

**MOLEKULARGENETISCHE UND FUNKTIONELLE
ANALYSEN DES *LRP5*-GENS
BEI EINEM OSTEOPOROSIS-PSEUDOGLIOMA-SYNDROM-
ÄHNLICHEN PHÄNOTYP**

**INAUGURAL-DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES DOKTORGRADES
DER MATHEMATISCH-NATURWISSENSCHAFTLICHEN FAKULTÄT
DER UNIVERSITÄT ZU KÖLN**

VORGELEGT VON
BOIDINH CHUNG
AUS WUPPERTAL

KÖLN 2009

Die vorliegende Dissertation wurde mit der Genehmigung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität zu Köln am Institut für Humangenetik (Direktorin: Prof. Dr. Brunhilde Wirth) der Universität zu Köln unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Thomas Wiehe und Herrn Prof. Dr. Christian Kubisch angefertigt.

Gutachter:

Prof. Dr. Thomas Wiehe

Prof. Dr. Christian Kubisch

Tag der letzten mündlichen Prüfung: 25. Juni 2009

MEINER FAMILIE & OLIVER

INHALTSVERZEICHNIS**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

1	EINLEITUNG	1
1.1	Identifizierung krankheitsverursachender Gene durch positionelle Klonierung	1
1.2	Kopplungsanalysen zur Lokalisierung von Gendefekten	1
1.3	Klinisch-genetische Befunde der Betroffenen aus einer türkischen Familie	3
1.4	Differentialdiagnostisch zu erwägende Syndrome	4
1.4.1	Norrie-Syndrom (ND)	4
1.4.2	Familiäre exsudative Vitreoretinopathie (FEVR)	4
1.4.3	Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndrom (OPPG)	5
1.4.4	Syndrome mit Störungen der Hirn-, Augen- und Muskelfunktion	6
1.5	Differentialdiagnostische Einordnung der klinischen Befunde der untersuchten türkischen Familie	6
1.6	Untypische Klinik der Betroffenen für das OPPG-Syndrom	7
1.7	Das <i>LRP5</i> -Gen	8
1.8	WNT-Signaltransduktionsweg	9
1.8.1	Der kanonische WNT-Signaltransduktionsweg	9
1.9	Ziel der vorliegenden Arbeit	11
2	MATERIAL UND METHODEN	12
2.1	Chemikalien	12
2.2	Verbrauchsmaterialien	12
2.3	Puffer-Lösungen	12
2.4	Kommerzielle Reagenziensysteme	12
2.5	Geräte	13
2.6	Datenbanken	14
2.7	Software	14
2.8	Untersuchungskollektiv	15
2.9	Kontroll-DNA	15
2.10	Isolierung genomischer DNA aus Blut	16
2.10.1	Lösungen für die DNA-Isolierung aus EDTA-Blut	16
2.11	Isolierung von RNA	17
2.11.1	RNA-Isolierung aus humanem Blut mittels <i>PAXgeneTM Blood RNA Kit</i>	17
2.11.2	Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Zellen mittels <i>RNeasy[®] Mini Kit</i>	17
2.12	Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	17
2.13	Genomweite Kopplungsanalyse	18
2.14	Polymerase-Kettenreaktion (<i>polymerase chain reaction</i> , PCR)	19

2.14.1	Primer-Design	19
2.14.2	PCR-Reaktionsansätze	20
2.14.3	PCR-Temperatur-Profile	21
2.15	<i>Rapid Amplification of cDNA-Ends-PCR (RACE-PCR)</i>	22
2.16	Reverse Transkription-PCR (RT-PCR) mittels QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit	23
2.17	Quantitative <i>Real-Time</i> -PCR	24
2.18	Agarose-Gelelektrophorese	26
2.19	Aufreinigung von PCR-Produkten	26
2.20	Sequenzierung von DNA-Fragmenten	27
2.20.1	DNA-Aufreinigung nach einer Sequenzier-Reaktion	28
2.21	PCR-basierter Assay zur Untersuchung von Tandem-Repeats	28
2.22	Expressionsanalysen	29
2.22.1	<i>Multiple-Tissue-cDNA-Panel</i>	29
2.22.2	Northernblot-Analyse	29
2.22.2.1	Substanzen zur Northernblot- Analyse	30
2.23	Klonierung	31
2.23.1	TA-Klonierung mittels des pcDNA3.1 <i>TOPO</i> ® <i>TA Expression Kit</i>	31
2.23.2	Ligation und Transformation	31
2.23.3	DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen (Plasmid-Präparation)	32
2.23.4	Glycerolstock von transformierten Bakterien	32
2.23.5	Medien zur Kultivierung von Bakterien	33
2.24	Restriktionsverdau von DNA mittels Endonukleasen	33
2.25	Einführung von Mutationen in Wildtyp-Expressionsvektoren - PCR-Mutagenese	35
2.26	Zellbiologische Methoden	36
2.26.1	Kultivierung von Säugerzellen	36
2.26.1.1	Medien zur Kultivierung von Säugerzellen	37
2.26.2	Transfektion	37
2.26.2.1	Transfektion von Plasmid-DNA mittels Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen)	37
2.26.2.2	Transfektion von siRNA mittels Dharmafect® (Thermo Scientific)	38
2.26.3	Zell-Ernte und -Lyse	39
2.26.3.1	Lösungen zur Zellernte	39
2.27	Proteinbestimmung	39
2.28	Westernblot-Analyse	39
2.28.1	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	39
2.28.2	Proteintransfer auf eine PVDF-Membran	40
2.28.3	Substanzen zur Western-Blot-Analyse (Amersham Biosciences; Invitrogen)	41
2.28.4	Immunoblot-Chemilumineszenz-Detektion	41
2.28.5	Immunoblot	41
2.28.6	Chemilumineszenz-Detektion	42

2.29	<i>Luciferase Reporter Assay</i>	43
2.30	Quantifizierung der Westernblot-Signalintensitäten	45
2.31	N-Glykosylierung	45
2.32	Ultrazentrifugation	45
2.32.1	Sucrose-Puffer für die Ultrazentrifugation	46
2.33	<i>Secretion Assay</i>	46
2.34	<i>In silico</i> -Analyse von Poly-Leucin-Signalpeptiden im humanen Genom	47
2.35	Statistische Auswertungen	47
3	ERGEBNISSE	48
3.1	Familie #1	48
3.1.1	Genomweite Kopplungsanalyse	48
3.1.2	Sequenzierung von Kandidatengenomen am Locus 11q12.1-13.5	49
3.1.3	Mutations- <i>Screening</i> in <i>LRP5</i>	50
3.1.4	Identifikation einer Mutation im Signalpeptid von <i>LRP5</i>	51
3.1.5	Identifikation einer genomischen Mutation in <i>LRP5</i> (Ex14_16del)	54
3.1.6	RNA-Analysen der <i>LRP5</i> -Ex14_16-Deletion	56
3.1.7	Familiäre Segregation der Mutationen	57
3.1.8	Generierung von verschiedenen <i>LRP5</i> -Mutations-Expressionsvektoren	58
3.1.9	<i>Luciferase Reporter Assay</i> - Signaltransduktion der mutierten <i>LRP5</i> -Rezeptoren	59
3.1.10	N-Glykosylierung - Analyse der posttranslationalen Modifikation von <i>LRP5</i>	60
3.1.11	Subzelluläre Lokalisation des <i>LRP5</i> -Wildtyp- und des mutierten <i>LRP5</i> -Proteins	61
3.1.12	<i>Secretion Assay</i> - Intrazellulärer Transport der mutierten <i>LRP5</i> -Rezeptoren	61
3.2	Poly-Leucin-Stretch im Signalpeptid von <i>LRP5</i>	63
3.2.1	<i>Luciferase Reporter Assay</i> - <i>LRP5</i> -Signaltransduktion	63
3.2.2	Subzelluläre Lokalisation der <i>LRP5</i> -Signalpeptid-Varianten	65
3.2.3	Genomweite Suche nach Poly-Leucin-Signalpeptiden	67
3.3	Familie #2	68
3.3.1	Identifikation einer <i>Splice Site</i> -Mutation in <i>LRP5</i>	68
3.3.2	RNA-Analysen der <i>LRP5</i> - <i>Splice Site</i> -Mutation	71
3.3.3	<i>Luciferase Reporter Assay</i> - <i>LRP5</i> -Signaltransduktion des mutierten Rezeptors	72
3.3.4	<i>Secretion Assay</i> - Intrazellulärer Transport der mutierten <i>LRP5</i> -Rezeptoren	73
3.3.5	Subzelluläre Lokalisation des <i>LRP5</i> -Wildtyp- und des mutierten <i>LRP5</i> -Proteins	73
3.4	<i>LRP5L</i> - Pseudogen	75
3.4.1	Aufklärung der <i>LRP5L</i> -Pseudogen-Struktur	76
3.4.1.1	Datenbank-Analysen	76
3.4.1.2	<i>RACE (Rapid Amplification of cDNA-Ends)</i> -PCR von <i>LRP5L</i>	77
3.4.1.2.1	Bestimmung des 5`-cDNA-Endes von <i>LRP5L</i>	78
3.4.1.2.2	Bestimmung des 3`-cDNA-Endes von <i>LRP5L</i>	79

3.4.2	Expressionsanalysen	81
3.4.2.1	<i>LRP5L</i> -Amplifikation mittels des Multiple-Tissue-cDNA-Panels	81
3.4.2.2	Northernblot-Analyse von <i>LRP5L</i>	82
3.4.3	Klonierung von <i>LRP5L</i> in einen Expressionsvektor	85
3.4.4	Geeignete Zelllinie für funktionelle Analysen	85
3.4.5	<i>Luciferase Reporter Assay</i> zur Analyse des <i>LRP5L</i> -Pseudogens	86
3.4.6	RNA-Interferenz-Analysen zum <i>LRP5L</i> -Pseudogen	88
3.4.6.1	RNAi-Analyse des <i>LRP5L-Knock downs</i> auf das endogene <i>LRP5</i> -Gen	89
3.4.6.2	RNAi-Analyse des <i>LRP5-Knock downs</i> auf das endogene Pseudogen	90
3.4.6.3	Vergleich der endogenen Transkriptexpressionen von <i>LRP5L</i> und <i>LRP5</i>	92
4	DISKUSSION	93
4.1	Familie #1	93
4.1.1	Identifikation von zwei neuartigen Mutationstypen in <i>LRP5</i> bei einem uncharakteristischen Krankheitsbild	93
4.1.2	Pathomechanismus der beiden neu identifizierten Mutationen	94
4.1.3	<i>Alu-Repeat</i> vermittelte Rekombinationen führen zu intragenischen Deletionen	96
4.1.4	Genotyp-Phänotyp-Korrelation	97
4.2	Poly-Leucin-<i>Stretch</i> im <i>LRP5</i>-Signapeptid in der Allgemeinbevölkerung	98
4.2.1	Quantitativer Effekt des polymorphen Leucin- <i>Stretches</i> im <i>LRP5</i> -Signalpeptid	98
4.2.2	Assoziation von Signalpeptid-Längenpolymorphismen mit komplexen humanen Erkrankungen	99
4.2.3	Assoziation von <i>LRP5</i> mit Osteoporose bzw. einer verminderten Knochendichte	101
4.3	Familie #2	103
4.3.2	Identifikation einer pathogenen <i>Splice Site</i> -Mutation in <i>LRP5</i>	103
4.4	Fazit des <i>LRP5</i>-Mutations-Screenings in den beiden türkischen Familien und der funktionellen Analysen der identifizierten <i>LRP5</i>-Veränderungen	104
4.5	<i>LRP5L</i>-Pseudogen	105
4.5.1	Pseudogene	105
4.5.2	Analysen des <i>LRP5L</i> -Pseudogens	106
4.5.2.1	<i>Luciferase Reporter Assay</i> und RNA-Interferenz-Analysen zum <i>LRP5L</i> -Pseudogen	107
5	ZUSAMMENFASSUNG	109
	ABSTRACT	111
6	LITERATURVERZEICHNIS	113
	ANHANG	128
	TEILPUBLIKATIONEN	138
	DANKSAGUNG	139
	LEBENS LAUF	140
	ERKLÄRUNG	141

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

<i>accuTaq</i>	<i>accurate Taq</i> -Polymerase
α	Anti-
AK	Antikörper
APC	<i>adenomatous polyposis coli</i>
BCA	Bicinchoninsäure
bp	Basenpaar
BSA	<i>bovine serum albumin</i> (Rinderserumalbumin)
CBP	CREB-Bindeprotein
CK1	Casein Kinase 1
ddNTP	Didesoxyribonukleotid-5'-Triphosphat
DMEM	<i>Dubecco`s Modified Eagle`s Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dethiothreitol
DSH	<i>Dishevelled</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ENSEMBL	<i>European Bioinformatics Institute (EBI), European Molecular Biology Laboratory (EMBL) und Wellcome Trust Sanger Institute</i>
EtBr	Ethidiumbromid
Ex	Exon
F	<i>Forward</i>
FAM	<i>fluorescein amidite</i>
FCMD	<i>Fukuyama-type congenital muscular dystrophy</i>
FEVR	Familiäre Exsudative Vitreoretinopathie
FKS	Fötale Kälberserum
FZD	<i>Frizzled</i>
GBP	GSK3-Bindeprotein
GSK	Glykogen Synthase Kinase
het	heterozygot
hom	homozygot
HRP	Meerrettich Peroxidase
Ig	Immunglobulin
Ins	Insertion
IVT	Intron
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
LB	Luria-Bertani
LEF	<i>Lymphoid enhancer factor</i>
LOD	<i>logarithm of Odds</i>
LDLR	<i>Low density lipoprotein receptor</i>
LRP5	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein 5</i>
LRP5L	<i>Low density lipoprotein receptor-related protein-like 5</i>

