: 1,4,7,10: *Bam*HI 2,5,8,11: *Eco*RI 3,6,9,12: *Hind*III

5. Diskussion

Nach dem heutigen Kenntnisstand ist die Anzahl der unter den seltenen neuronalen Migrationsstörungen leidenden Patienten weltweit klein. Die Schätzung der Häufigkeit ist vor allem auf Grund der großen klinischen und genetischen Heterogenität schwierig und wird kontrovers diskutiert. In klinisch sorgfältig gewählten Patientenkollektiven fanden sich bei 76% der Patienten mit isolierter Lissenzephalie Mutationen im *LIS1*- oder *DCX*-Gen (Pilz *et al.* 1998). In weiteren Studien wurden Mutationen bei 60% der Patienten mit ILS gefunden (Cardoso *et al.* 2002). In der kleinen Stichprobe der bei uns untersuchten Patienten konnte ich bei 2 von 10 Patienten mit ILS Mutationen im *LIS1*-Gen, und bei einer von vier betroffenen Patienten eine Mutation im *DCX*-Gen nachweisen. Die klinische Diagnosestellung wird vor allem durch die große Heterogenität der Erkrankungen erschwert. Bisher sind nur wenige Gene, die am neuronalen Wanderungsprozess beteiligt sind bekannt. Die Entwicklung auf diesem Forschungsgebiet ist jedoch rasant. In den letzten Jahren konnten immer mehr Gene identifiziert werden, die mit der neuronalen Migration in Zusammenhang stehen. Die Komplexität des menschlichen Gehirns und seiner Entwicklung lässt allerdings auf die Beteiligung einer Vielzahl weiterer noch unentdeckter Gene schließen. Gerade Patienten mit neuronaler Migrationsstörung, bei denen keine Mutationen in den schon bekannten Genen gezeigt werden konnten, sind ein wichtiges Kollektiv zur Identifizierung weiterer Gene. Für die molekulargenetische Untersuchung ist es in besonderem Maße wichtig, über Informationen bezüglich der Krankengeschichte und über eine detaillierte Beschreibung der Bildgebung zu verfügen. Solche Angaben sind die Grundlage für die Entscheidung, in welchen Genen auf Defekte untersucht werden soll. In vielen Fällen sind ausführliche Informationen entscheidend für den Erfolg der molekulargenetischen Diagnostik.

Mutationen im *LIS1*-Gen

Bei zwei Patienten konnte ich durch direkte Sequenzierung heterozygote Mutationen im *LIS1*-Gen identifizieren. Bei der Patientin D3133 war ein C>A Basenaustausch im 11. Exon an Position 1197 der cDNA (S399R) nachzuweisen. Beide gesunde Eltern zeigten den Basenaustausch nicht. Auch bei 100 gesunden Kontrollpersonen trat der Austausch nicht auf, so dass ein Polymorphismus damit unwahrscheinlich ist. Es handelt sich also um eine *de novo* Punktmutation. Nach Abschluss meiner Versuche, konnte in meiner

Arbeitsgruppe eine weitere Mutation am Ende des 11. Exons detektiert werden. Diese noch nicht publizierte Punktmutation ist im *LIS1*-Gen noch weiter 3' gelegen, als die hier detektierte Mutation (Uyanik *et al.* in prep.). Diese seltene Lokalisation im letzten WD-Repeat ist wichtig, da ein entscheidendes Ziel der molekularen Diagnostik auch ist, Mutationen zu beurteilen. Entscheidend in dieser Beziehung ist es, Erfahrungen zu sammeln, die, anhand der Mutationsart und -lokalisierung, gültige Aussagen über den klinischen Schweregrad zulassen, also auch Vorhersagen über den klinischen Verlauf erlauben. In der Literatur lassen sich einige Aussagen zur Genotyp-Phänotyp-Korrelation finden. Danach verursachen verschiedene Mutationstypen im *LIS1*-Gen signifikant unterschiedliche Schweregrade. Die klinische Schwere ist abhängig vom Ausmaß der Agyrie und der kortikalen Dicke. Am schwersten betroffen sind Patienten mit großen Deletionen (meist Grad 1 oder 2), oder trunkierenden Mutationen, wobei früh-trunkierende Mutationen eine schwerere Klinik verursachen als spät trunkierende (Cardoso *et al.* 2000, Cardoso 2002). Eine deutlich mildere Klinik findet sich in der Regel bei intragenischen Mutationen. Am leichtesten betroffen sind Patienten mit Missense-Mutationen (Cardoso *et al.* 2000, Leventer *et al.* 2001a). Bei den fünf bisher beschriebenen Missense-Mutationen findet sich eine Grad 3 bis 6 Lissenzephalie (Cardoso *et al.* 2000, Lo Nigro *et al.* 1997, Pilz *et al.* 1998).

Anhand der Patienten, die in der Literatur beschrieben sind, ließ sich also eine schwergradige Lissenzephalie auf Grund einer Punktmutation nicht erwarten. Im Gegensatz dazu zeigte das MRT der Patientin D3133 eine Typ 1-Lissenzephalie Grad 2. Der Schlüssel zur Lösung dieses scheinbaren Widerspruchs liegt vermutlich in der Position der Punktmutation. Alle hier gezeigten Missense-Mutationen sind in den vorderen Abschnitten des *LIS1*-Gens lokalisiert. Die von mir gefundene Mutation S399R liegt im siebten, also letzten WD-Repeat. Auch die noch nicht publizierte noch weiter 3' gelegene Punktmutation führt zu einer schwergradigen Lissenzephalie Grad 3. Dies unterstützt die Hypothese, dass das siebte WD-Repeat von besonderer Bedeutung für die *LIS1*-Funktion ist. WD-Repeats sind evolutionär konservierte Domänen (Hattori *et al.* 1994), die zur Interaktion mit anderen Proteinen fähig sind. Sie bilden ein fingerartiges Motiv, das die Form eines Propellerrades hat (Gupta *et al.* 2002). Sie sind für die Funktion des *LIS1*-Gens essentiell. Mögliche Auswirkung eines Austausches der polaren Aminosäure Serin zur basischen Aminosäure Arginin an Position 399 der cDNA könnte sein, dass die Proteinfaltung entscheidend gestört ist. Daneben wäre denkbar, dass dadurch eine sehr

spezifische Bindestelle verloren geht. Die wichtigsten Funktionen von LIS1 könnten nicht mehr erfüllt werden.

Die zweite Mutation im *LIS1*-Gen, die sich bei der Untersuchung der Patienten zeigte, ist die Frameshift-Mutation c.1050delG der Patientin D3077, welche zu einem Stopcodon nach drei veränderten Aminosäuren führt. Die Mutation ist eine Spontanmutation, da beide Eltern der Patientin die Deletion nicht zeigen. An Position c.1050 sind schon mehrfach Mutationen nachgewiesen worden, allerdings bisher Insertionen (Cardoso *et al.* 2002). Die Mutation befindet sich im Bereich des sechsten WD-Repeats. „Nonsense“ Mutationen, die eine Verschiebung des Leserasters zur Folge haben können, sind im Falle des *LIS1*-Gens häufig, da bisher hauptsächlich Deletionen nachgewiesen wurden. Davon waren 88% der Mutationen trunkierend, oder führten zu einem intern deletierten Protein (Caspi *et al.* 2003). Nach dem oben dargestellten Kenntnisstand sollen spät-trunkierende Mutationen zu einer leichteren klinischen Ausprägung führen. Dazu passen die Ergebnisse der Bildgebung durch MRT bei der Patientin. Es zeigte sich eine Lissenzephalie Grad 3 mit okzipitaler und temporaler Pachygyrie und milder cerebellärer Hypoplasie. Die Patientin scheint klinisch aber weit schwerer betroffen als diese Graduierung erwarten lässt. Sie leidet seit ihrem dritten Lebensmonat unter Epilepsie, ist entwicklungsretardiert, hypoton, blind und taub.

Die wichtigen LIS1-Funktionen sind höchstwahrscheinlich durch die Mutationen gestört. Mutationen im *LIS1*-Gen führen zur in-vitro Aggregation des fehlgebildeten LIS1-Proteins (Sapir *et al.* 1999b). Mutiertes LIS1 befindet sich weder an der üblichen Position in der Zelle (Caspi *et al.* 2003), noch bleibt die Kapazität mit NUDE und PAFAH1B2/3 zu interagieren erhalten (Kato und Dobyns 2003). Sowohl die veränderte Neurogenese in der Ventrikularzone als auch die Migrationsstörung der Neuronen sind die Folge. Fehlgewanderte Neurone können ihre vorgesehenen Verbindungen zu anderen Neuronen dadurch vermutlich nicht mehr aufnehmen. Die graduierte Reduktion der LIS1-Funktion führt zur unterschiedlichen Schwere des Phänotyps (Gambello *et al.* 1999). Schon die Haploinsuffizienz des Proteins führt zur Ausprägung des vollen klinischen Bildes (Reiner *et al.* 1993). Dies konnte auch durch Versuche im Mausmodell nachempfunden werden (Hirotsume *et al.* 1998, Cahana *et al.* 2001). Bei komplettem Gen-Knockout beider Allele (homozygot *Lis1*^{-/-}) sterben Mausembryonen kurz nach der Implantation ab. Ist eine reduzierte Restaktivität eines Allels gegeben, lassen sich dosisabhängig verschiedene

Funktionen des *LIS1*-Gens beleuchten. Die Desorganisation der Subplate und die Position und Zahl der mitotischen Zellen in der ventrikulären Zone sind dosisabhängig (Gambello *et al.* 2003).

Mutationen im *DCX*-Gen

Bei einer der vier untersuchten Patienten mit Double-Cortex-Syndrom konnte ich durch direkte Sequenzierung die heterozygote Mutation c.236C>G (T88R) identifizieren. Die Mutation c.236C>G (T88R) befindet sich im vierten Exon, in dem auch schon mehrere andere Mutationen nachgewiesen werden konnten. Durch die Mutation kommt es zu einem Austausch der polaren Aminosäure Threonin zur basischen Aminosäure Arginin im C-terminalen Tandemrepeat der DC-Domäne. DC-Domänen sind für die Interaktion mit Tubulin verantwortlich. Zum Zeitpunkt der molekulargenetischen Untersuchung waren die Eltern der Patientin schon verstorben. Deswegen ist es nicht mehr möglich festzustellen, ob die Patientin das mutierte Allel von einem Elternteil geerbt hat. Bei der leicht geistig retardierten Schwester der Patientin fand sich die Normalsequenz. Einhundert gesunde Kontrollpersonen zeigten den Basenaustausch nicht, so dass ein Polymorphismus unwahrscheinlich ist. Die Patientin D3242 leidet seit ihrem neunten Lebensjahr unter schwer medikamentös therapierbarer Epilepsie und ist geistig erheblich retardiert. Bei der Patientin ist trotz der bekannten Epilepsie und der mentalen Retardierung erst bei Verdacht auf Hirnmetastasen bei einer erhöhten Anfallshäufigkeit im Alter von 65 Jahren ein CCT angefertigt worden. Hier wurde eine subkortikale Bandheterotopie beobachtet. Ihre CCT-Bilder zeigen einen verdickten Kortex und eine reduzierte Anzahl Gyri. Da aber auch das Anfallsleiden der Patientin das Gehirn schädigt, ist nur schwer zu beurteilen, welche Ursache welchen Effekt auf das Gehirn der Patientin hat.

Allgemein lässt sich über Missense-Mutationen im *DCX*-Gen feststellen, dass sie durch die unterschiedliche X-Inaktivierung ein sehr variables klinisches Bild bedingen. Die geistige Behinderung ist grenzwertig bei ca. zehn Prozent der Betroffenen, leichtgradig bei ca. 32 Prozent, mittel-schwer bei ca. 25 Prozent und schwer bei ca. 16 Prozent. Aber immerhin 18 Prozent der betroffenen Patientinnen haben eine normale Intelligenz (Dobyns *et al.* 1996). In der Bildgebung erwartet man im Allgemeinen die Ausbildung eines Double-Cortex. Es gibt aber auch Frauen ohne feststellbare Fehlbildungen der Gehirnentwicklung trotz nachgewiesener Mutation im *DCX*-Gen (Gleeson *et al.* 2000a, Aigner *et al.* 2003,

Gleeson 2003). Die Erklärung für diese Phänomene ist die unterschiedliche X-Inaktivierung.

Vor dem Hintergrund dieses Falles und der Tatsache, dass bis zu 1% der Bevölkerung eine „idiopatische“ Epilepsie entwickelt (Steinlein 2004), erscheinen die Ergebnisse der molekulargenetischen Untersuchung durchaus bemerkenswert. An dieser Stelle ist auch die Bedeutung der bildgebenden Methoden auch bei schon lange bekannter Erkrankung noch einmal besonders hervorzuheben.

Bekannte Polymorphismen im *LIS1*-Gen

Im *LIS1*-Gen sind bisher Polymorphismen in Intronen oder dem nicht-translatierten 3' Bereich des Gens in der Literatur beschrieben. Diese liegen meist in heterozygotem Zustand vor. *LIS1* gilt als in hohem Maße evolutionär konserviert. Einige Basenvarianten kommen allerdings häufig vor. Als Beispiel hierfür gilt der Polymorphismus an Position c.568+27T> C im Intron sechs. Dieser Polymorphismus wird in der Literatur mit einer anzunehmenden Häufigkeit von circa 1,5% angegeben (Cardoso *et al.* 2002). In einem gewissen Kontrast hierzu steht, dass vier der von mir untersuchten zehn Patienten diesen Basenaustausch im heterozygoten Zustand zeigten. In der kleinen Untersuchungsgruppe entspricht dies einer Frequenz von circa 40%. Dieses Ergebnis weist auf ein häufigeres Vorkommen hin. Der zweite bekannte Polymorphismus ist die Variante c.1233+17C>T im 3'UTR Bereich des *LIS1*-Gens. Zwei von zehn Patienten waren an dieser Position heterozygot (20%). Auch bei dieser Variante zeigt sich eine Differenz zur Datenlage, da der Polymorphismus c.1233+17C>T in der Literatur mit einer anzunehmender Häufigkeit von 40% angegeben wird (Cardoso *et al.* 2002). Da es sich hier aber um sehr kleine Stichproben handelt, kann man höchstens von einer Tendenz sprechen, die durch weitere Untersuchungen weltweit ergänzt werden müsste.

Die Ergebnisse der direkten Sequenzierung des Patienten D3050 haben einige Fragen aufgeworfen. Die Analyse der Patienten-DNA ergab vier heterozygote Basenaustausche, von denen drei noch nicht in der Literatur beschrieben waren. Bei der Untersuchung der DNA der Eltern des Patienten zeigte sich, dass auch die Mutter alle Basenvariationen im heterozygoten Zustand trug. Da eine mütterliche Erkrankung nicht bekannt war, gingen wir also zunächst von Polymorphismen aus. Über die Herkunft der Familie ist nichts bekannt, der Familienname ließ aber auf spanische oder portugiesische Herkunft schließen.

Deswegen wurde zusätzlich zum nord-westeuropäischen Kontrollkollektiv ein spanisches Kontrollkollektiv zur Polymorphismustestung untersucht.

Das Ergebnis brachte allerdings keine weitere Klärung der Lage. Weder im nord-westeuropäischen Kontrollkollektiv noch im spanischen Kontrollkollektiv konnten die drei Basenvarianten innerhalb der Introne gezeigt werden. Es könnte also jeder der drei Basenvarianten als seltene Variante betrachtet werden. Das Auftreten gleich drei unterschiedlicher Mutationen auf einem Allel ist aber nicht plausibel, zumal eine mütterliche Erkrankung nicht bekannt ist.

Die Lokalisation in den Intronen machte zusätzlich die Diagnose einer Mutation schwerer, da es hier nicht zu einer Änderung der Aminosäuresequenz kommt. Die Variationen c.33-38G>A und c.118-14T>C zeigten auch sonst keine bekannten Auffälligkeiten in Bezug auf ihre Position im Intron, außerdem handelt es sich in beiden Fällen um variable Regionen innerhalb des Introns. Eine weitere Untersuchung erschien deshalb nicht sinnvoll.

Als potentielle Mutation untersuchte ich den in einer evolutionär konservierten Region liegenden Basenaustausch c.672-10A>C weiter, da durch den A>C Basenaustausch 10 Basenpaare vor Beginn des achten Exon die Sequenz des veränderten Allels einer Spleißstellen-Erkennungssequenz ähnlicher geworden war. Obwohl ein detektierbarer Effekt nicht definitiv darstellbar ist, untersuchten wir, ob die RNA durch einen abnormen Spleißprozess verändert wurde. Es zeigte sich im Bild der Sequenzierung eine regelrechte Abfolge der Exone sechs, sieben, acht und neun. Es konnte nicht nachgewiesen werden, dass ein Allel auf Ebene der RNA (mit dem Basenaustausch) verändert gespleißt wurde. Der Basenaustausch bleibt hoch verdächtig, für die Erkrankung des Patienten verantwortlich zu sein, da es sich um eine evolutionär konservierte Region innerhalb des *LIS1*-Gens handelt. Zu bedenken bleibt allerdings, dass beim Patienten ein Double-Cortex-Syndrom diagnostiziert wurde und deshalb zunächst keine Mutation im *LIS1*-Gen zu erwarten war. Es sind aber auch Fälle in der Literatur beschrieben, bei denen sich bei einem SBH eine *LIS1*-Mutation nachweisen ließ, hier war dann ein Mosaik die Ursache (Leventer *et al.* 2001a, Sicca *et al.* 2003). Eine eindeutige Bewertung der verschiedenen molekulargenetischen Auffälligkeiten bei Patient D3050 kann zum jetzigen Zeitpunkt nicht getroffen werden.