Mb	Megabasen
MCS	<i>Multiple Cloning Site</i>
MEB	<i>Muscle-eye-brain disease</i>
MESDC2	<i>Mesoderm development candidate 2</i>
MLPA	<i>Multiplex ligation-dependent probe amplification</i>
MTC	<i>Multiple-Tissue cDNA</i>
Mut	Mutation
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
ND	<i>Norrie Disease</i>
NDP	<i>Norrin/ Norrie Disease (Pseudoglioma)</i>
OD _n	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame/ offener Leserahmen</i>
P	Phosphorylierung
PAGE	Polyacrylamid-Gel-Elektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
R	<i>reverse</i>
rpm	<i>revolutions per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT	Reverse Transkription
SDS	Natriumdodecylsulfat
Seq	Sequenz/Sequenzierung
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SNP	<i>single nucleotid polymorphism</i>
TAE	Tris-Acetat-EDTA
<i>Taq</i>	<i>Thermus aquaticus</i>
<i>TCF</i>	<i>T-Cell-Factor</i>
TD	<i>Touchdown</i>
TE	Tris-EDTA
T _m	Schmelztemperatur
U	Unit (definierte Einheit der Enzymaktivität)
UCSC	<i>Genome Browser der Genome Bioinformatics Group of UC Santa Cruz</i>
UTR	untranslatierte Region
WNT	<i>wingless</i>
WT	Wildtyp
WWS	Walker-Warburg-Syndrom

1 EINLEITUNG

Kinder von konsanguinen Eltern tragen ein gegenüber der Durchschnittsbevölkerung erhöhtes Risiko, an einer seltenen genetisch bedingten Erkrankung zu leiden. Insbesondere in großen Familien mit mehreren Betroffenen besteht die Möglichkeit, die chromosomale Region des zugrunde liegenden Gendefekts durch eine Kopplungsanalyse zu lokalisieren und anschließend durch eine positionelle Klonierung das ursächliche Gen zu identifizieren. Eine solche Strategie wird im Rahmen dieser Arbeit bei einer konsanguinen türkischen Familie verfolgt, in der drei von insgesamt sieben Kindern gleichartige Fehlbildungen aufwiesen.

1.1 Identifizierung krankheitsverursachender Gene durch positionelle Klonierung

Die positionelle Klonierung ist eine Strategie, um ein Gen mit krankheitsauslösender Veränderung zu identifizieren, wenn außer der Zuordnung des Gens zu einer chromosomalen Teilregion, welche sich z. B. aus Kopplungsdaten ergibt, nichts bekannt ist. Die Identifikation des verantwortlichen Gens erfolgt durch die Suche nach der krankheitsverursachenden Mutation in Kandidatengenen. Bei der Auswahl dieser können ihre relative Position und/oder ihre Funktion berücksichtigt werden. An eine erfolgreiche Mutationssuche schließt sich in der Regel die Klonierung und Funktionsanalyse des identifizierten Gens an. Als Meilenstein und Muster des erfolgreichen positionellen Klonierens gilt die Identifizierung und Isolierung des für die chronische Granulomatose (MIM # 306400) verantwortlichen Gens [Royer-Pokora *et al.*, 1986]. Zahlreiche weitere Erkrankungen, deren Gene erfolgreich durch diese Strategie der Positionsklonierung identifiziert wurden, schlossen sich in den folgenden Jahren an. Beispiele dafür sind die Identifikation des verantwortlichen Gens für die Cystische Fibrose (MIM # 219700), die Hyperglycerinanämie (MIM # 307030) und die Neurofibromatose Typ 1 (MIM # 162200) [Kerem *et al.*, 1989; Walker, Muscatelli and Monaco, 1993; Fountain *et al.*, 1989; Cawthon *et al.*, 1990].

1.2 Kopplungsanalysen zur Lokalisierung von Gendefekten

Kopplung beschreibt die gemeinsame Vererbung (Co-Segregation) von Genen oder DNA-Sequenzen auf einem Chromosom. Je weiter DNA-Abschnitte voneinander entfernt liegen, desto größer ist die Wahrscheinlichkeit einer Trennung dieser Abschnitte durch Rekombination. Nah zusammen liegende Abschnitte werden hingegen mit hoher Wahrscheinlichkeit gemeinsam vererbt. Liegt eine krankheitsverursachende Mutation in einer Familie vor, sollten alle erkrankten Familienmitglieder diese und damit gekoppelt auch die gleiche chromosomale Region um die genetische Veränderung geerbt haben. Zur Aufklärung

der molekularen Ursachen monogener Krankheiten ist die Kopplungsanalyse ein systematischer Ansatz, um die zugrunde liegenden Gene durch eine genomweite Suche chromosomal zu kartieren und daraufhin zu identifizieren bzw. zu klonieren (positionelle Klonierung). Eine solche Kopplungsanalyse erfolgt mit Hilfe von polymorphen genetischen Markern wie Mikrosatelliten (*short tandem repeats*) oder SNPs (*single nucleotide polymorphisms*). Mikrosatelliten sind kurze, sich wiederholende Di-, Tri- oder Tetra-Nukleotid-Sequenzen, die in großer Zahl über das gesamte Genom verteilt sind. Sie eignen sich besonders gut als Marker für genomweite Kopplungsanalysen, da die numerische Anzahl an Wiederholungen von Individuum zu Individuum stark variiert (und Mikrosatelliten damit mit mehreren möglichen Allel-Varianten relativ polymorph sind), aber ihre Vererbung von Eltern zu Kind in der Regel stabil nach den Mendel'schen Regeln erfolgt. Es gibt über 10.000 beschriebene Mikrosatelliten mit bekannter chromosomaler Lokalisation im menschlichen Genom, die sich für Kopplungsanalysen als besonders geeignet erweisen. Die genomweite Analyse erfolgt mit ca. 350-400 Mikrosatelliten-Markern, die in einem Abstand von mehreren Mb voneinander entfernt liegen. SNPs sind biallelische DNA-Varianten, die durch einfache Basensubstitutionen bzw. Punktmutationen gekennzeichnet sind. Etwa drei Millionen solcher in Datenbanken annotierten SNPs sind im menschlichen Genom verteilt, was bedeutet, dass durchschnittlich alle 1000 Nukleotide ein SNP auftritt. Genomweite Kopplungsanalysen mit SNPs werden in Form von etablierten *SNP-Chips* mit zehntausenden bis zu hunderttausenden Markern durchgeführt. Bei einer Kopplungsanalyse bedient man sich solcher Mikrosatelliten oder SNPs als Marker, um chromosomale Regionen, die alle Betroffenen gemeinsam geerbt haben und in denen das Krankheitsgen statistisch gesehen mit hoher Wahrscheinlichkeit liegt, zu lokalisieren. Liegen also ein Mikrosatellit oder ein SNP innerhalb der chromosomalen Region, in der sich die gesuchte genetische Veränderung befindet, wird ein bestimmtes Allel dieses Markers gemeinsam mit der Mutation vererbt. Der Marker bzw. das spezifische Markerallel und die genetische Veränderung (Krankheitsallel) sind folglich miteinander gekoppelt. Ein Maß für die Wahrscheinlichkeit einer genetischen Kopplung zweier Loci ist der *LOD-Score* (*logarithm of odds*), wobei der geforderte Schwellenwert für die Annahme einer Kopplung in der Regel +3 ist. Dies würde einer Wahrscheinlich von 1000 ($= 10^3$) zu 1 entsprechen. Ein Wert unter -2 dagegen gilt als Beleg dafür, dass keine Kopplung vorliegt [Schumacher *et al.*, 2002; Strachan *et al.*, 1996]. Ist mit einer genomweiten Kopplungsanalyse die chromosomale Teilregion für einen Krankheitslokus ermittelt, kann über Genom-Datenbanken nach Kandidatengenen in der gekoppelten Region gesucht werden. In der Regel erfolgt die Identifizierung eines für die Erkrankung verantwortlichen Gens durch Sequenzieren der kodierenden Exone und die Analyse des Pathomechanismus der Erkrankung durch die ursächliche Mutation.

1.3 Klinisch-genetische Befunde der Betroffenen aus einer türkischen Familie

Die im Rahmen dieser Arbeit untersuchte türkische Familie wurde in der Abteilung für Medizinische Genetik der Universität Istanbul rekrutiert und klinisch untersucht.

Der Stammbaum dieser Familie ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Zwei Schwestern aus einem Familienzweig haben zwei Brüder aus einem zweiten Familienzweig geheiratet. Die Großväter der beiden Geschwisterpaare sind Cousins zweiten Grades mit Generationenverschiebung, womit die Verheirateten konsanguin und Cousins dritten Grades sind. Aus den beiden Ehen sind insgesamt sieben Kinder hervorgegangen. Eine Schwangerschaft führte zum Abort (VII:3). Drei dieser Kinder (zwei Jungen und ein Mädchen) weisen Augenfehlbildungen, eine fortschreitende Muskelatrophie und eine milde mentale Retardierung auf, die in dieser Kombination zunächst keinem in der Literatur beschriebenen Syndrom zugeordnet werden konnten.

Die zwei betroffenen Brüder waren im Alter von 11 und 5 Jahren erstmalig in der Klinik vorstellig. Die Augenfehlbildungen äußerten sich in einer Phthisis Bulbi (Schrumpfung und Atrophie des Augapfels) durch eine beidseitige korneale Trübung, Katarakte, einer Irisatrophie, Netzhautablösung und Microphthalmie, was bei den Patienten zu einer vollständigen Erblindung innerhalb ihres ersten Lebensjahres führte. Keiner der beiden Patienten konnte aufgrund der schweren Muskelhypotonie und progressiven Muskelatrophie, insbesondere der Beine, jemals laufen; beide waren auf einen Rollstuhl angewiesen. Außerdem zeigten sie eine milde mentale Retardierung ohne offensichtliche Gehirnfehlbildung. Zusätzlich hat Indexpatient VII:2 eine Microcephalie, auffällig große Ohren sowie einen Hypertelorismus.

Fünf Jahre nach der initialen Untersuchung wurde eine ebenfalls betroffene Cousine dieser beiden Patienten, deren Eltern ebenfalls Cousins dritten Grades waren, geboren. Sie wies wie ihre betroffenen Cousins Augenfehlbildungen, die zur Blindheit führten, eine schwere Muskelhypotonie sowie eine milde mentale Retardierung auf. Die Betroffenen waren zum Zeitpunkt der Rekrutierung 22 (VII:2), 16 (VII:4) und 6 (VII:6) Jahre alt. In der Familie wurde außerdem bei fünf Angehörigen cytogenetisch eine balancierte Translokation [t(6;19)(p11;p13)] nachgewiesen, die sowohl bei betroffenen als auch bei nicht betroffenen Familienmitgliedern vorlag. Da außerdem nur zwei der drei Betroffenen Translokationsträger waren, konnte eine ursächliche Beteiligung dieser cytogenetischen Auffälligkeit an der Entstehung des Fehlbildungssyndromes ausgeschlossen werden. Das Karyogramm eines Translokationsträgers (V:10) ist in Abbildung 7.1 (Anhang) wiedergegeben. In Anbetracht der Familienkonstellation mit Konsanguinität und der Seltenheit des Syndroms lag der Erkrankung mit größter Wahrscheinlichkeit ein autosomal-rezessiver Vererbungsmodus zugrunde.

1.4 Differentialdiagnostisch zu erwägende Syndrome

1.4.1 Norrie-Syndrom (ND)

Kongenitale Pseudotumore der Retina als Folge einer schweren Störung der Augenentwicklung, die zur vollständigen Blindheit führen, wurden 1927 zum ersten Mal als ein seltenes kongenitales Augenfehlbildungs-Syndrom bei Kindern von dem dänischen Augenarzt G. Norrie beschrieben. Charakteristisch für die später als Norrie-Syndrom (ND; MIM # 310600) bezeichnete Erkrankung sind beidseitige retinale Pseudogliome (Retinahyperplasien), eine Atrophie der Iris, Trübungen der Linse (Katarakt) und des Glaskörpers sowie eine korneale Degeneration. Diese ophthalmologischen Symptome, die unmittelbar nach der Geburt auftreten, führen bei den Betroffenen innerhalb der ersten Lebensjahre zu einer vollständigen Erblindung. Des Weiteren sind bei einem Teil der Patienten eine Microphthalmie und eine progressive Hörstörung festzustellen. In etwa der Hälfte der Fälle weisen die Erkrankten eine mentale Retardierung auf. Das diesem schweren, X-chromosomal-rezessiv vererbten Augenfehlbildungs-Syndrom zugrunde liegende Norrin-Gen (*NDP*) ist auf Chromosom Xp11.4 lokalisiert [Chen *et al.*, 1993; Schuback *et al.*, 1995]. Das von *NDP* kodierte Protein Norrin fungiert als Ligand des WNT-Signaltransduktionsweges (Kapitel 1.8), welcher eine wichtige Funktion bei Zell-Zell-Interaktionen während der Embryonalentwicklung hat [Xu *et al.*, 2004; Meitinger *et al.*, 1993; Meindl *et al.*, 1992].