Molekulargenetische Methoden

Zur molekulargenetischen Untersuchung der Patienten, wurde die Patienten-DNA aus EDTA-Blutproben extrahiert. Aus der gewonnenen DNA wurden alle kodierenden Exone des *LIS1*- bzw. *DCX*-Gens, sowie die flankierenden Intronbereiche mit Hilfe der PCR-Reaktion amplifiziert. Danach schloss sich die direkte Sequenzierung beider DNA-Stränge an. Auffällige Sequenzen wurden einschließlich der PCR-Reaktion wiederholt, um die Reproduzierbarkeit der Ergebnisse zu überprüfen. Die beschriebenen Basenvarianten konnten alle durch die Wiederholung der Arbeitsgänge bestätigt werden. Bei den detektierten Variationen handelt es sich ausschließlich um Basenaustausche und kleinere Deletionen oder Insertionen mit resultierender detektierbarer Sequenzverschiebung. Methodisch problematisch bleiben größere Deletionen oder Insertionen, die mit der direkten Sequenzierung nicht auffallen, da in diesem Fall nicht ausgeschlossen werden kann, dass nur das Normalallel repräsentiert ist. Dieses Problem ergibt sich in besonderem Maße bei Patientinnen mit DCX-Syndrom und allen Patienten mit einer Deletion im *LIS1*-Gen, falls beispielsweise ganze Exone fehlen. Liegt ein somatisches Mosaic vor, welches sowohl bei Patienten mit Mutation im *LIS1*-Gen als auch bei Patienten mit Mutation im *DCX*-Gen beschrieben wurde (Aigner *et al.* 2003) kann dieser Umstand anhand der Sequenzbilder bestenfalls abgeschätzt werden, da es sich nicht um eine quantitative Methode handelt. In diesem Fall muss in weiteren Schritten, z.B. im Vergleich verschiedener Gewebe zusätzlich weiter untersucht werden.

Mittels Southern Blotting zeigten ein Drittel der Patienten mit Lissenzephalie größerer Deletionen (Lo Nigro *et al.* 1997). Deshalb untersuchte ich alle Patienten, bei denen bei der direkten Sequenzierung keine krankheitsverursachende Variation aufgefallen war auch mit Hilfe dieser Methode. Es konnten jedoch Auffälligkeiten, die auf eine größere Deletion hinweisen bei keinem Patienten gefunden werden. Hier bleibt jedoch zu bedenken, dass der Erfolg dieser Methode von der Wahl der Restriktionsenzyme abhängt. Nur wenn eine Mutation zu einem veränderten Spaltungsverhalten führt, wird die Mutation detektierbar. Ein Spektrum an verschiedenen Restriktionsenzymen sollte deswegen ausgenutzt werden.

6. Zusammenfassung

Die Typ 1-Lissenzephalie ist eine schwere Fehlbildung des menschlichen Gehirns. Sie ist das Resultat einer Störung der neuronalen Migration während der frühen Embryogenese. Mutationen in den Genen *LIS1* und *DCX* sind neben Mutationen in anderen Genen für dieses Krankheitsbild verantwortlich. Klassische Symptome sind schwere geistige und motorische Retardierung, Epilepsie und Muskelhypotonien. Betroffene Patienten haben eine deutlich eingeschränkte Lebenserwartung. Das wichtigste morphologische Diagnosekriterium des Krankheitsbildes ist die auffällige Fehlbildung des Kortex, die sich mit Hilfe der Magnetresonanztomographie sichtbar machen lässt. Es imponieren Gyrierungsstörungen unterschiedlichsten Ausmaßes und Heterotopien der grauen Substanz im Marklager.

In der vorliegenden Arbeit wurden Patienten mit Isolierter Lissenzephalie und Double-Cortex-Syndrom mit Hilfe molekulargenetischer Methoden untersucht. Die Patienten-DNA wurde mit Hilfe der direkten Sequenzierung und Southern Blotting auf Mutationen im *LIS1*- und *DCX*-Gen untersucht. Dabei wurden alle kodierenden Exone und flankierende Intronbereiche der Gene analysiert. Soweit verfügbar wurden auch die Eltern der Patienten untersucht, wenn sich bei Patienten DNA-Veränderungen zeigten.

Bei einer Patientin mit Lissenzephalie Grad 2 konnte eine Missense-Mutation im Exon 11 des *LIS1*-Gens nachgewiesen werden. Bei einer Patientin mit Lissenzephalie Grad 3 konnte ich das Vorliegen einer „frameshift“-Mutation mit vorzeitigem Stop Codon in Exon 10 zeigen. Eine Patientin mit Double-Cortex-Syndrom trug eine Punktmutation im Exon 4 des *DCX*-Gens. Daneben fielen einige Polymorphismen im *LIS1*-Gen auf. Bei einem Patienten konnte trotz mehrerer durch direkte Sequenzierung detektierter Basenaustausche im *LIS1*-Gen nicht geklärt werden, ob ein ursächlicher Zusammenhang mit der Lissenzephalie des Patienten besteht. Bei acht von zehn Patienten konnten keine Mutationen im *LIS1*- oder *DCX*-Gen gefunden werden.

Dies liegt möglicherweise daran, dass die molekulargenetischen Ursachen, die diesen sehr heterogenen Krankheiten zugrunde liegen erst seit relativ kurzer Zeit bekannt sind. Noch immer werden neue Gene, die im Zusammenhang mit der Kortexentwicklung stehen, entdeckt. Durch dieses Vorranschreiten der Forschungsergebnisse gewinnen wir einen immer tieferen und genaueren Einblick in die genetischen und molekularen Vorgänge, die während der Kortexentwicklung vonstatten gehen.

Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abbildungsverzeichnis

- S. 3 Abbildung 1** aus: Gupta A, Tsai LH and Wynshaw-Boris A (2002) Life is a journey: a genetic look at neocotical development. *Nature Genetics* **3**: R342-R355
- S. 8 Abbildung 2** aus: Kato M, Dobyns WB (2003) Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet* **12**:R89-R96
- S. 9 Abbildung 3** modifiziert nach: Morris-Rosendahl D, Wolff G (2003) Klinik, Genetik und Pathogenese der Lissenzephalien *Deutsches Ärzteblatt* **19**: A-1269-1282
- S. 13 Abbildung 4** aus: Liang Y, Yu W, Li Y, Yang Z, Yan X, Huang Q and Zhu X (2004) Nudel function in membrane traffic mainly through association with Lis1 and cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* **164**(4): 557-566
- S. 14 Abbildung 5** modifiziert nach: Morris-Rosendahl D, Wolff G (2003) Klinik, Genetik und Pathogenese der Lissenzephalien *Deutsches Ärzteblatt* **19**: A-1269-1282
- S. 17 Abbildung 6A** modifiziert nach: Feng Y and Walsh CA (2001) Protein-Protein Interactions Cytoskeletal Regulation and Neuronal Migation. *Nature* **2**: 408-416
- S. 17 Abbildung 6B** modifiziert nach: Tanaka T, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, and Gleeson JG (2004) Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol* **165**(5): 709-721
- S. 19 Abbildung 7** aus: Kato M, Dobyns WB (2003) Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet* **12**:R89-R96
- S. 39 Abbildung 8A** Mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Hanno Botsch, Abteilung Radiologie und Nuklearmedizin, Josephs Krankenhaus Freiburg
- S. 39 Abbildung 8B** Mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Markus Uhl, Radiologische Klinik, Universitätsklinikum Freiburg
- S. 40 Abbildung 9A** Mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Dr. med. Klaus Bootsvelt, Institut für Radiologie und Nuklearmedizin, Klinikum Oldenburg
- S. 40 Abbildung 9B** Mit freundlicher Genehmigung durch Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Markus Uhl, Radiologische Klinik, Universitätsklinikum Freiburg
- S. 41 Abbildung 10A** Mit freundlicher Genehmigung durch Frau Dr. med. Ute Moog, Abteilung für klinische Genetik, Universitätsklinikum Maastricht, Niederlande
- S. 41 Abbildung 10B** aus: Hofer M (2000) CT-Kursbuch. Verlag Didamed; 3.Auflage; Düsseldorf; S28; Abbildung 28.3a
- S. 44 Abbildung 11** c.1197 C> A Mutation der Patientin D3133.
- S. 45 Abbildung 12** Fragmententstehung bei Verdau mit *TseI*.
- S. 46 Abbildung 13** 3% Nusieve-LE-Agarosegel des *TseI* Verdau
- S. 46 Abbildung 14.** p.Lys351SerfsX354 (c.1050delG) Mutation der Patientin D3077
- S. 47 Abbildung 15** Mutation c.236C>G der Patientin D3242.
- S. 48 Abbildung 16** Fragmente, die durch einen Verdau des Exon 4 PCR-Produkts mit *DdeI* entstehen.

- S. 49 Abbildung 17** Restriktionsverdau mit *DdeI* nach Auftrennung in 3%-Agarose.
- S. 50 Abbildung 18** Ausschnitt aus der Intron 6 Sequenz.
- S. 51 Abbildung 19** Ausschnitt aus der 3`UTR Region des *LIS1*-Gens.
- S. 52 Abbildung 20** Basenaustausch 33 –38G>A.
- S. 53 Abbildung 21** Fragmentlängen, die bei Verdau mit *MnII* entstehen.
- S. 54 Abbildung 22** Gelelektrophorese nach Verdau mit *MnII*.
- S. 54 Abbildung 23** Heterozygoter T>C Basenaustausch bei Patient D3050 und seiner Mutter (D3253).
- S. 55 Abbildung 24** DNA-Sequenz des Exon 4 PCR-Produkts mit den *ApoI*-Schnittstellen.
- S. 56 Abbildung 25** 3% Nusieve-LE-Agarosegel des *ApoI* Verdau.
- S. 56 Abbildung 26** A zu C Basenaustausch des heterozygoten Patienten und seiner Mutter.
- S. 57 Abbildung 27** DNA-Sequenz der allelspezifischen PCR bei einer Normalperson und dem Patienten.
- S. 58 Abbildung 28** Gelelektrophorese-Bilder der allelspezifischen PCR.
- S. 59 Abbildung 29** cDNA-Sequenz des Exon sieben - Exon acht Übergangs.
- S. 60 Abbildung 30** DCX-Blot 1.
- S. 61 Abbildung 31** DCX-Blot 2.
- S. 61 Abbildung 32** LIS1-Blot 1
- S. 62 Abbildung 33** LIS1-Blot 2.

Tabellenverzeichnis

- S. 7 Tabelle 1** Einteilung der Typ-1-Lissenzephalie nach dem Schweregrad modifiziert nach Morris-Rosendahl und Wolff (2003).
- S. 21 Tabelle 2** Weitere Gene, die zu neuronalen Entwicklungsstörungen führen.
- S. 24 Tabelle 3** Exon-Information für die Exone 2 und 11 des *LIS1*-Gens.
- S. 25 Tabelle 4** Oligonukleotidsequenz der Primer für die amplifizierte *LIS1* Exone.
- S. 26 Tabelle 5** Oligonukleotidsequenz der Primer für die amplifizierte allelspezifische Intron 7-PCR des *LIS1*-Gens.
- S. 26 Tabelle 6** Oligonukleotidsequenz der Primer für die amplifizierte PCR aus cDNA des *LIS1*-Gens.
- S. 27 Tabelle 7** Exon-Information für das *DCX*-Gen.
- S. 28 Tabelle 8** Oligonukleotidsequenz der Primer für die amplifizierte *DCX* Exone.
- S. 34 Tabelle 9** Reaktionsbedingungen der verschiedenen Restriktionsverdau.
- S. 43 Tabelle 10** Ergebnisse der direkten Sequenzierung des *LIS1*-Gens bei Patienten.
- S. 43 Tabelle 11** Ergebnisse der direkten Sequenzierung des *DCX*-Gens bei Patienten.
- S. 59 Tabelle 12** Erkennungssequenz für Spleißstellen.

7 Literaturverzeichnis

- Aicardi J (1991) The agyria-pachygyria complex: a spectrum of cortical malformations. *Brain Dev* **13**(1): 1-8
- Aigner L, Fluegel D, Dietrich J, Ploetz S, Winkler J (2000) Isolated lissencephaly sequence and double-cortex syndrome in a German family with a novel doublecortin mutation. *Neuropediatrics* **31**(4): 195-198
- Aigner L, Uyanik G, Couillard-Despres S, Ploetz S, Wolff G, Morris-Rosendahl D, Martin P, Eckel U, Spranger S, Otte J, Woerle H, Holthausen H, Apheshiotis N, Fluegel D and Winkler J (2003) Somatic mosaicism and variable penetrance in doublecortin-associated migration disorders. *Neurology* **60**: 329-332
- Bai J, Ramos R, Ackmann J, Thomas A, Lee R and LoTurco J (2003) RNAi reveals doublecortin is required for radial migration in rat neocortex. *Nat Neurosci* **6**: 1277-1283
- Barkovich AJ, Guerrini R, Battaglia G, Kalifa G, N'Guyen T, Parmeggiani A, Santucci M, Giovanardi-Rossi P, Granata T, D'Incerti L (1994) Band heterotopia: correlation of outcome with magnetic resonance imaging parameters. *Ann Neurol* **36**(4): 609-617
- Beltrán-Valero de Bernabé D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, van Beusekom E, van der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns W, Cormand B, Lehesjoki A, Cruces J, Voit T, Walsh C, van Bokhoven H and Brunner H (2002) Mutations in the O-Mannosyltransferase Gene *POMT1* Give Rise to the Severe Neuronal Migration Disorder Walker-Warburg Syndrome. *Am J Hum Genet* **71**: 1033-1043
- Bond J, Roberts E, Mochida GH, Hampshire DJ, Scott S, Askham JM, Springell K, Mahadevan M, Crow YJ, Markham AF, Walsh CA, Woods CG (2002) ASPM is a major determinant of cerebral cortical size. *Nat Genet* **32**(2): 316-320
- Brown JP, Couillard-Despres S, Cooper-Kuhn CM, Winkler J, Aigner L, Kuhn HG (2003) Transient expression of doublecortin during adult neurogenesis. *J Comp Neurol* **467**(1): 1-10
- Cahana A, Escamez T, Nowakowski RS, Hayes NL, Giacobini M, von Holst A, Shmueli O, Sapir T, McConnell SK, Wurst W, Martinez S and Reiner O (2001) Targeted mutagenesis of *Lis1* disrupts cortical development and LIS1 homodimerization. *Proc Natl Acad Sci USA* **98**: 6429-6434
- Cardoso C, Leventer RJ, Matsumoto N, Kuc JA, Ramocki MB, Mewborn SK, Dudlicek LL, May LF, Mills PL, Das S, Pilz DT, Dobyns WB and Ledbetter DH (2000) The location

- and type of mutation predict malformation severity in isolated lissencephaly caused by abnormalities within the LIS1 gene. *Hum Mol Genet* **9**:3019-3028
- Cardoso C, Leventer RJ, Dowling JJ, Ward HL, Chung J, Petras KS, Roseberry JA, Weiss AM, Das S, Martin CL, Pilz DT, Dobyns WB and Ledbetter DH (2002) Clinical and Molecular Basis of Classical Lissencephaly: Mutations in the LIS1 Gene (*PAFAH1B1*). *Hum Mut* **19**: 4-15
- Cardoso C, Leventer R, Ward H, Toyo-oka K, Chung J, Gross A, Martin C, Allanson J, Pilz D, Olney A, Mutchinick O, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A, Dobyns W and Ledbetter D (2003) Refinement of a 400-kb Critical Region Allows Genotypic Differentiation between Isolated Lissencephaly, Miller-Dieker Syndrome, and Other Phenotypes Secondary to Deletions of 17p13.3. *Am J Hum Genet* **72**: 918-930
- Caspi M, Atlas R, Kantor A, Sapir T, Reiner O (2000) Interaction between LIS1 and doublecortin, two lissencephaly gene products. *Hum Mol Genet* **9**: 2205-2213
- Caspi M, Coquelle F, Koifman C, Levy T, Arai H, Aoki J, De Mey J and Reiner O (2003) LIS1 Missense Mutations. *J Biol Chem* **278**(40): 38740-38748
- Clark GD, McNeil RS, Bix GJ, Swann JW (1995) Platelet-activating factor produces neuronal growth cone collapse. *Neuroreport* **6**(18): 2569-2575
- Clark GD (2001) Cerebral gyral dysplasias: molecular genetics and cell biology. *Opin. Neurol.* **14**: 157-162
- Coquelle F, Caspi M, Cordelières F, Dompierre J, Dujardin D, Koifman C, Martin P, Hoogenraad C, Akhmanova A, Galjart N, De May J and Reiner O (2002) LIS1, CLIP-170's Key to the Dynein/Dynactin Pathway. *Mol Cell Biol* **22**: 3089-3102
- Corbo JC, Deuel TA, Long JM, LaPorte P, Tsai E, Wynshaw-Boris A and Walsh CA (2002) Doublecortin is required in mice for lamination of the hippocampus but not the neocortex. *J Neurosci* **22**(17): 7548-7557
- Couillard-Despres S, Uyanik G, Ploetz S, Karl C, Koch H, Winkler J and Aigner L (2004) Mitotic impairment by doublecortin is diminished by doublecortin mutations found in patients. *Neurogenetics* **5**(2): 83-93
- Crome L (1956) Pachygyria. *J Pathol Bacteriol* **71**(2): 335-352
- Demelas L, Serra G, Conti M, Achene A, Mastropaolo C, Matsumoto N, Dudlicek LL, Mills PL, Dobyns WB, Ledbetter DH, Das S (2001) Incomplete penetrance with normal MRI in a woman with germline mutation of the DCX gene. *Neurology* **57**(2):327-30.