1.4.2 Familiäre exsudative Vitreoretinopathie (FEVR)

Eine sich teilweise phänotypisch mit dem Norrie-Syndrom überlappende, aber mildere Form einer kongenitalen Augenfehlbildung ist die Familiäre Exsudative Vitreoretinopathie (FEVR; MIM # 133780; MIM # 601813; MIM # 305390), eine seltene Dystrophie von Glaskörper und Netzhaut. Sie ist durch eine unvollständige, vorzeitig beendete Entwicklung der peripheren Retina-Gefäße gekennzeichnet. Der Schweregrad der Erkrankung ist von Patient zu Patient sehr variabel. Die Expressivität reicht von minimaler Ausprägung bis hin zu schweren Formen mit Beginn im Kindes- und Jugendalter, die zur vollständigen Blindheit führen. Die Vererbung erfolgt entweder autosomal-dominant, autosomal-rezessiv oder X-chromosomal-rezessiv. Mutationen im *FZD4*-Gen, das den WNT-Rezeptor Frizzled-4 kodiert, in der Chromosomenregion 11q13-23 verursachen etwa 20% der autosomal-dominanten Formen [Robitaille *et al.*, 2002]. Dominant erbliche Formen resultieren auch aus Mutationen in *LRP5* (*Low density lipoprotein receptor-related protein 5*) aus der Region 11q13.4, einem Co-Rezeptor des WNT-Signalweges [Toomes *et al.*, 2004]. Ein weiterer Locus für eine autosomal-dominante Form von Exsudativer Vitreoretinopathie findet sich außerdem in der Region 11p12-13 [Downey *et al.*, 2001]. Die X-chromosomale Form ist mit Mutationen im

Norrin-Gen (*NDP*) in Xp11.4 assoziiert und kann bisweilen nur schwer von der Norrie-Erkrankung unterschieden werden [Chen *et al.*, 1993]. Mutationen in *LRP5* sind die bislang einzige bekannte Ursache einer autosomal-rezessiv erblichen FEVR [Jiao *et al.*, 2004]. Darüber hinaus können *LRP5*-Mutationen dem ebenfalls autosomal-rezessiv erblichen Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndrom (OPPG; MIM # 259770) zugrunde liegen (Kapitel 1.4.3) [Gong *et al.*, 2001]. Bestimmte *Missense*-Mutationen in *LRP5* führen interessanterweise zu autosomal-dominant erblichen Erkrankungen, die mit einer gesteigerten Knochendichte einhergehen, z.B. zur endostealen Hyperostosis (MIM # 144750) [van Wesenbeeck *et al.*, 2003]. Sowohl das FZD4- als auch das LRP5-Protein sind WNT-Rezeptoren [Huang *et al.*, 2004; He *et al.*, 2004]. Die Familiäre Exsudative Vitreoretinopathie ist demnach genetisch heterogen und resultiert aus Mutationen unterschiedlicher Gene, die gemeinsam im WNT-Signaltransduktionsweg agieren [Xu *et al.*, 2004]. Hierdurch wird die zentrale Bedeutung der WNT-Signaltransduktion für die Vaskularisierung des Auges deutlich.

1.4.3 Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndrom (OPPG)

Das seltene, autosomal-rezessive Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndrom (OPPG; MIM # 259770) wurde früher auch als okuläre Form der Osteogenesis Imperfecta bezeichnet. Es ist durch ophthalmologische Merkmale wie Pseudogliome, Microphthalmie, vitreoretinale Anomalien und Phthisis bulbi, die mit einer angeborenen oder sich im frühen Kindesalter manifestierenden Blindheit einhergehen, gekennzeichnet. Betroffene weisen außerdem eine schwere juvenile Osteoporose auf, die aufgrund der geringen Knochendichte durch wiederholte Frakturen zu Immobilität und starken Skelettdeformationen führt. Im Gegensatz zu anderen erblichen juvenilen Knochen-Erkrankungen wie z.B. Osteogenesis Imperfecta (MIM #166210; MIM #610854; MIM #259420) zeigen OPPG-Patienten keine nachweisbaren Defekte der Kollagen-Synthese, anabolen oder katabolen Hormone, Calcium Homeostase oder des enchondralen Wachstums auf [Gong *et al.*, 1996]. Etwa 10% der Betroffenen weisen eine geistige Behinderung auf [Ai *et al.*, 2005]. Zahlreiche ursächliche *Frameshift*-, *Missense*- und *Nonsense*-Mutationen wurden erstmalig von Gong *et al.* im *LRP5*-Gen identifiziert [Gong *et al.*, 2001, Ai *et al.*, 2005; Cheung *et al.*, 2006].

Die durch eine unzureichende Vaskularisierung bedingten Augenfehlbildungen und der gestörte Knochenstoffwechsel dieser Erkrankung liegen einer aberranten Signaltransduktion der WNT/*NDP*-Signalkaskade zugrunde, die diese Prozesse moduliert und in der LRP5 als Co-Rezeptor fungiert [Qin *et al.*, 2005].

1.4.4 Syndrome mit Störungen der Hirn-, Augen- und Muskelfunktion

Drei weitere sehr schwerwiegende, autosomal-rezessiv erbliche Syndrome sind durch typische Augenfehlbildungen, einer Muskeldystrophie und Störungen der Hirnfunktion charakterisiert. Die zugrunde liegenden genetischen Veränderungen sind erst teilweise bekannt. Bei allen drei Syndromen scheint als Pathomechanismus eine gestörte Glykosylierung von Proteinen eine zentrale Rolle zuzukommen. Hinweise auf eine kausale Verbindung dieses Pathomechanismus zur WNT-Signaltransduktionskaskade liegen bislang nicht vor [Michele *et al.*, 2002; Moore *et al.*, 2002; Beltran-Valero De Bernabe *et al.*, 2002; Kobayashi *et al.*, 1998]. Patienten mit *Muscle-eye-brain disease* (MEB; MIM # 253280) weisen in der Regel gravierende Hirnfehlbildungen auf und sind schwer geistig behindert. Von Geburt an leiden sie unter einer hochgradig ausgeprägten Muskelschwäche. Typische ophthalmologische Befunde sind eine starke kongenitale Myopie, ein kongenitales Glaukom sowie eine Retina-Hypoplasie [Santavuori *et al.*, 1989; Taniguchi *et al.*, 2003]. Die *Fukuyama-type congenital muscular dystrophy* (FCMD; MIM # 253800) tritt fast ausschließlich in Japan auf und ist dort eine der häufigsten autosomal-rezessiv erblichen Erkrankungen, die mit einer ausgeprägten Muskelschwäche bei den Betroffenen einhergeht. Die geistige Entwicklung ist ausnahmslos moderat verzögert, und Hirnfehlbildungen treten insbesondere in Form einer Micropolygyrie oder Pachygyrie auf. Bei einem Teil der Patienten finden sich ophthalmologische Befunde wie eine Netzhautablösung oder abnorme Augenbewegungen [Kondo-Iida *et al.*, 1999]. Das *Walker-Warburg-Syndrom* (WWS; MIM # 236670) ist im Hinblick auf die damit einhergehenden Hirnfehlbildungen das folgenschwerste unter den drei hier genannten Syndromen. Betroffene weisen eine Agyrie, einen Hydrocephalus und eine Encephalocoele auf und sterben gewöhnlich in den ersten Lebensmonaten. Neben einer dystrophischen Muskulatur und zum Teil kongenitalen Kontrakturen finden sich außerdem unterschiedliche Augenfehlbildungen wie z.B. Netzhautablösungen bzw. -dysplasien, Lichtundurchlässigkeit der Kornea oder Glaukome [Dobyns *et al.* 1989; Cormand *et al.* 2001].

1.5 Differentialdiagnostische Einordnung der klinischen Befunde der untersuchten türkischen Familie

Die in Kapitel 1.3 beschriebenen ophthalmologischen Befunde der betroffenen Familienmitglieder ließen sich den behandelnden Augenärzten der Universitätsklinik Istanbul zufolge am ehesten mit der Diagnose einer Norrie-Erkrankung vereinbaren. Dieses Syndrom schied jedoch aus formal-genetischen Gründen aus, da es ausschließlich X-chromosomal-rezessiv vererbt wird. Darüber hinaus wurde bereits durch eine direkte Sequenzierung von *NDP* anhand der verfügbaren Patientenproben in der Abteilung für Medizinische Genetik der Universität Istanbul eine krankheitsverursachende Mutation im Norrie-Gen ausgeschlossen.

Trotz der starken Parallelen zu ND war die Diagnose FEVR aufgrund der bei den Betroffenen vorliegenden mentalen Retardierung und muskulären Symptomatik nicht zutreffend. Eine Muskelatrophie ist weder für ND noch für FEVR beschrieben, eine mentale Retardierung nur für ND. Die Klinik der drei in Kapitel 1.4.4 vorgestellten autosomal-rezessiv erblichen Syndrome mit Augen-, Muskulatur- und ZNS-Beteiligung (MEB, WWS und FCMD) ist im Hinblick auf die neurologische und muskuläre Symptomatik deutlich stärker ausgeprägt als es in der hier beschriebenen Familie der Fall ist. Die Augenveränderungen überlappen sich nur teilweise. Die Zuordnung zum WWS konnte in Anbetracht des ausgesprochen schweren, früh-letalen Verlaufes dieses Syndromes als unwahrscheinlich gelten, da die Betroffenen der türkischen Familie zum Zeitpunkt der Rekrutierung bereits 22, 16 und 6 Jahre alt waren. Eine eindeutige Zuordnung der in der türkischen Familie erhobenen klinisch-genetischen Befunde zu einem bekannten Syndrom war demnach zunächst nicht möglich. Demzufolge wurde zu Beginn dieser Arbeit davon ausgegangen, dass in der Familie wahrscheinlich ein neues, bisher noch nicht beschriebenes Syndrom vorlag, dessen ursächliche Genveränderung im Rahmen dieser Arbeit positionell kloniert werden sollte.

1.6 Untypische Klinik der Betroffenen für das OPPG-Syndrom

Neue Erkenntnisse über die Symptomatik der untersuchten türkischen Familie erschlossen sich erst nach Durchführung der genomweiten Kopplungsanalyse. Und zwar wurde bei einem der betroffenen Jungen, von dem bislang nur bekannt gewesen war, dass er in der Kindheit einmalig einen Armbruch erlitten hatte, radiologisch eine Osteoporose diagnostiziert. Auch bei den zwei weiteren Betroffenen wurde im Nachhinein von mehreren Frakturen nach geringen Verletzungen berichtet, was ebenfalls auf eine juvenile Osteoporose hindeutet. Angesichts dieser Erkenntnisse und der Augenfehlbildungen ließ sich bei allen drei Betroffenen offenbar das Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndrom als Differentialdiagnose stellen. Sie weisen allerdings eine untypische OPPG-Klinik auf, da die Betroffenen weder ein Pseudogliom der Augen noch eine für dieses Syndrom typische schwere, deformierende Osteoporose aufzeigen. Die Patienten waren nicht aufgrund von multiplen und schlecht heilenden Knochenfrakturen, die zu schweren Knochendeformationen führen, auf einen Rollstuhl angewiesen. Viel mehr hatten sie wegen ihrer schweren Muskelhypotonie nie Laufen gelernt. Eine schwere progressive Muskelatrophie und eine mentale Retardierung zählen jedoch nicht zum typischen Symptomspektrum des OPPG-Syndroms.

1.7 Das *LRP5*-Gen

Da Mutationen im *LRP5*-Gen (*Low density lipoprotein receptor-related protein 5*; NM_002335) unter anderem für das OPPG-Syndrom und die Familiäre Exsudative Vitreoretinopathie (FEVR) verantwortlich sind, zu denen der Phänotyp der zu untersuchenden türkischen Familie eine deutliche Überlappung aufweist, stellte dieses ein besonders gutes Kandidatengen für das dieser Familie zugrunde liegenden Fehlbildungssyndrom dar. Das *LRP5*-Gen ist auf Chromosom 11q13.4 lokalisiert und gehört zur *Low density lipoprotein* (LDL) Rezeptorfamilie. Als Co-Rezeptor des WNT-Signaltransduktionsweges spielt LRP5 in dieser Signalkaskade eine essentielle Rolle. Seine 23 Exons kodieren für einen 1.615 Aminosäuren umfassenden Typ 1 *Single pass*-Transmembranrezeptor. Die ersten 28 Aminosäuren am N-Terminus des Rezeptors kodieren für ein Signalpeptid, welches durch Erkennung des *Signal Recognition Particles* (SRP) den Transport in das Endoplasmatische Reticulum vermittelt, wo es cotranslational eingebaut, posttranslational modifiziert und von dort in die Plasmamembran eingegliedert wird. Der extrazelluläre Teil des Rezeptors enthält im Einzelnen vier Domänen aus sich wiederholenden YWTD-Motiven, die im Rezeptor eine β -Propeller-Struktur formen und jeweils einem *EGF-like-Repeat* (*Epidermal growth factor*). Darauf folgen drei Ligandenbindende LDL-Rezeptor-Domänen, eine Transmembran- und eine cytoplasmatische Domäne, in der sich sogenannte PPPSP-Motive befinden, deren Serine phosphoryliert werden können und somit als Bindestellen für Proteine fungieren [Herz *et al.*, 2002; Toomes *et al.*, 2004; Qin *et al.*, 2005; Sobrado *et al.*, 2005].