- D'Arcangelo G, Miao GG, Chen SC, Soares HD, Morgan JI, Curran T (1995) A protein related to extracellular matrix proteins deleted in the mouse mutant reeler. *Nature* **374**: 719-723
- des Portes V, Pinard JM, Billuart P, Vinet MC, Koulakoff A, Carrié A, Gelot A, Dupuis E, Motte J, Berwald-Netter Y, Catala M, Kahn A, Beldjord C and Chelly J (1998a) A Novel CNS Gene Required for Neuronal Migration and Involved in X-linked Subcortical Laminal Heterotopia and Lissencephaly Syndrome. *Cell* **92**:51-61
- des Portes V, Francis F, Pinard JM, Desguerre I, Moutard ML, Snoeck I, Meiners LC, Capron F, Cusmai R, Ricci S, Motte J, Echenne B, Ponsot G, Dulac O, Chelly J and Beldjord C (1998b) *Doublecortin* is the major gene causing X-linked subcortical laminar heterotopia (SCLH). *Hum Mol Genet* **7** (7): 1063-1070
- Dobyns WB, Stratton RF, Greenberg F (1984) Syndromes with lissencephaly. I: Miller-Dieker and Norman-Roberts syndromes and isolated lissencephaly. *Am J Med Genet* **18**(3): 509-526
- Dobyns WB (1987) Developmental aspects of lissencephaly and the lissencephaly syndromes. *Birth Defects Orig Artic Ser* **23**(1): 225-241
- Dobyns WB, Reiner O, Carrozzo R and Ledbetter D (1993) Lissencephaly. A human brain malformation associated with deletion of the LIS1 gene located at chromosome 17p13. *J Am Med Assoc* **270**:2838-2842
- Dobyns WB, Truwit CL (1995 update) Lissencephaly and other malformations of cortical development. *Neuropediatrics* **26**: 132-147
- Dobyns WB, Andermann E, Andermann F, Czapansky-Beilman D, Dubeau F, Dulac O, Guerrini R, Hirsch B, Ledbetter DH, Lee NS, Motte J, Pinard JM, Radtke RA, Ross ME, Tampieri D, Walsh CA, Truwit CL (1996) X-linked malformations of neuronal migration. *Neurology* **47**(2):331-339
- Dobyns WB, Truwit CL, Ross ME, Matsumoto N, Pilz DT, Ledbetter DH, Gleeson JG, Walsh CA, Barkovich AJ (1999) Differences in the gyral pattern distinguish chromosome 17-linked and X-linked lissencephaly. *Neurology* **53**(2): 270-7
- Dobyns WB, Anas NG, Fortenberry JD, Deshpande J, Cornfield DN, Tasker RC, Liu P, Eells PL, Griebel J, Kinsella JP, Abman SH (2002) Interactive effects of high-frequency oscillatory ventilation and inhaled nitric oxide in acute hypoxemic respiratory failure in pediatrics. *Crit Care Med.* **30**(11):2425-2429
- Efimov VP, Morris NR (2000) The LIS1-related Protein of *Aspergillus nidulans* Interacts with the Coiled-Coil Domain of the NUDE/RO11 Protein. *J Cell Biol* **250**(3): 681-688

- Emes R, Ponting C (2001) A new sequence motif linking lissencephaly, Treacher Collins and oral-facial-digital type 1 syndromes, microtubul dynamics and cell migration. *Hum Mol Genet* **10**: 2813-2820
- Faulkner NE, Dujardin DL, Tai CY, Vaughan KT, O`Connel CB, Wang Y, Vallee RB (2000) A role for the lissencephaly gene LIS1 in mitosis and cytoplasmic dynein function. *Nat Cell Biol* **2**(11): 784-791
- Feng Y and Walsh CA (2001) Protein-Protein Interactions, Cytoskeletal Regulation and Neuronal Migration. *Nature* **2**: 408-416
- Friocourt G, Koulakoff A, Chafey P, Boucher D, Fauchereau F, Chelly J and Francis F (2003) Doublecortin Functions at the Extremities of Growing Neuronal Processes. *Cereb Cortex* **13**: 620-626
- Francis F, Koulakoff A, Boucher D, Chafey P, Schaar B, Vinet MC, Friocourt G, McDonnell N, Reiner O, Kahn A, McConnell SK, Berwald-Netter Y, Denoulet P, Chelly J (1999) Doublecortin is a developmentally regulated, microtubule-associated protein expressed in migrating and differentiating neurons. *Neuron* **23**(2): 247-256
- Fox JW, Lamperti ED, Eksioglu YZ, Hong SE, Feng Y, Graham DA, Scheffer IE, Dobyns WB, Hirsch BA, Radtke RA, Berkovic SF, Huttenlocher PR, Walsh CA (1998) Mutations in filamin 1 prevent migration of cerebral cortical neurons in human periventricular heterotopia. *Neuron* **21**(6): 1315-1325
- Gambello MJ, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A (1999) Murine modelling of classical lissencephaly. *Neurogenetics* **2**: 77-86
- Gambello MJ, Darling DL, Yingling J, Tanaka T, Gleeson JG and Wynshaw-Boris A (2003) Multiple Dose-Dependent Effects of *Lis1* on Cerebral Cortical Development. *J Neurosci* **23**(5): 1719-1729
- Gdalyahu A, Ghosh I, Levy T, Sapir T, Sapoznik S, Fishler Y, Azoulai D, Reiner O (2004) DCX, a new mediator of the JNK pathway. *EMBO J* **23**(4): 823-832
- Geiser J, Schott EJ, Kingsbury TJ, Cole NB, Totis LJ, Bhattacharyya G, He L, Hoyt MA (1997) *Saccharomyces cerevisiae* genes required in the absece of the CIN8-encoded spindle motor act in functionally diverse mitotic pathways. *Mol Biol Cell* **8**: 1035-1050
- Gleeson JG, Allen KM, Fox JW, Lamperti ED, Berkovic S, Scheffer I, Cooper EC, Dobyns WB, Minnerath SR, Ross ME, Walsh CA (1998) Doublecortin, a brain-specific gene mutated in human X-linked lissencephaly and double cortex syndrome, encodes a putative signaling protein. *Cell* **92**(1):63-72

- Gleeson JG, Lin PT, Flanagan LA, Walsh CA (1999) Doublecortin is a microtubule-associated protein and is expressed widely by migrating neurons. *Neuron* **23**(2):257-271
- Gleeson JG, Minnerath S, Kuzniecky RI, Dobyns WB, Young ID, Ross ME and Walsh CA (2000a) Somatic and germline mosaic mutations in the *doublecortin* gene are associated with variable phenotypes. *Am J Hum Genet* **67**: 574-581
- Gleeson JG (2000b) Classical lissencephaly and double cortex (subcortical band heterotopia): *LIS1* and *doublecortin*. *Curr Opin Neurol* **13**: 121-125
- Gleeson JG (2003) Another double trouble; Silent carriers of *doublecortin* mutations. *Neurology* **60**:164-165
- Graham ME, Ruma-Haynes P, Capes-Davis AG, Dunn JM, Tan TC, Valova VA, Robinsons PJ, Jeffrey PL (2004) Multisite phosphorylation of doublecortin by cyclin-dependent kinase 5. *Biochem J* **381**(2): 471-481
- Gressens P (2000) Mechanisms and Disturbances of Neuronal Migration. *Pediatr Res* **48**(6): 725-730
- Gupta A, Tsai LH and Wynshaw-Boris A (2002) Life is a journey: a genetic look at neocortical development. *Nat Genet* **3**: R342-R355
- Hanaway J, Lee SI, Netsky NG (1968) Pachygyria: relation of findings to modern embryologic concepts. *Neurology* **18**(8): 791-799
- Harding B (1996) Gray matter heterotopia. In *Dysplasias of Cerebral cortex and Epilepsy*, Guerrini R, Andermann F, Canapicchi R, Roger J, Zifkin B, Pfanner P, eds (1. Edit) Lippincott-Raven, Philadelphia, S. 81-89
- Hattori M, Adachi H, Tsujimoto M, Arai H and Inoue K (1994) Miller-Dieker lissencephaly gene encodes a subunit of brain platelet-activating factor. *Nature* **370**: 216-218
- Hirotsune S, Pack SD, Chong SS, Robbins CM, Pavan WJ, Ledbetter DH, Wynshaw-Boris A (1997) Genomic organization of the murine Miller-Dieker/lissencephaly region: conservation of linkage with the human region. *Genome Res* **7**(6):625-34.
- Hirotsune S, Fleck MW, Gambello MJ, Bix GJ, Chen A, Clark GD, Ledbetter DH, McBain CJ and Wynshaw-Boris A (1998) Graded reduction of *Pafah1b1* (*Lis1*) activity results in neuronal migration defects and early embryonic lethality. *Nat Genet* **19**: 333-339
- Hoffmann B, Zuo W, Liu A and Morris NR (2001) The LIS1-related Protein NUDF of *Aspergillus nidulans* and Its Interaction Partner NUDE Bind Directly to Specific Subunits of Dynein and Dynactin and to α - and γ -Tubulin. *J Biol Chem* **276**(42): 38877-38884

- Hong SE, Shugart YY, Huang DT, Shahwan SA, Grant PE, Hourihane JO, Martin ND, Walsh CA (2000) Autosomal recessive lissencephaly with cerebellar hypoplasia is associated with human RELN mutations. *Nat Genet* **26**(1):93-96
- Horesh D, Sapir T, Francis F, Grayer Wolf S, Caspi M, Elbaum M, Chelly J and Reiner O (1999) Doublecortin, a stabilizer of microtubules. *Hum Mol Genet* **8**(9):1599-1610
- Jackson AP, Eastwood H, Bell SM, Adu J, Toomes C, Carr IM, Roberts E, Hampshire DJ, Crow YJ, Mighell AJ, Karbani G, Jafri H, Rashid Y, Mueller RF, Markham AF, Woods CG (2002) Identification of microcephalin, a protein implicated in determining the size of the human brain. *Am J Hum Genet* **71**(1):136-142
- Kato M, Dobyns WB (2003) Lissencephaly and the molecular basis of neuronal migration. *Hum Mol Genet* **12**:R89-R96
- Kholmanskikh SS, Dobrin JS, Wynshaw-Boris A, Letourneau PC and Ross ME (2003) Disregulated RhoGTPases and Actin Cytoskeleton Contribute to the Migration Defect in Lis1-Deficient Neurons. *J Neurosci* **23**(25): 8673-8681
- Kim MH, Cierpicki T, Derewenda U, Krowarsch D, Feng Y, Devedjiev Y, Dauter Z, Walsh CA, Otlewski J, Bushweller JH, Derewenda ZS (2003) The DCX-domain tandems of doublecortin and doublecortin-like kinase. *Nat Struct Biol* **10**(5): 324-316
- Kim MH, Cooper DR, Oleksy A, Devedjiev Y, Derewenda U, Reiner O, Otlewski J and Derewenda ZS (2004) The structure of the N-terminal domain of the product of the lissencephaly gene *Lis1* and its functional implications. *Structure* **12**: 987-998
- Kitamura K, Yanazawa M, Sugiyama N, Miura H, Iizuka-Kogo A, Kusaka M, Omichi K, Suzuki R, Kato-Fukui Y, Kamiirisa K, Matusuo M, Kamijo S, Kasahara M, Yoshioka H, Ogata T, Fukuda T, Kondo I, Kato M, Dobyns W, Tokoyama M and Morohashi K (2002) Mutation of *ARX* causes abnormal development of forebrain and testes in mice and X-linked lissencephaly with abnormal genitalia in humans. *Nat Genet* **32**:359-369
- Kizhatil K, Wu Y, Sen A and Bennet V (2002) A new activity of Doublecortin in Recognition of the Phospho-FIGQY Tyrosin in the Cytoplasmic Domain of Neurofascin. *J Neurosci* **22**(18): 7948-7958
- Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-Iida E, Nomura Y, Segawa M, Yoshioka M, Saito K, Osawa M, Hamano K, Sakakihara Y, Nonaka I, Nakagome Y, Kanazawa I, Nakamura Y, Tokunaga K, Toda T (1998) An ancient retrotransposal insertion causes Fukuyama-type congenital muscular dystrophy. *Nature* **394**(6691): 388-392
- Lambert de Rouvroit C, Goffinet AM (2001) Neuronal Migration. *Mech Dev* **105** : 47-56

- Ledbetter DH, Ledbetter SA, vanTuinen P, Summers KM, Robinson TJ, Nakamura Y, Wolff R, White R, Barker DF, Wallace MR, Collins FS, and Dobyns WB (1989) Molecular dissection of a contiguous gene syndrome: Frequent submicroscopic deletions, evolutionary conserved sequences, and a hypomethylated "island" in the Miller-Dieker chromosome region. *Proc Natl Acad Sci USA* **86**: 5136-5140
- Leventer RJ, Pilz DT, Matsumoto N, Ledbetter DH and Dobyns WB (2000) Lissencephaly and subcortical band heterotopia: molecular basis and diagnostics. *Mol Med Today* **6**: 277-284
- Leventer RJ, Cardoso C, Ledbetter DH and Dobyns WB (2001a) *LIS1* missense mutations cause milder lissencephaly phenotypes including a child with normal IQ. *Neurology* **57**: 416-422
- Leventer RJ, Cardoso C, Ledbetter DH and Dobyns WB (2001b) *LIS1*: from cortical malformation to essential protein of cellular dynamics. *Trends Neurosci* **24**: 489-492
- Lewin B (1998a) Molekularbiologie der Gene. (übersetzt von K. Beginnen) 6. Aufl, Spektrum Akad Verl., Heidelberg; Berlin, S.695,840
- Lewin B (1998b) Molekularbiologie der Gene. (übersetzt von K. Beginnen) 6. Aufl, Spektrum Akad Verl., Heidelberg; Berlin, S.101
- Liang Y, Yu W, Li Y, Yang Z, Yan X, Huang Q and Zhu X (2004) Nudel functions in membrane traffic mainly through association with Lis1 and cytoplasmic dynein. *J Cell Biol* **164**(4): 557-566
- Liu Z, Xie T, Steward R (1999) *Lis1*, the *Drosophila* homolog of a human lissencephaly disease gene, is required for germline cell division and oocyte differentiation. *Development* **126**: 4477-4488
- Liu Z, Steward R, Luo L (2000) *Drosophila Lis1* is required for neuroblast proliferation, dendritic elaboration and axonal transport. *Nat Cell Biol* **2**(11): 776-783
- Lo Nigro C, Chong SS, Smith ACM, Dobyns WB, Carrozzo R, Ledbetter DH (1997) Point mutations and an intragenetic deletion in *LIS1*, the lissencephaly causative gene in isolated lissencephaly sequence and Miller-Dieker syndrome. *Human Molecular Genetics* **6**:157-164
- Marin O, Rubenstein JL (2001) A long, remarkable journey: tangential migration in the telencephalon. *Nat Rev Neurosci* **2**: 780-790
- Matell M (1893) Ein Fall von Heterotopie der Grauen Substanz in den beiden Hemisphären des Großhirns. *Arch Psychiatr Nervenkr* **25**: 124-136

- Matsumoto N, Leventer RJ, Kuc JA, Mewborn SK, Dudlicek LL, Ramocki MB, Pilz DT, Mills PL, Das S, Ross ME, Ledbetter DH and Dobyns WB (2001) Mutation analysis of the *DCX* gene and genotype/phenotype correlation in subcortical band heterotopia. *Eur J Hum Genet* **9**: 5-12
- McConnell SK, Kaznowski CE (1991) Cell cycle dependence of laminar determination in developing neocortex. *Science* **254**(5029): 282-285
- Meyer G, Perez-Garcia CG, Gleeson JG (2002) Selective expression of doublecortin and LIS1 in developing human cortex suggests unique modes of neuronal movement. *Cereb Cortex* **12**(12): 1225-1236
- Mizuguchi M, Takashima S, Ikeda K, Kato M, Hori A (2002) Loss of doublecortin in heterotopic gray matter of a fetus with subcortical laminar heterotopia. *Neurology* **59**(1):143-144
- Mochida GH, Walsh CA (2004) Genetic basis of developmental malformations of the cerebral cortex. *Arch Neurol* **61**:637-640
- Morris-Rosendahl D, Wolff G (2003) Klinik, Genetik und Pathogenese der Lissenzephalien *Deutsches Ärzteblatt* **19**: A 1269-1282
- Norman M, Roberts M, Sirois J, Tremblay L (1967) Lissencephaly. *Can J Neurol Sci* **3**: 39-46
- Niethammer M, Smith DS, Ayala R, Peng J, Ko J, Lee MS, Morabito M and Tsai LH (2000) NUDEL is a novel Cdk5 substrate that associates with LIS1 and cytoplasmic dynein. *Neuron* **28**(3): 697-711
- Palmini A, Andermann F, Aicardi J, Dulac O, Chaves F, Ponsot G, Pinard JM, Goutières F, Livingston J, Tampieri D (1991) Diffuse cortical dysplasia, or the "double cortex" syndrome: the clinical and epileptic spectrum in 10 patients. *Neurology* **41**(10):1656-1662
- Peterfy M, Hozier JC, Hall B, Gyuris T, Peterfy K, Takecs L (1995) Localization of the mouse lissencephaly-1 gene to mouse chromosome 11B3, in close proximity to D11Mit65. *Somat Cell Mol Genet* **21**(5): 345-349
- Pilz DT, Matsumoto N, Minnerath S, Mills P, Gleeson JG, Allen KM, Walsh CA, Barkovich A, Dobyns WB, Ledbetter DH and Ross ME (1998) *LIS1* and *XLIS (DCX)* mutations cause most classical lissencephaly, but different patterns of malformation. *Hum Mol Genet* **7**(13) : 2029-2037
- Prescott SM, Zimmerman GA, Stafforini DM, McIntyre TM (2000) Platelet-activating factor and related lipid mediators. *Annu Rev Biochem* **69**: 419-445