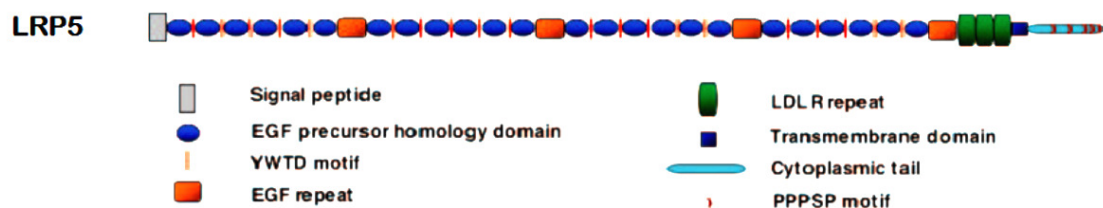


Abb. 1.1: Schematische Darstellung von LRP5 [Ai *et al.*, 2005].

In Anbetracht der durch *LRP5*-Mutationen verursachten Syndrome OPPG, FEVR, wie auch Erkrankungen, die mit einer erhöhten Knochendichte einhergehen, spielt LRP5 in seiner Funktion als Co-Rezeptor im WNT-Signalweg im Knochenstoffwechsel und bei der Vaskularisierung des Auges eine bedeutende Rolle [van Wesenbeeck *et al.*, 2003; Boyden *et al.*, 2002].

1.8 WNT-Signaltransduktionsweg

Der WNT-Signaltransduktionsweg reguliert zahlreiche Zielgene, die für grundlegende Prozesse während der Embryonalentwicklung, Differenzierung, Proliferation und Morphogenese sowie bei der Regulation der Zellmotilität und Apoptose von Bedeutung sind [Wodarz und Nusse, 1998]. In der adulten Phase kann hingegen eine verstärkte Aktivierung vieler dieser Zielgene zu einer Tumorprogression führen [Nusse *et al.*, 1990].

Der Name WNT wurde von dem *Drosophila*-Gen *wingless* (*Wg*), einem für die Embryonalentwicklung wichtigen Gen, und dessen murinen Ortholog *mouse mammary tumor virus* (MMTV) *integration site family member 1* (*int-1*), einem Protoonkoprotein, abgeleitet [Sharma and Chopra, 1976; Rijsewijk *et al.*, 1987]. Die den Signaltransduktionsweg stimulierenden WNT-Proteine gehören zur Familie der sezernierten, cysteinreichen Glykoproteine, welche aus sezernierten Formen längerer Vorläuferproteine durch Abspaltung N-terminaler hydrophober Signalpeptide hervorgehen. Bisher sind 19 humane WNT-Proteine beschrieben. Die Bindung von WNT an seine Transmembranrezeptoren führt zu intrazellulären Signalereignissen, die über Phosphorylierung von Zielproteinen die transkriptionelle Regulation von Zielgenen beeinflussen.

1.8.1 Der kanonische WNT-Signaltransduktionsweg

Von den bekannten WNT-Signaltransduktionskaskaden ist der β -Catenin-abhängige, kanonische Signalweg am besten untersucht. Unter dem Aspekt, dass die an ND, OPPG und FEVR beteiligten Gene bzw. Proteine NDP, LRP5 und FZD4 wichtige Komponenten dieses WNT-Signaltransduktionsweges sind, spielt diese Kaskade im Rahmen dieser Arbeit eine wesentliche Rolle und wird im Folgenden näher erläutert. Eine schematische Darstellung dieses Signalweges ist in Abbildung 1.2 dargestellt.

Das zentrale Element der kanonischen WNT-Signalkaskade ist β -Catenin, dessen zelluläre Konzentration durch diesen Signalweg reguliert wird. β -Catenin selbst wiederum kontrolliert durch Bindung an einen Transkriptionsfaktor im Zellkern die Transkription zahlreicher Zielgene. Befinden sich die Transmembran-Rezeptoren Frizzled (FZD) und LRP5/6 in einem inaktiven Zustand, erfolgt intrazellulär eine Bindung der Proteine Axin, GSK3 (Glykogen-Synthase-Kinase 3) und APC (adenomatöse Polyposis coli) an β -Catenin. Dieser ternäre Komplex induziert einen Ubiquitin-vermittelten proteolytischen Abbau von β -Catenin [Farr *et al.*, 2000; Salic *et al.*, 2000], indem die Kinasen dieses Komplexes β -Catenin phosphorylieren und folglich für den Abbau markieren [Aberle *et al.*, 1997]. Dadurch ist die β -Catenin-Konzentration im Cytoplasma so gering, dass β -Catenin nicht in den Zellkern gelangen kann, um dort an den Transkriptionsfaktor TCF (*T-cell-factor*) oder LEF (*Lymphoid enhancer factor*) zu binden und die Transkription seiner Zielgene zu initiieren. Stattdessen wird deren Transkription reprimiert [Brannon *et al.*, 1997].

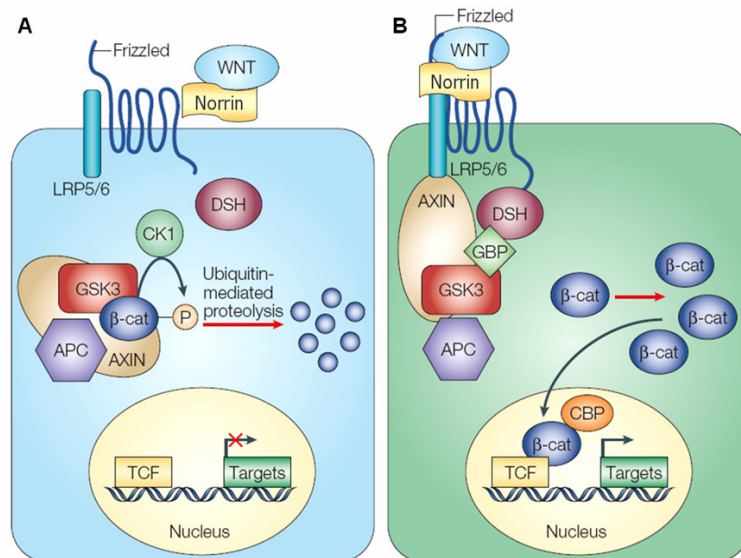


Abb. 1.2: Schematische Darstellung der kanonischen WNT/NDP-Signaltransduktion in der klassischen Abfolge von Protein-Protein-Interaktionen. **A:** Bei ungebundenem WNT oder NDP an FZD und LRP5/6 vermittelt der ternäre Axin-APC-GSK3-Komplex eine β -Catenin-Phosphorylierung, die zum proteolytischen Abbau von β -Catenin im Cytosol führt. Dadurch kann β -Catenin nicht in den Zellkern gelangen, um dort an einen TCF/LEF-Transkriptionsfaktor zu binden und die Transkription seiner Zielgene zu initiieren. **B:** Nach Aktivierung der WNT-Signaltransduktion durch Bindung von WNT und/oder NDP an den Rezeptor FZD oder Co-Rezeptor LRP5/6 und der sich anschließenden Komplexbildung von WNT/NDP-FZD-LRP unterbleibt die Phosphorylierung von β -Catenin, indem der Axin-GSK-APC-Komplex inaktiviert wird. Dadurch steigt der β -Catenin-Spiegel im Cytosol, so dass β -Catenin akkumuliert und in den Zellkern gelangt. Dort bindet es an den T-Zell-Faktor (TCF) und initiiert durch seine transaktivierende Domäne die Transkription seiner Zielgene. APC = *adenomatous polyposis coli*; β -cat = β -Catenin; CBP = CREB-Bindeprotein; CK1 = Casein Kinase 1; DSH = *Dishevelled*; GBP = GSK3-Bindeprotein; GSK = Glykogen Synthase Kinase; LRP = *Low Density Lipoprotein* Rezeptorprotein; P = Phosphorylierung; TCF = *T-Cell-Factor*. [Moon *et al.*, 2004; modifiziert].

Um den kanonischen Signaltransduktionsweg zu aktivieren, muß ein WNT-Protein simultan mit einem Frizzled-Rezeptor und dem Co-Rezeptor LRP5/LRP6 interagieren. Durch Bildung eines extrazellulären WNT-FZD-LRP5/6-Komplexes [Bhanot *et al.*, 1996; Tamai *et al.*, 2000; Xu *et al.*, 2004] kann die intrazelluläre Domäne der FZD-Rezeptoren mit *Dishevelled* (DSH) interagieren [Chen *et al.*, 2003; Huang *et al.*, 2004]. DSH rekrutiert anschließend den Axin-APC-GSK3-Komplex an die Zellmembran, wodurch dieser Abbaukomplex inaktiviert wird [Habas *et al.*, 2005; Malbon *et al.*, 2006; Wallingford *et al.*, 2005]. Ein anderer Weg der Inaktivierung des Axin-APC-GSK3-Komplexes erfolgt durch eine induzierte Phosphorylierung am Serin des cytoplasmatischen PPPSP-Motives von LRP5, so dass dieses an Axin bindet [Mao *et al.*, 2001; Tamai *et al.*, 2004]. Somit werden die Phosphorylierung und der proteolytische Abbau von β -Catenin aufgehoben. Dies führt zu einer Akkumulation von β -Catenin im Cytosol und seiner Translokation in den Zellkern, wo es unter anderem mit Transkriptionsfaktoren oder LEF Komplexe bilden kann. Als Folge hiervon initiiert die transaktivierende Domäne von β -Catenin im Komplex mit TCF/LEF eine aktive Transkription der Zielgene des WNT-Signaltransduktionsweges [Behrens *et al.*, 1996; Clevers, 2004; Tolwinski und Wieschaus, 2004].

Ein weiterer extrazellulärer Ligand für den Frizzled-4-Rezeptor ist Norrin (NDP). Xu *et al.* wiesen diesem Protein eine bislang unbekannte Funktion im WNT-Signaltransduktionsweg zu [Xu *et al.*, 2004]. Es bindet wie WNT an den Rezeptor FZD4 und bildet gemeinsam mit LRP5 auf die gleiche Weise einen Komplex, wodurch ebenfalls eine Signaltransduktion entlang der WNT-Signalkaskade initiiert wird. Norrin stellt dadurch einen bedeutenden Faktor der WNT-Signaltransduktion dar und spielt bei der embryonalen Entwicklung des Auges eine wichtige Rolle [Clevers, 2004].

Aufgrund der zentralen Bedeutung von Norrin innerhalb dieser Kaskade wird im Rahmen dieser Arbeit der Begriff WNT/NDP-Signaltransduktionsweg verwendet.

1.9 Ziel der vorliegenden Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war die positionelle Klonierung des Gens, das dem in der türkischen Familie (Familie #1) diagnostizierten Fehlbildungssyndrom zugrunde liegt. Aufgrund der Konsanguinität der Eltern der Betroffenen und der Seltenheit des Syndroms war am ehesten davon auszugehen, dass die Erkrankung auf eine *Founder*-Mutation bei einem gemeinsamen Vorfahren der Eltern zurückzuführen ist, die bei den Betroffenen in homozygoter Form vorliegt. Eine *Compound*-Heterozygotie wurde jedoch insbesondere aufgrund der eher weitläufigen Verwandtschaft nicht ausgeschlossen. Ausgehend von einer genomweiten Kopplungsanalyse (Kapitel 1.2 und 3.1.1) sollten Kandidatengene innerhalb des/der ermittelten Loci durch bioinformatische Methoden identifiziert und auf genomischer DNA-Ebene nach PCR-Amplifikation direkt sequenziert werden. Gene, denen anhand der Datenbank-Recherche ein auf das beschriebene Fehlbildungssyndrom passendes Expressionsmuster zugewiesen werden konnte, waren besonders gut als Kandidatengene geeignet. Aufgrund der phänotypischen Überlappung des Fehlbildungssyndroms in der türkischen Familie mit ND, OPPG und FEVR und der Bedeutung des WNT-Signalweges bei der Vaskularisierung des Auges galt gleiches auch für Gene, die für Proteine des WNT-Signaltransduktionsweges kodieren (Kapitel 1.8 und 3.1.2).

Im Falle der Identifizierung des gesuchten Gens sollte die vollständige cDNA in einen geeigneten Expressionsvektor kloniert werden, um Analysen zur Funktion des Wildtyp- und im Vergleich dazu des mutierten Proteins durchzuführen. Es sollte damit der molekulare und zelluläre Pathomechanismus der Mutation aufgeklärt werden. Aufgrund der zwischenzeitlich gestellten Differentialdiagnose des Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndroms, welches in dieser Familie mit einer eher untypischen Klinik einhergeht, stellte das *LRP5*-Gen ein besonders gutes Kandidatengen dar.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien

Alle Standardchemikalien, organische Substanzen und Lösungsmittel mit der Qualitätsbezeichnung „pro analysis“ wurden von folgenden Firmen bezogen:

Amersham	Freiburg	New England Biolabs	Frankfurt a. M.
Applichem	Darmstadt	PerkinElmer	Massachusetts/USA
BD Biosciences Clontech	Heidelberg	Pierce	Rockford/ USA
GE Healthcare	München	Promega	Mannheim
Invitrogen	Karlsruhe	Roche	Mannheim
Merck	Darmstadt	Sigma-Aldrich	Taufkirchen
Metabion	Martinsried	Stratagene	La Jolla/USA

2.2 Verbrauchsmaterialien

Verbrauchsmaterialien wie Reaktionsgefäße und Kunststoffwaren wurden von den Firmen Greiner (Frickenhausen) und Sarstedt (Nümbrecht) bezogen.

2.3 Puffer-Lösungen

Für große Ansätze von Puffern, Lösungen und Medien wurde destilliertes Wasser (A. dest) oder Reinstwasser (Millipore) verwendet. Für Reaktionen mit geringen Wasservolumina von bis zu 2 ml wurde steril-filtriertes, DNase und RNase freies Wasser der Firmen Sigma und Qiagen eingesetzt. Bei erforderlicher pH-Wert-Einstellung erfolgte dies mit NaOH bzw. HCl.

2.4 Kommerzielle Reagenziensysteme

<i>Amersham™ Ready-To-Go™ DNA Labelling Beads (-dCTP)</i>	GE Healthcare
BCA Protein Assay Reagent	Pierce
<i>BigDye® Terminator v1.1 Cycle Sequencing Kit</i>	ABI
<i>Dual-Luciferase® Reporter Assay System</i>	Promega
<i>GenElute™ Plasmid Mini-Prep Kit</i>	Sigma
<i>HiSpeed® Plasmid Midikit</i>	Qiagen
<i>PAXgene™ Blood RNA Kit</i>	PreAnalytix
<i>RNeasy® Mini Kit</i>	Qiagen
<i>QIAGEN® OneStep RT-PCR Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick® PCR Purification Kit</i>	Qiagen
<i>QIAquick® Gel Extraction Kit</i>	Qiagen
<i>QuantiTect™ SYBR® Green RT-PCR-Kit</i>	Qiagen
<i>Marathon-Ready™ cDNA Kit</i>	Clontech
<i>TOPO TA Cloning® Kit</i>	Invitrogen

2.5 Geräte

Tab. 2.1: Modelle der verwendeten Geräte und ihre Hersteller

Gerät	Modell	Hersteller
Autoklav	Dampfsterilisatoren Varioklav®	H + P Labortechnik
Brutschrank	HeraCell 150	Heraeus
Bunsen-/Gasbrenner	Fireboy plus	IBS (Integra Biosciences)
Elektrophoresekammern	Sub-Cell GT	BioRad
	X-Cell Sure Lock	Invitrogen
Entwicklermaschine	Curix 60	Agfa
Geigerzähler	LB124	Berthold
Gel-Dokumentationssystem	Chemidoc XRS	BioRad
Heiz-/ Magnetrührplatte	RCT basic	IKA
Hybridisierungsschrank	Herahybrid 12	Heraeus
Inkubationsschüttler	Series 25	New Brunswick Scientific
Kreisschüttler	GFL 3015	GFL
Kühl- und Gefrierschrank		Bosch
Luminometer	Glomax96 Microplate Luminometer	Promega
Mikroskop	Leica DMIL	Leica
Nukleinsäure-Meßgerät	Nanodrop: ND-1000 Spektrometer	PeqLab
pH-Meßgerät	inoLab pH Level 1	WTW
Pipettierhilfen	CellMatell	Matrix
	HandyStep	Brand
	Impact2	Matrix
	Research(Pro)	Eppendorf
Real-time PCR System	7500 Real Time PCR System(Taq-Man)	AppliedBiosystems
Reinstwasseranlage	Milli-Q; Q-Gard® 2	Millipore
Rollator	Roller mixer SRT1	Stuart
Sequenzierer	ABI Prism 3100 Genetic Analyzer	Applied Biosystems
Spannungsgeräte	PowerPac Basic	Bio-Rad
	Power Ease500	Invitrogen
Sterile Werkbank	Hera Safe	Heraeus
Thermocycler	Gene Amp PCR System 9700	Applied Biosystems
	iCycler	BioRad
Thermomixer	Compact	Eppendorf
Tischschüttler	KS 260 basic	IKA
Transfermodul	X-Cell II Blot-Modul	Invitrogen
UV-Kammer	GS Gene Linker UV Chamber	Bio Rad
Vortex	Reax Top	Heidolph
	MS1	IKA
Waagen	AccuLab Vicon	Sartorius
	ARJ 120-4M	Kern
Wasserbad	WB22	Memmert
Zentrifugen	Multifuge1 S-R	Heraeus
	Centrifuge 5415D	Eppendorf
	Centrifuge 5415R	Eppendorf
	Galaxy Mini	VWR
	Allegra X-22R	Beckman Coulter
	Optima™ Max Ultracentrifuge	Beckman Coulter

2.6 Datenbanken

BDGP (<i>Splice Site</i> -Prädiktion)	http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html
BioTools: wwwtacg v3.0	http://biotools.umassmed.edu/tacg/WWWtacg.php
CBS Prediction Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/
DKFZ	http://www.dkfz.de
Ensembl	http://www.ensembl.org/index.html
Human Genome Variation Society	http://www.hgvs.org/mutnomen/
NEB	http://tools.neb.com/NEBcutter2/index.php http://rebase.neb.com/rebase/rebase.html
NCBI	http://www.ncbi.nlm.nih.gov http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/
NCBI-BLAST	http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/
SignalP 3.0 Server	http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/
RepeatMasker	http://www.Repeatmasker.org
RZPD	http://www.rzpd.de
UCSC – Genome Browser	http://genome.cse.ucsc.edu/index.html
UCSC-BLAT	http://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgBlat

2.7 Software

<i>Chromas Lite Version 2.0</i>	Conor McCarthy
<i>Cyrillic Version 2.1</i>	Cyrillic.Inc
<i>DNASTAR Lasergene SeqMan Pro</i>	SeqMan.Inc
<i>iCycler Version 4.006</i>	Biorad
<i>GeneAmp PCR System 9700 Version 2.01</i>	ABI
<i>GeneScan Analysis Software 3.7</i>	Applied Biosystems
<i>Glomax Version 1.6.0</i>	Promega
<i>Microsoft Office 2003</i>	Microsoft
<i>Sequencing Analysis Version 3.7</i>	ABI
<i>7500 System Sequence Detection Software V1.2</i>	Applied Biosystems
<i>Vector NTI Suite 9</i>	Informax 2003

2.8 Untersuchungskollektiv

Der Stammbaum der türkischen konsanguinen Familie ist in Abbildung 2.1 dargestellt. Die im Rahmen dieser Arbeit molekulargenetisch untersuchten Individuen sind mit Ziffern neben bzw. unter ihren Stammbaumsymbol (Quadrat = männlich bzw. Kreis = weiblich) versehen. Genomische Patienten-DNA und -RNA wurde aus Leukozyten des peripheren Blutes gewonnen. Die Eltern der drei betroffenen Kinder sind Cousin und Cousine dritten Grades. Die Betroffenen sind aufgrund von Augenfehlbildungen (Phthisis Bulbi, Irisatrophie, Katarakt, beidseitige korneale Trübung, Netzhautablösung, Mikrophthalmie) blind und weisen eine schwere Muskelhypotonie und progressive Muskelatrophie mit Betonung der unteren Extremitäten, eine milde mentale Retardierung sowie eine juvenile Osteoporose ohne stark deformierende Skelettveränderungen auf (Kapitel 1.3 und 1.6). Eine weitere Schwangerschaft führte zum Abort (VII:3; hier nicht dargestellt). In der Familie wurde außerdem bei fünf Angehörigen cytogenetisch eine balancierte Translokation nachgewiesen, die sich sowohl bei betroffenen als auch bei nicht betroffenen Familienmitgliedern findet und als ursächlich ausgeschlossen wurde, da sie bei nur zwei der drei Betroffenen vorlag. Das Karyogramm eines Translokationsträgers ist in Abbildung 7.1 (Anhang) wiedergegeben.

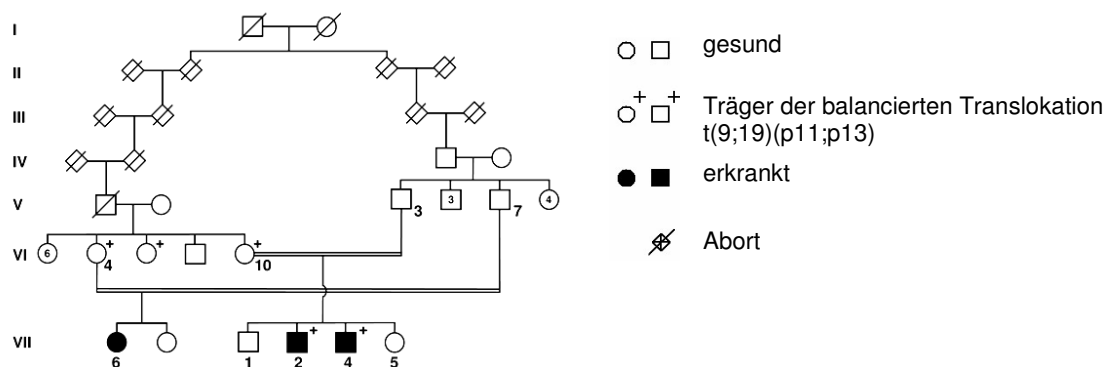


Abb.2.1: Stammbaum der konsanguinen türkischen Familie mit drei betroffenen Individuen (VII:2, VII:4 und VII:6). Klinische Symptomatik: Augenfehlbildung, Muskelatrophie, leichte mentale Retardierung und juvenile Osteoporose. Träger einer balancierten Translokation $t(9;19)(p11;p13)$ sind mit einem + gekennzeichnet. Diese fand sich sowohl bei betroffenen als auch bei nicht betroffenen Familienmitgliedern und war aufgrund des Auftretens bei nur zwei der drei Betroffenen als ursächlich ausgeschlossen worden.

2.9 Kontroll-DNA

Genomische Kontroll-DNA oder -RNA stammt von gesunden Kontroll-Personen aus dem Blutspende-Dienst des Universitätsklinikums Bonn bzw. aus der Abteilung für Medizinische Genetik der Universität Istanbul (Türkei). Genomische Kontroll-DNA und -RNA wurde aus Leukozyten des peripheren Blutes gewonnen.

2.10 Isolierung genomischer DNA aus Blut

Eukaryotische Zellkulturen sowie Gewebe werden durch salz- und EDTA-haltige Puffer sowie Natriumdodecylsulfat (SDS) aufgeschlossen und anschließend mit Proteinase K behandelt [Miller *et al.*, 1988]. Essentieller Schritt dieser Methode ist der proteolytische Abbau der Zellproteine durch diese Serinprotease. Bei der DNA-Isolierung aus Blut gehen dieser Proteolyse die Entfernung der kern- und damit DNA-losen Erythrocyten sowie der Membranbestandteile und cytoplasmatischer Proteinen voraus. Die Fällung der DNA wird schließlich durch Ethanol erreicht. Jede im Rahmen dieser Arbeit verwendete Blutprobe war nach Abnahme mit EDTA versetzt worden, um eine Blutgerinnung zu verhindern. Dieses EDTA-Blut wurde in einem neuen Röhrchen mit Lysispuffer versetzt, mehrmalig invertiert und 15 min auf Eis inkubiert. Die so lysierten Erythrocyten wurden durch Zentrifugation für 15 min bei 1500 rpm (4°C) mit dem Überstand entfernt und die Leukocyten pelletiert. Zur Kernlyse der Leukozyten wurde das Pellet in Kernlysispuffer resuspendiert, mit SDS (20%) und Proteinase K (10 mg/ml) versetzt und anschließend bei 37°C über Nacht im Wasserbad inkubiert. Durch Zugabe von NaCl (6 M) wurde die DNA ausgesalzt, indem die Probe heftig geschüttelt und zweimal für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert wurde. Letzter Schritt der DNA-Isolierung war die Ethanolfällung, bei der der Überstand in ein neues Röhrchen überführt und mit zweifachen Volumen Ethanol (absolut) überschichtet wurde. Durch langsames Invertieren des Röhrchens wurde die DNA zu einem Faden konzentriert, welcher mittels eines Glashäkchens aufgewickelt wurde. Dieser DNA-Faden wurde in 70%igem Ethanol gewaschen, ausreichend abgetupft und schließlich in TE-Puffer überführt. Die Konzentrationsmessung erfolgte nach mindestens sieben Tagen Aufbewahrung im Kühlschrank, nachdem sich die DNA vollständig im TE-Puffer gelöst hatte. Die DNA-Proben wurden in Stocklösungen bei -20°C aufbewahrt. Gebrauchslösungen von 10 ng/µl wurden durch Verdünnung mit HPLC-Wasser angefertigt.