- Poolos N, Das s, Clark G, Lardizabal D, Noebels J, Wyllie E, Dobyns W (2002) Males with epilepsy, complete subcortical band heterotopia, and somatic mosaicism for *DCX*. *Neurology* **58**(10): 1559-1562
- Rakic P (1971) Guidance of neurons migrating to the fetal monkey neocortex. *Brain Res* **33**(2): 471-476
- Rakic P (1990) Principles of neural cell migration. *Experientia* **46**(9): 882-91
- Rao MS, Shetty AK (2004) Efficacy of Doublecortin as a marker to analyse the absolute number and dendritic growth of newly generated neurons in the adult dentate gyrus. *Eur J Neurosci* **19**: 234-246
- Reiner O, Carrozzo R, Shen Y, Wehnert M, Faustinella F, Dobyns WB, Caskey T and Ledbetter D (1993) Isolation of a Miller-Dieker lissencephaly gene containing G protein β -subunit-like repeats. *Nature* **364**: 717-721
- Reiner O (1999) The Unfolding Story of Two Lissencephaly Genes and Brain Development. *Mol Neurobiol* **20**: 143-156
- Reiner O (2002) Pathways of neuronal migration. *Nat Genet* **32**: 341-342
- Reiner O, Gdalyahu A, Ghosh I, Levy T, Sapoznik S, Nir R, Sapir T (2004) DCX's phosphorylation by not Just aNother Kinase (JNK). *Cell Cycle* **3**(6): 747-751
- Sapir T, Elbaum M and Reiner O (1997) Reduction of microtubul catastrophe events by LIS1, platelet-activating factor acetylhydrolase subunit. *EMBO J* **16**: 6977-6984
- Sapir T, Eisenstein M, Burgess H A, Horesh D, Cahana A, Aoki J, Hattori M, Arai H, Inoue K and Reiner O (1999) Analysis of lissencephaly-causing *LIS1* mutations. *Eur J Biochem* **266**: 1011-1020
- Sapir T, Horesh D, Caspi M, Atlas R, Burgess HA, Grayer Wolf S, Francis F, Chelly J, Elbaum M, Pietrokovski S and Reiner O (2000) Doublecortin mutations cluster in evolutionarily conserved functional domains. *Hum Mol Genet* **9**(5): 703-712
- Schaar BT, Kinoshita K, McConnell SK (2004) Doublecortin microtubule affinity is regulated by a balance of kinase and phosphatase activity at the leading edge of migrating neurons. *Neuron* **41**(2): 203-213
- Sheen VL, Walsh CA (2003) Developmental genetic malformations of the cerebral cortex. *Curr Neurol Neurosci Rep* **3**(5): 433-441
- Sheffield PJ, Garrard S, Caspi M, Aoki J, Arai H, Derewenda U, Inoue K, Suter B, Reiner O, Derewenda ZS (2000) Homologs of the alpha- and beta-subunits of mammalian brain platelet-activating factor acetylhydrolase Ib in the *Drosophila melanogaster* genome. *Proteins* **39**(1): 1-8

- Sherr E (2003) The ARX story (epilepsy, mental retardation, autism, and cerebral malformations): one gene leads to many phenotypes. *Curr Opin Pediatr* **15**: 567-571
- Sicca F, Kelemen A, Genton P, Das S, Mei D, Moro F, Dobyns WB, Guerrini R (2003) Mosaic mutations of the LIS1 gene cause subcortical band heterotopia. *Neurology* **61**(8): 1042-1046
- Sidman RL and Rakic P (1973) Neuronal migration, with special reference to developing human brain: a review. *Brain Res* **62**(1):1-35
- Smith DS, Niethammer M, Ayala R, Zhou Y, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, Tsai LH (2000) Regulation of cytoplasmic dynein behaviour and microtubule organization by mammalian Lis1. *Nat Cell Biol* **2**(11): 767-775
- Stratton RF, Dobyns WB, Airhart SD and Ledbetter DH (1984) New chromosomal syndrome: Miller-Dieker syndrome and monosomy 17p13. *Hum Genet* **67**:193-200
- Strohner R, Nemeth a, Jansa P, Hofmann-Rohrer U, Santoro R, Langst G, Grummt I (2001) NoRC—a novel member of mammalian ISWI-containing chromatin remodeling machines. *EMBO J* **20**(17): 4892-4900
- Steinlein OK (2004) Genetic Mechanisms That Underlie Epilepsy. *Nat Neurosci* **5**: 400-408
- Tanaka T, Serneo FF, Tseng HC, Kulkarni AB, Tsai LH, Gleeson JG (2004a) Cdk5 phosphorylation of doublecortin ser297 regulates its effect on neuronal migration. *Neuron* **41**(2) 215-227
- Tanaka T, Serneo FF, Higgins C, Gambello MJ, Wynshaw-Boris A, and Gleeson JG (2004b) Lis1 and doublecortin function with dynein to mediate coupling of the nucleus to the centrosome in neuronal migration. *J Cell Biol* **165**(5): 709-721
- Tokuoka SM, Ishii S, Kawamura N, Satoh M, Shimada A, Sasaki S, Hirotsune S, Wynshaw-Boris A and Shimizu T (2003) Involvement of platelet-activating factor and LIS1 in neuronal migration. *Eur J Neurosci* **18**: 563-570
- Toyo-oka K, Shionoya A, Gambello M, Cardoso C, Leventer R, Ward H, Ayala R, Tsai L, Dobyns W, Ledbetter D, Hirotsune S and Wynshaw-Boris A (2003) 14-3-3 ϵ is important for neuronal migration by binding to NUDEL: a molecular explanation for Miller-Dieker syndrome. *Nat Genet* **34**(3): 274-285
- Tsukada M, Prokscha A, Oldekamp J, Eichele G (2003) Identification of neurabin II as a novel doublecortin interacting protein. *Mech Dev* **120**: 1033-1043
- Uyanik G, Aigner L, Martin P, Groß C, Neumann D, Marschner-Schäfer H, Hehr U and Winkler J (2003) ARX mutations in X-linked lissencephaly with abnormal genitalia. *Neurology* **61**: 232-235

- van Reeuwijk J, Janssen M, van den Elzen C, Beltran-Valero de Bernabe D, Sabatelli P, Merlini L, Boon M, Scheffer H, Brockington M, Muntoni F, Huynen MA, Verrips A, Walsh CA, Barth PG, Brunner HG, van Bokhoven H (2005) POMT2 mutations cause alpha-dystroglycan hypoglycosylation and Walker-Warburg syndrome. *J Med Genet* **42**(12):907-12
- Wynshaw-Boris A, Gambello MJ (2001) LIS1 and dynein motor function in neuronal migration and development. *Genes Dev* **15**: 639-651
- Xiang X (2003) LIS1 at the microtubule plus end and its role in dynein-mediated nuclear migration. *J Cell Biol* **160**(3): 298-299
- Xiang X, Osmani AH, Osmani SA, Xin M, Morris NR (1995) NudF, a nuclear migration gene in *Aspergillus nidulans*, is similar to the human LIS-1 gene required for neuronal migration. *Mol Biol Cell* **6**: 297-310
- Yang HK, Sundholm-Peters NL, Goings GE, Walker AS, Hyland K, Sze FG (2004) Distribution of doublecortin expressing cells near the lateral ventricles in the adult mouse brain. *J Neurosci Res* **76**(3): 282-295
- Yoshida A, Kobayashi K, Manya H, Taniguchi K, Kano H, Mizuno M, Inazu T, Mitsuhashi H, Takahashi S, Takeuchi M, Herrmann R, Straub V, Talim B, Voit T, Topaloglu H, Toda T, Endo T (2001) Muscular dystrophy and neuronal migration disorder caused by mutations in a glycosyltransferase, POMGnT1. *Dev Cell* **1**(5):717-724

Datenbanken:

Gene Cards	www.genecards.org
Ensembl	www.ensembl.org
Human Gene Mutation Database Cardiff:	www.hgmd.org

Appendix 1 – Materialien

Chemikalien, Materialien, Reagentiensätze

Abs. Ethanol	J.T. Baker, Deventer, Holland
BigDye [®] Terminator v1.1- Cycle-Sequencing Kit	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
Borsäure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
BSA (10 μ g/ml)	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland
Chlorophorm	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dextran blue	Serva, Heidelberg, Deutschland
DMSO	Sigma, Deisenhofen, Deutschland
dNTPs (20mM)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
EDTA	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ethidiumbromid	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Ficoll 400	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Fuji X-Ray Röntgenfilm	Fuji Photo Film (Europe), Düsseldorf, Deutschland
Gel Blotting Paper GB002	Schleicher und Schuell Biosciences, Dassel, Deutschland
Gel Blotting Paper GB003	Schleicher und Schuell Biosciences, Dassel, Deutschland
HCL	Merck, Darmstadt, Deutschland
HPLC-Wasser	Merck, Darmstadt, Deutschland
Hybond N ⁺ Filter	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
LE- Agarose (Seakem)	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Low Molecular Weight- DNA Marker	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland
Marker 100 bp (N3231 L)	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland
NaCl	Merck, Darmstadt, Deutschland
Na ₂ HPO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaH ₂ PO ₄	Merck, Darmstadt, Deutschland
NaOH	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nusieve-GTG- Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland

PCR Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
<ul style="list-style-type: none"> • Q-Solution • MgCl₂(25 mM) • Taq-Puffer • Taq-Polymerase (5U/μl) 	
Redivue [α - ³² P]-dCTP (10μCi/μl)	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Rediprime	Rediprime II Random Prime labeling System Amersham RPN 1633; Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
SDS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Sephadex G 50	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Spermidin (0,1M)	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TSE	Applied Biosystems, Weiterstadt, Deutschland
1kb Leiter	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland

Enzyme

Restriktionsendonuklease <i>BamH I</i>	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland
Restriktionsendonuklease <i>EcoR I</i>	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland
Restriktionsendonuklease <i>HindIII</i>	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Restriktionsendonuklease <i>TseI</i>	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland
Restriktionsendonuklease <i>DdeI</i>	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland
Restriktionsendonuklease <i>MnII</i>	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland
Restriktionsendonuklease <i>ApoI</i>	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland
Enzypuffer 2	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland
Enzypuffer 3	NEBiolabs, Frankfurt, Deutschland

Appendix 2 - Puffer und Salzlösungen - Gele

10X TBE- Puffer	Tris	0,9 M
	Borsäure	0,9 M
	EDTA	0,02 M
	pH 8,0	
1X TBE-Puffer	Tris	0,09 M
	Borsäure	0,09 M
	EDTA (Natriumsalz)	0,002 M
	pH 8,0	
	Durch 1 : 10 Verdünnung des 10X TBE- Puffers mit H ₂ O _{dd}	
0,5X TBE- Puffer	Tris	0,045 M
	Borsäure	0,045 M
	EDTA (Natriumsalz)	0,001 M
	pH 8,0	
	Durch 1 : 200 Verdünnung des 10X TBE- Puffers mit H ₂ O _{dd}	
Natrium-Phosphatpuffer	Na ₂ HPO ₄	1M
	NaH ₂ PO ₄	1M
	Titrieren auf pH 6,5/7,2	
TE-Puffer	Tris HCL	10 mM
	EDTA	1 mM
	ad H ₂ O	
	pH 8	
Ladepuffer	Ficol (400)	30%
	Bromphenolblau	0,05%
	In TE-Puffer bei 60°C gelöst	
Waschpuffer	Na-Phosphat-Puffer (pH 7,2)	20 mM
	SDS	1%
Waschpuffer	Na-Phosphat-Puffer (pH 6,5)	50 mM
	SDS	1%

Hybridisierungspuffer	Na-Phosphat-Puffer (pH 7,2)	0,5 M
	SDS	7%
	EDTA (pH 8,0)	1 mM
20 x SSC	NaCl	3 M
	Na ₃ citrat*2H ₂ O	0,3 M
	pH = 7	
Stop-Lösung	Bromphenolblau	0,1%
	Dextran blue	0,5%
	NaCl	0,1 M
	EDTA pH=8	20 mM
	Tris-HCL pH=7,8	10 mM
LE - Agarosegel 0,8 %- 2%	LE-Agarose	
	Ethidiumbromid	1 µg/ml
	In 0,5-1 X TBE-Puffer unter Erhitzen lösen	
Nusieve-LE-Agarosegel	Nusieve GTG-Agarose	2-3%
	LE-Agarose	1%
	Ethidiumbromid	1 µg/ml
	In 0,5-1 X TBE-Puffer unter Erhitzen lösen	

Appendix 3 – Geräte und Software

Geräte

Brutschrank	Memmert, Schwabach, Deutschland
Elektrophoresekammern	Renner, Dannstadt, Deutschland
Entwicklermaschine	Curix 60, Agfa, Köln, Deutschland
Gel Imaging System	AlphaEase FC™(AlphaDigiDoc™ 1000) Version 3.2.3, Alpha Innotech Corporation, San Leandro, USA
Gelträger	Renner, Dannstadt, Deutschland
Hybridisierungsöfen	Bachofer, Waiblingen, Deutschland
Photometer	BioPhotometer 6131; Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Rotationsöfen	Bachofer, Waiblingen, Deutschland
Schüttler	Celloshaker; Renner, Dannstadt, Deutschland
Sequencer	ABI Prism™ 310 automatic DNA Sequencer; Applied Biosystems, Foster City, USA
Termocycler	PTC-200™ ; MJ Research, Waltham, USA DYAD™ Peltier Thermal Cycler; MJ Research, Waltham, USA
Transilluminator	KFB, Deutschland
Waage	Sartorius, Göttingen, Deutschland
Zentrifugen	Centrifuge 5415 D, Eppendorf, Hamburg, Deutschland Biofuge A; Heraeus sepatech, Hanau, Deutschland Megafuge 10; Heraeus sepatech, Hanau, Deutschland

Software

Seqman	DNA Star™ , Madison, USA
Sequencing Analysis	Applied Biosystems, Foster City, USA

Danksagung

Für die Bereitstellung des Themas, die wissenschaftliche Betreuung, die fachlichen Diskussionen, die Unterstützung bei der Ausarbeitung der Dissertation und das in mich gesetzte Vertrauen möchte ich mich in besonderem Maße bei Frau PD Morris-Rosendahl (PhD) bedanken. Für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur und Erstellung des Zweitgutachtens danke ich Herrn PD Dr. med. H. Omran sehr.

Außerdem bin ich für die Hilfe der medizinisch-technischen Assistentinnen im Labor bei der praktischen Arbeit sehr dankbar. Hier sind vor allem Frau Helga Senff, Frau Elke Bausch, Frau Christine Zeschnik, Frau Elke Jantz und Frau Andrea Buchholz zu nennen. Bei Problemen mit Geräten, Versuchs-Verfahren und ähnlichem konnte ich mich jeder Zeit an Frau Dr. Anita Mainberger wenden. Für die Unterstützung im Labor bin ich allen Beteiligten äußerst dankbar. Des weiteren bedanke ich mich für die Erstellung und Bereitstellung einer Sonde für das *LIS1*-Gen bei Herrn Dr. Edgar Burgert, desgleichen bei Herrn Dr. Gökhan Uyanik für die Erstellung und Bereitstellung einer Sonde für das *DCX*-Gen. Ebenfalls danken möchte ich Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Hanno Botsch (Abteilung Radiologie und Nuklearmedizin, Josephs Krankenhaus Freiburg), Herrn Priv.-Doz. Dr. med. Markus Uhl (Radiologische Klinik, Universitätsklinikum Freiburg), Herrn Dr. med. Klaus Bootsvelt (Institut für Radiologie und Nuklearmedizin, Klinikum Oldenburg), Frau Dr. med. Ute Moog (Abteilung für klinische Genetik, Universitätsklinikum Maastricht, Niederlande) für die MRT/CCT Bilder der Patienten, die in dieser Arbeit abgebildet sind. Voraussetzung für diese Arbeit war natürlich auch das Übersenden von Patientenproben an das Institut für Anthropologie und Humangenetik. Allen Familien, einsendenden Ärzten, Labors und Wissenschaftlern möchte ich auf diesem Wege danken.

In besonderem Maße möchte ich aber meine Dankbarkeit meinen Eltern Drs Martin und Anita Mainberger zum Ausdruck bringen. Ihre Unterstützung während des Studiums und im Verlauf der Arbeiten zu dieser Promotion weiß ich sehr zu schätzen.

Für die emotionale Unterstützung durch Höhen und Tiefen während des Studiums und gerade in der Zeit der Erstellung dieser Dissertation danke ich meinem Mann Thomas Dey sehr.

Lebenslauf

Name: Dey geb. Mainberger
Vorname: Lisa
Geburtsdatum: 18.12.1978
Geburtsort: Landau / Pf.
Familienstand: verheiratet

Werdegang bis zum Studium:

1989 - 1998 Faustgymnasium in Staufen
23.06.1998 Abitur
1998 - 1999 Ausbildung zur Pflegehelferin, Pflegepraktika im Herzzentrum
Bad Krozingen, im Evangelischen Diakoniekrankenhaus
Freiburg, in der Klinik Dr. Becker Bad Krozingen

Studium und Prüfungen:

10/1999 Beginn des Medizinstudiums an der Albert-Ludwigs-
Universität Freiburg
23.08.2001 Ärztliche Vorprüfung
10/2001 Beginn der Promotion im Arbeitskreis von PD D.J.
Morris-Rosendahl (PhD), Institut für Humangenetik und
Anthropologie, Abteilung DNA- Diagnostik/Neurogenetik
19.09.2002 Erster Abschnitt der ärztlichen Prüfung
23.03.05 Zweiter Abschnitt der ärztlichen Prüfung
25.04.05 - 26.02.06 Praktisches Jahr im Diakoniekrankenhaus Freiburg,
Wahlfach: Gynäkologie und Geburtshilfe

Famulaturen: 09/02 Klinikum Wetzlar- Braunfels; Abt. Allgemein Chirurgie; 03/03 Helios-
Klinik Müllheim; Abt. Gynäkologie und Geburtshilfe; 08/03 Institut für Humangenetik und
Anthropologie, Universitätsklinik Freiburg; Genetische Beratungsstelle; 09/03
Universitätsklinik Freiburg; Abt. Dermatologie; 03/04 Famulatur allgemeinärztliche
Landpraxis, Bundenthal /Pf