2.10.1 Lösungen für die DNA-Isolierung aus EDTA-Blut

6 M NaCl

20 % SDS

Proteinase K

Lysispuffer pH 7,4

155 mM NH₄Cl

10 mM KHCO₃

0,1 mM Na₂EDTA

HPLC-Wasser

Kernlysispuffer pH 8,2

10 mM Tris/HCl

400 mM NaCl

2 mM Na₂EDTA

HPLC-Wasser

TE-Puffer pH 8,0

1 M Tris-HCl

0,5 M EDTA

HPLC-H₂O

2.11 Isolierung von RNA

Aufgrund der chemischen Instabilität von RNA und ubiquitär vorkommenden stabilen RNasen erfordert das Arbeiten mit RNA besondere Vorkehrungen. Zur Minimierung des Risikos der katalytischen Hydrolyse wurde der Arbeitsplatz sowie alle verwendeten Pipetten und andere Hilfsmittel vor dem Gebrauch mit Aqua dest., Ethanol (70%) und *RNase-Away*-Lösung (Applichem) gereinigt. Zusätzlich wurden nur für das Arbeiten mit RNA vorhergesehene Boxen mit gestopften Pipettenspitzen verwendet, die RNase-frei waren.

2.11.1 RNA-Isolierung aus humanem Blut mittels *PAXgene™ Blood RNA Kit*

Zur Isolierung von RNA aus Blut wurde das *PAXgene™ Blood RNA Kit* der Firma PreAnalytix verwendet. Die RNA-Isolierung erfolgte nach dem Protokoll des Herstellers.

2.11.2 Isolierung von Gesamt-RNA aus tierischen Zellen mittels *RNeasy® Mini Kit*

Zur Isolierung von RNA aus tierischen Zellen (Hek293T) wurde das *RNeasy® Mini Kit* von der Firma Qiagen verwendet. Wie bei der RNA-Isolierung aus Blut kombiniert diese Methode die selektiven Bindungseigenschaften einer Silica-Gel-Membran mit der schnell und einfach durchzuführenden Mikrozentrifugationstechnik. Das vom Hersteller mitgelieferte Puffersystem ermöglicht die Bindung von RNA an die RNeasy Silica-Gel-Membran. Die RNA wurde nach den Angaben des Hersteller-Protokolls isoliert.

2.12 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren kann aufgrund der Proportionalität von Lichtabsorption und Konzentration photometrisch bestimmt werden. Hierfür wird die Absorption bei 260 nm gemessen, was dem Absorptionsmaximum der Nukleinsäurebasen entspricht. Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren (DNA, RNA, aufgereinigte PCR-Produkte, Kapitel 2.19, aufgereinigte Plasmid-DNA, Kapitel 2.23.3) erfolgte mit dem NanoDrop ND-1000 (PeqLab).

$$OD_{260} = \text{RNA/DNA}$$

$$OD_{280} = \text{Protein}$$

$$OD_{260/280} = \text{Reinheit der RNA/DNA}$$

Während die bei 260 nm gemessene Absorption die RNA/DNA-Konzentration wiedergibt, zeigt der Quotient aus A_{260}/A_{280} die Reinheit einer Nukleinsäure an. Werte zwischen 1,8 und 2,0 sprechen für eine reine Probe. Niedrigere Werte weisen auf eine Verunreinigung durch Proteine hin.

2.13 Genomweite Kopplungsanalyse (*Linkage Analysis*)

Die genomweite Kopplungsanalyse wurde mittels eines *GeneChip[®] Human Mapping 10K Arrays Xba142* (Affimetrix, Santa Clara, CA) am Max-Dellbrück-Centrum (MDC) für Molekulare Medizin in Berlin in Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von Prof. Peter Nürnberg durchgeführt.

Die eingesetzte *Affymetrix-GeneChip*-Technologie ermöglicht die simultane Untersuchung zehntausender bis zu hunderttausender SNPs auf nur einem *Array*. Der im Rahmen dieses Projektes verwendete *Affymetrix Human Mapping 10 K Array* enthielt 10.204 SNPs (Version 2.0), womit die Abstände der SNPs dieses *Arrays* zueinander im Schnitt 258 kb (0,38 cM) betragen. Für die genomweite Kopplungsanalyse wurden neun verfügbare genomische DNA-Proben der zu untersuchenden türkischen Familie eingesetzt. Pro *Array* wurden 250 ng genomische DNA als Startmaterial eingesetzt. Diese wurde mit Restriktionsenzymen verdaut und mit Adapter-Molekülen ligiert. Mit einem einheitlichen Primer, der diese Adapter-Sequenz erkannte, wurde die DNA selektiv per PCR amplifiziert. Diese wurde anschließend fragmentiert, mit Biotin markiert und über Nacht mit dem *Array* hybridisiert. Schließlich wurden diese *GeneChips[™]* mittels eines Streptavidine-Phycoerythrin-Konjugates in einem *Array-Scanner* detektiert. Die Analyse und Auswertung der Genotypen erfolgte über die *Affymetrix[™] Software GDAS 2.0* am MDC und mit Hilfe der Programme *Graphical Relationship Representation* [Abecasis *et al.*, 2001], *PedCheck* [O'Connell and Weeks, 1998] und *MERLIN* [Abecasis *et al.*, 2002]. Die parametrische Analyse wurde mit einer modifizierten Version von *GENEHUNTER 2.1* [Kruglyak *et al.*, 1996; Strauch *et al.*, 2000] durchgeführt. Dabei wurden schrittweise Sets von je 100 bis 110 SNPs unter der Annahme eines autosomal-rezessiven Krankheitsbildes mit kompletter Penetranz und einer Allelfrequenz von 0,0001 analysiert. Somit beschränkte sich die Auswertung nicht allein auf der Hypothese einer homozygoten *Founder*-Mutation, die aufgrund der in der Familie zugrunde liegenden Konsanguinität anzunehmen war. Die Haplotypen wurden mittels *GENEHUNTER* rekonstruiert und anhand *HaploPainter* [Thiele *et al.*, 2005] graphisch dargestellt. Alle Daten wurden mit Hilfe des *Software Tools ALOHOMORA* [Rüschendorf *et al.*, 2005] konvertiert und graphisch dargestellt.

2.14 Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction, PCR*)

Die PCR ist eine Technik zur *in vitro*-Amplifikation von DNA durch Verwendung von spezifischen Primern, dNTPs und thermostabilen Polymerasen (z.B. die *Taq*-Polymerase des Bakteriums *Thermus aquaticus*) [Mullis *et al.*, 1987; Saiki *et al.*, 1988]. DNA wird in mehreren Zyklen aus Denaturierung, *Annealing* und Elongation exponentiell vermehrt. Selbst geringe Mengen an DNA lassen sich nach dieser Methode beliebig vervielfältigen. Eine wichtige Voraussetzung ist, dass die flankierenden Bereiche einer jeden Ziel-Sequenz bekannt sein müssen, um Oligonukleotide von etwa 15-35 bp als spezifische Primer in 5'-3'-Richtung beider Matrizenstränge zu konstruieren. Die PCR wird in einem Thermocycler durchgeführt, der die optimalen Temperaturen zur Strangtrennung, Primerbindung und DNA-Synthese erzeugt. Das Temperatur-Profil einer jeden DNA-Amplifikation erstellt sich in Abhängigkeit von den verwendeten Komponenten.

2.14.1 Primer-Design

Um einen DNA-Abschnitt per PCR zu amplifizieren, wurden sowohl ein *Forward*-Primer auf dem *Sense*- als auch ein *Reverse*-Primer auf dem *Antisense*-Strang in 5'-3'-Richtung benötigt. Mit Hilfe von bioinformatischen Datenbanken wie die des *UCSC*, *NCBI* oder *ENSEMBL* wurden die zu untersuchenden Gen-Strukturen ermittelt und *Primer*-Paare konstruiert, die die Ziel-Sequenz flankierten. Dabei wurden folgende Kriterien beachtet, um u.a. Gen-Unspezifitäten, *Allele Dropouts* oder 3'-Ende-Selbstkomplementaritäten zu vermeiden:

- Länge: ca.18-24 bp mit einer gleichmäßigen Verteilung aller vier Basen
- GC-Gehalt: 50-65 %
- Abgleich (*Blast*) mit Datenbanken; Überprüfung auf eventuelle annotierte SNPs
- 3'-Ende: G oder C
- Lage: mindestens 60 bp vor dem Exonstart bzw. nach dem Exonende
(bei der Amplifikation von genomischer DNA)

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Primer wurden von der Firma Metabion (Martinsried) synthetisiert und in lyophilisiertem Zustand geliefert. Mit steril filtriertem TE⁻⁴-Puffer (10mM Tris, 0,1mM Na₂-EDTA, HPLC-H₂O; pH 8,0) wurde die Konzentration der jeweiligen Stammlösungen auf 100 pmol/μl eingestellt. Aus den Stammlösungen wurden Gebrauchslösungen mit einer Konzentration von 10 pmol/μl angefertigt. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C.

2.14.2 PCR-Reaktionsansätze

Die Standard-PCR wurde in einem Volumen von 25 µl aus *Taq*DNA-Polymerase, *Forward*- und *Reverse*-Primer, 50 ng genomischer DNA und destilliertem Wasser angesetzt. Im Rahmen dieser Arbeit wurden die *ReadyMixTMREDTaq[®]* - und *AccuTaqTM*-Polymerase (Sigma) sowie die *High Fidelity*-Polymerase (Roche) verwendet. Der Reaktionsmix der *ReadyTaq*-Polymerase enthielt zusätzlich zur Polymerase Puffer, dNTPs und MgCl₂. Für Reaktionsansätze mit der *AccuTaq*- oder *High Fidelity*-Polymerase mussten diese Komponenten einzeln hinzugefügt werden. Reaktionsansätze mit den drei verschiedenen Polymerasen enthielten die in Tab.2.2 bzw. Tab. 2.3 aufgeführten Komponenten.

Tab. 2.2: Standard-PCR-Reaktionsansätze für a) genomische DNA und b) cDNA mit der *REDTaq*-Polymerase

Komponente	Mengenangabe ^{a)}	Mengenangabe ^{b)}
<i>REDTaq</i> -DNA-Polymerase-Mix	12,5 µl	12,5 µl
F-Primer	1 µl [10 pmol/µl]	1 µl [10 pmol/µl]
R-Primer	1 µl [10 pmol/µl]	1 µl [10 pmol/µl]
DNA	5 µl [10 ng/µl] genomische DNA	1 µl cDNA
H ₂ O	5,5 µl	9,5 µl
Σ	25 µl	25 µl

Tab. 2.3: Reaktionsansätze für a) genomische Template-DNA und b) cDNA mit der *AccuTaq*-oder *High Fidelity*-Polymerase

Komponente	Mengenangabe ^{a)}	Mengenangabe ^{b)}
Puffer (10 X)	2,5 µl	2,5 µl
dNTPs (NEB)	1 µl	1 µl
<i>AccuTaq</i> / <i>High Fidelity</i> -Polymerase	0,25 µl	0,25 µl
F-Primer	1 µl [10 pmol/µl]	1 µl [10 pmol/µl]
R-Primer	1 µl [10 pmol/µl]	1 µl [10 pmol/µl]
DNA	5 µl [10 ng/µl] genomische DNA	1 µl cDNA
H ₂ O	13,25 µl	18,25 µl
Σ	25 µl	25 µl

Zum Ausschluß von Kontaminationen wurde zu jedem PCR-Ansatz eine Negativ-Kontrolle mit H₂O angesetzt. Unspezifische Enzymaktivitäten der Polymerase bei Raumtemperatur wurden vermieden, indem jeder PCR-Ansatz auf Eis zusammengestellt wurde.

2.14.3 PCR-Temperatur-Profile

Die Etablierung von PCR-Reaktionen erfolgte mit Hilfe von zwei Standard-Temperatur-Profilen, die in Tab. 2.4 und 2.5 wiedergegeben werden. Beide aufgeführten Standard-PCRs dienten als Orientierung und wurden je nach PCR in Abhängigkeit von der verwendeten Polymerase, der Primerlänge und Primerkombination sowie des GC-Gehalts und der Größe des zu amplifizierenden Fragmentes variiert und optimiert (Tab. 7.1 bis 7.8 im Anhang).

Tab. 2.4: Temperatur-Profil einer Standard-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer [min]	Zyklenanzahl
Prä-Denaturierung	95 °C	5:00	1
Denaturierung	95 °C	0:30	35
<i>Annealing</i>	62 °C	0:30	
Extension	72 °C	1:00	
Finale Extension	72 °C	4:00	1
Kühlen	4 °C	∞	

Bei der *Touchdown*-PCR wird die Primer-Hybridisierungs-Temperatur innerhalb eines programmierten Intervalls von Zyklus zu Zyklus gesenkt. Durch eine hohe Anfangs-*Annealing*-Temperatur soll ein spezifisches Binden der Primer an die DNA innerhalb des Temperatur-Intervalls gewährleistet werden. Durch das anschließende Absenken der Temperatur soll die Ausbeute des PCR-Produktes, bei der die spezifisch synthetisierten DNA-Abschnitte als *Template* dienen, gesteigert werden.

Tab. 2.5: Temperatur-Profil einer *Touchdown*-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer [min]	Zyklenanzahl
Prä-Denaturierung	95 °C	5:00	1
Denaturierung	95 °C	0:30	n = 9
<i>Annealing</i>	64-n °C	0:30	
Extension	72 °C	0:30	
Denaturierung	95 °C	0:30	28
<i>Annealing</i>	55 °C	0:30	
Extension	72 °C	0:30	
Finale Extension	72 °C	10:00	1
Kühlen	4 °C	∞	-

2.15 Rapid Amplification of cDNA-Ends-PCR (RACE-PCR)

Die RACE ist eine Technik zur schnellen Amplifikation unbekannter cDNA-Enden von Genen mittels der PCR. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde das *Marathon-Ready™*-cDNA Kit von Clontech verwendet. Das Prinzip dieses Systems zeichnet sich durch den Einsatz einer speziellen cDNA aus. Dieses besteht aus einer cDNA-Bibliothek unklonierter doppelsträngiger cDNA, aus der genspezifische PCR-Produkte amplifiziert werden können. Die Besonderheit dieser cDNA besteht darin, dass an den Enden der cDNA-Stränge ein Adapter mit bekannter Sequenz ligiert worden ist. Folglich können mit Hilfe von genspezifischen (GSP1, GSP2) und den im Kit enthaltenen Adapter-Primern (AP1, AP2) Fragmente mit der unbekanntem Sequenz amplifiziert werden. Zur Erhöhung der Spezifität des Produktes können sogenannte *Nested-PCRs* durchgeführt werden. Dazu werden ein zweites, innerhalb der amplifizierten Sequenz liegendes Primerpaar (NGSP1, NGSP2) und das zuvor amplifizierte PCR-Produkt als *Template* eingesetzt.

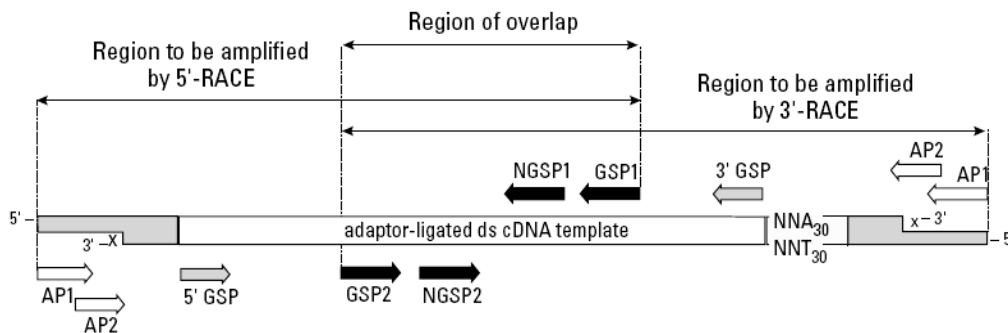


Abb. 2.2: Prinzip der RACE-PCR [Bildquelle: *Marathon-Ready™* cDNA-Handbuch, Clontech].

Tab. 2.6: Reaktionsansätze für a) *Marathon-Ready™*-cDNA und b) *Nested-PCR* aus vorherigem PCR-Produkt

Komponente	Mengenangabe ^{a)}	Mengenangabe ^{b)}
Puffer (10 X)	2,5 µl	2,5 µl
dNTPs (NEB)	1 µl	1 µl
<i>AccuTaq</i> -Polymerase	0,15 µl	0,15 µl
AP1 / AP2	1 µl [10 pmol/µl]	1 µl [10 pmol/µl]
GSP1 bzw. GSP2 / NGSP1 bzw. NGSP2	1 µl [10 pmol/µl]	1 µl [10 pmol/µl]
<i>Marathon-Ready™</i> -cDNA	1 µl [10 ng/µl]	1 µl PCR-Produkt aus a)
H ₂ O	18,35 µl	18,35 µl
Σ	25 µl	25 µl

2.16 Reverse Transkription-PCR (RT-PCR) mittels QIAGEN® *OneStep RT-PCR Kit*

Die RT-PCR ist eine Kombination aus der Reversen Transkription und der Polymerase-Kettenreaktion. Die Besonderheit dieser Methode besteht darin, dass RNA initial durch das Enzym *Reverse Transkriptase* in eine komplementäre DNA-Kopie (cDNA) transkribiert wird, welche wiederum als *Template* zur Vervielfältigung via PCR dient. Hierzu wurde das QIAGEN® *One-Step RT-PCR-Kit* verwendet. Es enthält einen Enzym-Mix bestehend aus zwei *Reverse Transkriptasen* (*Omniscript-* und *Sensiscript-Reverse Transkriptase*), die auf die Umsetzung unterschiedlicher RNA-Mengen spezialisiert sind, sowie einer *HotStarTaq-DNA-Polymerase* zur Vervielfältigung des transkribierten *Templates*. Die beiden Transkriptasen arbeiten bei einer Temperatur von 50°C, während die *Taq-DNA-Polymerase* nach erfolgter Reverser Transkription erst durch Erhöhung der Temperatur auf 95°C aktiviert wird. Das Kit enthält außerdem eine *Q-Solution*, welche optional einzusetzen ist. Sie dient zur Unterstützung der Amplifikation GC-reicher DNA-Vorlagen, indem sie das Schmelzverhalten der Nukleinsäuren modifiziert. Ein RT-PCR-Reaktionsansatz setzte sich wie in Tab. 2.7 aufgelistet zusammen.

Tab. 2.7: Reaktionsansatz für die RT-PCR mittels *OneStep RT-PCR-Kit* (Qiagen)

Komponente	Mengenangabe
Puffer (5 X)	5 µl
<i>Q-Solution</i> (5 X)	5 µl
dNTPs	1 µl
Enzym-Mix	1 µl
F-Primer	1,5 µl [10 pmol/µl]
R-Primer	1,5 µl [10 pmol/µl]
RNA	5 µl (~ 150 ng)
H ₂ O	5 µl
Σ	25 µl

Tab. 2.8: Temperatur-Profil einer RT-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer [min]	Zyklenanzahl
Reverse Transkription	50°C	30:00	1
<i>HotStarTaq-DNA-Polymerase</i> Aktivierung	95°C	15:00	
Denaturierung	95°C	0:30	35
<i>Annealing</i>	64°C	0:30	
Extension	72°C	1:00	
Finale Extension	72°C	4:00	1
Kühlen	4°C	∞	

2.17 Quantitative *Real-Time*-PCR

Die quantitative *Real-Time*-PCR ist eine Vervielfältigungsmethode von DNA oder RNA, die auf dem Prinzip einer herkömmlichen PCR beruht und zusätzlich die Möglichkeit der Quantifizierung eines bestimmten Transkriptes (Expressionsanalyse) bietet [Higuchi *et al.*, 1992, 1993]. Die Quantifizierung erfolgt mit Hilfe von Fluoreszenz-Messungen spezieller Reportersubstanzen, die direkt während der PCR erfasst werden. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde SYBR-Green als Reporterfarbstoff eingesetzt. Dies ist ein Cyan-Fluoreszenzfarbstoff, der sich in doppelsträngige DNA einlagern kann. Der daraus resultierende DNA-Fluoreszenzfarbstoff-Komplex absorbiert Licht bei einer Wellenlänge von 494 nm und emittiert Licht bei 522 nm. Diese Lichtemissionen werden nach jedem PCR-Zyklus mittels eines Fluorimeters gemessen, wobei die Fluoreszenz in der exponentiellen Phase proportional zur Menge an doppelsträngigem PCR-Produkt ist. Zur Quantifizierung der Transkriptmenge des zu analysierenden Gens wurde das *Quantitect™ SYBR® Green Kit for One-step PCR* verwendet. Dieses Reagenziensystem ermöglicht die Umschreibung von RNA in doppelsträngige cDNA sowie die Amplifikation mit Einbau des SYBR-Green-Farbstoffes zur Quantifizierung in einer Reaktion.

Tab. 2.9: Reaktionsansatz einer quantitativen *Real-Time*-PCR mittels *Quantitect™ SYBR® Green Kit for One-step PCR*

Komponente	Mengenangabe
RNase freies H ₂ O	2,85 µl
<i>Quantitect-RT-SYBR Green Mix (2 X)</i>	10 µl
F-Primer	1 µl [10 pmol/µl]
R-Primer	1 µl [10 pmol/µl]
RNA	5 µl (~ 10 ng)
<i>Quantitect-RT-Enzym-Mix</i>	0,15 µl
Σ	20 µl

Die Messung erfolgte im *Real-Time PCR System 7500* (TaqMan, Applied Biosystems) über ein Gerät-internes Fluorimeter. Die Messung der Fluoreszenzintensität erfolgte jeweils in der exponentiellen Phase, der Extension vor dem nächsten Denaturierungsschritt.

Tab. 2.10: Temperatur-Profil der *Real-Time*-PCR

Schritt	Temperatur	Dauer [min]	Zyklenanzahl
Reverse Transkription	50°C	30:00	1
DNA-Polymerase Aktivierung	95°C	15:00	
Denaturierung	94°C	0:15	40
Annealing	63°C	0:30	
Extension	72°C	0:35	
Schmelzkurvenanalyse			

Da der SYBR-Green-Farbstoff unspezifisch an doppelsträngige DNA bindet, wurde zusätzlich eine Schmelzkurvenanalyse des PCR-Produktes durchgeführt. Da doppelsträngige DNA von spezifischen PCR-Produkten einen höheren Schmelzpunkt hat als unspezifisch entstandene Primer-Dimere, wurde die Temperatur bei der Schmelzkurvenanalyse schrittweise erhöht (von 50 °C bis 95 °C). Bei einer für das Fragment spezifischen Schmelztemperatur dissoziierten die komplementären Stränge, wodurch der eingebaute Fluoreszenzfarbstoff SYBR-Green somit wieder freigesetzt wurde. Diese konnte (in Form von Höhe und Lage der Peaks) Aufschluß über die Spezifität des PCR-Produktes geben: Zeigte die Schmelzkurve nur einen Peak, wurde ein spezifisches PCR-Produkt amplifiziert. War allerdings einer oder mehrere kleinere Vorpeaks zu beobachten, lagen mögliche Kontaminationen, Primer-Dimere oder unspezifische Artefakte vor, die bei niedrigeren Temperaturen denaturieren.

Die Analyse der Messdaten erfolgte mit Hilfe der Herstellersoftware *7500 System Sequence Detection Software V1.2* (Applied Biosystems), womit sich aus den gemessenen Fluoreszenzwerten Ct-Werte jeder einzelnen Proben errechnen ließ. Der Ct-Wert entspricht jener PCR-Zykluszahl, bei der die Reporter-Fluoreszenz erstmalig signifikant über die Hintergrund-Fluoreszenz steigt. Je niedriger der Ct-Wert desto mehr Transkript war in der Probe vorhanden. Die von der Software berechneten Rohdaten (Ct-Werte) wurden mittels Excel (Microsoft Office) ausgewertet. Alle Messungen erfolgten in Drei- bzw. Vierfachmessungen, so dass die Mittelwerte der Ct-Werte sowie die Standardabweichung der resultierenden Ergebnisse bestimmt werden konnten.

Die relative Bestimmung der Transkriptmenge erfolgte nach der ddCt-Methode. Dabei wurden aus den Mittelwerten der Ct-Werte zunächst die dCt-Werte der Proben berechnet. Der dCt-Wert ist die Differenz aus dem Ct-Wert des Zielgens und dem Ct-Wert eines verwendeten Haushaltsgens einer Probe, um Variationen in der Ausgangsmenge der eingesetzten RNA bzw. cDNA auszugleichen. Dieser Schritt ist vernachlässigbar, wenn sehr akkurat die gleiche RNA-Menge eingesetzt wurde. Eine Normalisierung über ein Haushaltsgen war deshalb nicht notwendig. Zur Berechnung des ddCt-Wertes wird der dCt Wert einer Probe vom dCt Wert der Kontrolle, zu der der relative Bezug hergestellt werden soll, abgezogen. Dieser Wert gibt Aufschluss darüber, ob sich die Transkription eines Gens in der Probe, verglichen mit einer Kontrollprobe, verändert hat. Ein positiver ddCt Wert von 1 entspricht einer Verdopplung der Transkription in der entsprechenden Probe, da ein Zyklus in der PCR einer Verdopplung der DNA-Menge entspricht. Ein ddCt Wert von -1 entspricht einer halbierten Transkriptmenge des Zielgens in der Probe. Der Ct-Wert der Kontrolle wurde auf 100% gesetzt und die Expression der zu testenden RNA-Probe im Verhältnis zu ihr ausgedrückt.

2.18 Agarose-Gelelektrophorese

Bei der Agarose-Gel-Elektrophorese werden DNA-Moleküle auf der Basis ihrer unterschiedlichen Wanderungsgeschwindigkeit unter dem Einfluß eines elektrischen Feldes aufgetrennt. Da Nukleinsäuren aufgrund ihrer Phosphatgruppen negativ geladen sind, wandern sie im elektrischen Feld zur Anode. Kleinere Fragmente bewegen sich schneller durch das Gel als größere, wodurch eine Auftrennung der DNA-Moleküle nach ihrer Größe ermöglicht wird. Ihre Visualisierung erfolgt durch Zugabe der organischen Substanz Ethidiumbromid. Einzelne EtBr-Moleküle können aufgrund ihrer planaren Struktur zwischen die Basen der DNA interkalieren. Dadurch wird das Anregungsspektrum von EtBr verändert und die Fluoreszenz der Substanz bei Anregung durch UV-Licht stark erhöht. Folglich leuchten die Stellen im Agarose-Gel, an denen sich DNA befindet, hell auf, während Stellen ohne DNA dunkel erscheinen. Die Lichtintensität ist dabei proportional zur vorhandenen DNA-Menge. Zur Größenbestimmung und groben Quantifizierung der zu untersuchenden DNA dient ein DNA-Größenstandard (2-log-Standard; NEB). Je nach Größe der aufzutrennenden DNA-Moleküle wurden 1 bis 2 %ige Agarose-Gele mit 1X TAE-Puffer hergestellt.

TAE (1X)-Puffer Appllichem

500 ml 10 x TAE
ad 5 l A. Dest

Ethidiumbromidlösung

10 mg/ml EtBr
Lagerung bei 4°C; lichtgeschützt

Ladepuffer pH 8

10 ml Formamid
10 mg Xylencyanol
10 mg Bromphenolblau
0,5 M EDTA

2-log DNA-Standard NEB

50 µl Marker [1000 µg/ml]
850 µl 1X TAE
100 µl Ladepuffer

2.19 Aufreinigung von PCR-Produkten

Durch die Aufreinigung von PCR-Produkten wurden die Nukleinsäuren von störenden Komponenten wie Primern, Puffern, Enzymen, dNTPs und anderen möglichen Verunreinigungen entfernt [Vogelstein *et al.*, 1979]. Je nach Aufreinigungsart wurde das *QIAquick®-PCR-Purification-* oder das *QIAquick®-Gel-Extraction-*Kit (Qiagen) verwendet. Beide Reagenziensysteme verwenden eine Silica-Gel-Membran als Reinigungssäule für die selektive DNA-Adsorption zur Trennung von störenden Kontaminanten. Die DNA-Aufreinigung aus einem PCR-Ansatz bzw. aus einem Agarose-Gel erfolgte nach den Angaben des Herstellers.

2.20 Sequenzierung von DNA-Fragmenten

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Sequenzierungen beruhen auf der enzymatischen Kettenabbruchsynthese nach F. Sanger [Sanger *et al.*, 1977]. Diese erfolgt mit Hilfe einer enzymatischen DNA-Synthese in Gegenwart basenspezifischer dNTPs und Didesoxynukleotide (ddNTPs), die einen Kettenabbruch bewirken. Unter Ausbildung einer Phosphodiesterbindung zwischen seinem eigenen C5-Atom und dem C3-Atom des vorher eingebauten Nukleotids kann ein ddNTP an die wachsende Kette angehängt werden. Da ddNTPs am 2'-Kohlenstoffatom und zusätzlich am 3'-Kohlenstoffatom eine Hydroxylgruppe fehlt, kann an dem C3-Atom keine Phosphodiesterbindung ausgebildet werden. Folglich wird die Synthese der DNA-Kette an dieser Stelle abgebrochen. Eine DNA-Polymerase synthetisiert den zu sequenzierenden DNA-Strang mit einem spezifischen Primer nach einem ähnlichen Prinzip wie bei der PCR. Die Konkurrenz zwischen den ddNTPs und ihren dNTP-Analoga beim Einbau in die wachsende DNA-Kette führt zu einem Gemisch von Fragmenten verschiedener Längen. Die Auftrennung der Fragmente erfolgt über Kapillare in einem *Sequencer*. Mittels eines Laserstrahls werden die mit vier verschiedenen Fluoreszenzfarbstoffen markierten ddNTPs zur Fluoreszenz angeregt und detektiert. Die Messung erfolgt elektronisch und die abgeleitete Sequenz wird in einem Computersystem gespeichert und bearbeitet.

Alle per PCR amplifizierte DNA-Abschnitte verschiedener Kandidatengene der Patienten und deren Familienmitglieder wurden nach dem oben beschriebenen Prinzip sequenziert. Nach erfolgter Amplifikation der gewünschten Ziel-Sequenz aus genomischer DNA mit entsprechenden Primern wurden die PCR-Produkte über ein Agarose-Gel überprüft und anschließend aufgereinigt. Für die Sequenzier-Reaktion wurde das *ABI PRISM BigDye[®] Terminator v1.1 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit* der Firma Applied Biosystems eingesetzt.

Tab. 2.11: Reaktionsansatz einer Sequenzier-Reaktion

Komponente	Mengenangabe
<i>BigDye</i>	0,5 µl
5 x Puffer	2 µl
Sequenzierprimer (F oder R)	0,25 µl [10 pmol/µl]
DNA	~1,5 µl (50 ng)
H ₂ O	5,75 µl
Σ	10 µl

Tab. 2.12: Temperatur-Profil einer Sequenzier-Reaktion

Schritt	Temperatur	Dauer [min]	Zyklusanzahl
Prä-Denaturierung	94 °C	5:00	1
Denaturierung	96 °C	0:12	26
Annealing	50 °C	0:05	
Extension	60 °C	4:00	
Final Extension	60 °C	20:00	1
Kühlen	4 °C	∞	-

2.20.1 DNA-Aufreinigung nach einer Sequenzier-Reaktion

Nach einer Sequenzier-Reaktion müssen aus dem Ansatz nicht-gebundene Farbstoffe entfernt werden, da diese sonst das Ergebnis der Sequenzierung stören könnten. Nach der Sequenzier-Reaktion wurden die Ansätze mittels einer *DyeEx*-Säule nach den Angaben des Herstellers Qiagen aufgereinigt, bevor sie im *Sequencer* analysiert wurden.

Das aufgereinigte Eluat wurde schließlich zur Ermittlung der Sequenz in das Sequenziersystem *ABI Prism 3100 Genetic Analyzer* eingesetzt. Die ermittelte Sequenz wurde zur Mutationssuche mit der *RefSeq*-Referenz-Sequenz des *UCSC* oder *NCBI* anhand der Software *DNASTAR Lasergene SeqMan Pro* (Version 7.1) abgeglichen.

2.21 PCR-basierter Assay zur Untersuchung von Tandem-*Repeats*

Sogenannte Tandem-*Repeats* setzen sich aus Di-, Tri- oder Tetra-Nukleotid-Wiederholungen zusammen und können bei jedem Individuum stark in ihrer Anzahl an Wiederholungen variieren und folglich hoch polymorph sein. Eine Analyse der genauen Zahl eines solchen *Repeats* bei einem Individuum kann durch eine PCR-basierte Methode erfolgen. Aufgrund der verschiedenen Anzahl von Di-, Tri- oder Tetra- Nukleotid-Wiederholungen innerhalb der Sequenz ergeben sich nach einer PCR-Amplifikation des zu untersuchenden Abschnitts unterschiedlich große DNA-Fragmente, die über die Kapillaren elektrophoretisch aufgetrennt und anhand eines *Sequencers* bestimmt werden können. Dazu ist es notwendig, dass ein Primer fluoreszenz-markiert ist, über den das Signal des fluoreszierenden PCR-Produktes ermittelt werden kann.

Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse eines CTG-*Repeats* erfolgte nach einer Standard-PCR mit spezifischen Primern, von denen der *Forward*-Primer FAM fluoreszenz-markiert war, und mit Hilfe eines *ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems)*. Nach erfolgter PCR wurde 1 µl der Fluoreszenz markierten PCR-Produkte mit 0,5 µl des Längenstandards GENESCAN® 400HD (ROX) (Applied Biosystems) sowie 9,5 µl HiDi-Formamid versetzt und in eine 96-*well*-Platte pipettiert. Die Proben wurden denaturiert und anschließend über die Kapillaren des *ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied*

Biosystems) aufgetrennt und analysiert. Dabei wurde das Fluoreszenzsignal von einer *Charged-coupled Deviced-Camera* aufgenommen und mittels der *Data-Collection Software* v1.0 (Applied Biosystems) gesammelt und digitalisiert. Die Analyse dieser Daten erfolgte schließlich mit der *GeneScan Analysis Software 3.7* (Applied Biosystems).

2.22 Expressionsanalysen

2.22.1 Multiple-Tissue-cDNA-Panel

Eine einfache Möglichkeit der Expressionsanalyse ist die Verwendung eines kommerziellen *Multiple-Tissue-cDNA-Panels*. Das ausgewählte Panel enthielt cDNA 12 verschiedener humane Gewebe. Mit einem geeigneten Primerpaar wurden diese 12 cDNA-Gewebeproben jeweils per Standard-PCR spezifisch amplifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es wichtig, eine pseudogenspezifische Primerkombination zu verwenden, damit nicht fälschlicherweise LRP5 selbst amplifiziert wurde. Die Primer wurden in *LRP5L* so gelegt, dass ein pseudogenspezifisches PCR-Produkt im Fall von *LRP5L* 581 bp groß ist, im Gegensatz 1128 bp bei einer Amplifikation von *LRP5*. Die amplifizierten PCR-Produkte wurden anschließend auf einem 2 %igen Argarose-Gel aufgetragen. Die Stärke der Genexpression im entsprechenden Gewebe korrelierte mit der Intensität und Dicke der Bande.

2.22.2 Northernblot-Analyse

Northernblot-Analyseverfahren dienen dem Nachweis von RNA in unterschiedlichen Geweben. Das Untersuchungsprinzip beruht auf der komplementären Hybridisierung von cDNA des nachzuweisenden Gens in Form einer genspezifischen Sonde mit der Ziel-RNA aus unterschiedlichen Geweben auf einer Nylon- oder Nitrocellulose-Membran [Alwine *et al.*, 1977]. Zur Detektion der hybridisierten Fragmente ist die Sonde radioaktiv markiert. Durch Autoradiographie kann diese, da sie komplementär an eine bestimmte RNA-Sequenz gebunden ist, sichtbar gemacht werden. Die Intensität des Autoradiographie-Signals korreliert dabei mit der RNA-Menge und kann somit als Maß der Genexpression gewertet werden.

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Northernblot-Membranen (*Human 12-Lane MTNTM Blot*, Clontech; *RNA Blot mN3*, Biochain) umfassten 12 und 6 verschiedene Gewebe. Als Sonden dienten ein 581 bp großes *LRP5L*-spezifisches cDNA-Produkt, ein 500 bp großes LRP5-spezifisches cDNA-Produkt sowie ein 381 bp großes Aktin-spezifisches cDNA-Produkt (Tab. 7.8). Alle Sonden wurden aus *Human Universal cDNA* der Firma Biotec amplifiziert und anschließend anhand des *QIAquick-PCR-Purification-Kit* der Firma Qiagen aufgereinigt.

Vor der radioaktiven Hybridisierung von Sonde und Ziel-RNA auf der Membran wurde die Membran mit in eine Glas-Blotflasche gebracht und zur Absättigung von unspezifischen Bindestellen für mindestens 30 min bei 65°C mit *ExpressHyb*-Hybridisierungslösung (Clontech) im Drehinkubator inkubiert. Währenddessen wurde die Hybridisierungs-Sonde mit dem Isotop [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP (Perkin Elmer) radioaktiv markiert. Dies erfolgte mit einem *AmershamTM Ready-To-GoTM DNA Labelling Beads (-dCTP)*-Kit nach Angaben des Herstellers GE Healthcare. Zum Entfernen von nicht-gebundenen Nukleotiden wurde die Hybridisierungs-Sonde nach der radioaktiven Markierung über eine Sephadex-Säule (*ProbeQuantTM G-50K*) aufgereinigt. Durch eine 5 minütige Denaturierung der Sonde lag diese wieder einzelsträngig vor, und konnte somit an die RNA binden. Dazu wurde die Prähybridisierungslösung verworfen und die Sonde mit 15 ml frischer Hybridisierungslösung in die Blotflasche gegeben. Nach einer Inkubation von 16 bis 18 wurde die Sonde entfernt und die unspezifisch an die Membran gebundene Radioaktivität mittels mehrmaliger kurzer Waschschriffe bei 65°C mit den Waschlösungen 1 und 2. Die radioaktive Strahlung der Membran wurde zwischen den einzelnen Waschschriffen stets anhand eines Geigerzähler gemessen, um ein Abwaschen der gebundenen Sonde zu vermeiden. Bei einer gewünschten Signalstärke von 50 bis 80 Becquerel wurde die Membran in Folie eingeschweißt und in einer Röntgenkassette gelegt. Zur Autoradiographie wurde ein Röntgenfilm aufgelegt und die Kassette bei -70°C gelagert. Je nach Signalstärke wurde der Film für 24 Stunden bis mehrere Tage exponiert.

2.22.2.1 Substanzen zur Northernblot- Analyse

Isotop [$\alpha^{32}\text{P}$] dCTP	Perkin Elmer
Amersham TM Ready-To-Go TM DNA Labelling Beads (-dCTP)	GE Healthcare
Illustra TM Probe Quant G-50 Micro Columns	GE Healthcare
Human 12-Lane MTE Northern-Blot	Clontech
ExpressHyb Hybridisierungslösung	BD Biosciences

Waschlösung 1

2 x SSC	100 ml	20 x SSC
1 % SDS	50 ml	20 % SDS
ad 1 l A. dest.		

Waschlösung 2

0,1 x SSC	3 ml	20 x SSC
0,5 % SDS	15 ml	20 % SDS
ad 600 ml A. dest.		

2.23 Klonierung

Bei der Klonierung wird eine beliebige DNA-Sequenz in einen bakteriellen Vektor integriert. Vektoren stammen von bakteriellen Plasmiden ab und dienen als Transportvehikel zur Übertragung (Transformation) eines bestimmten DNA-Strangs in eine Empfängerzelle [Avery, 1944]. Nach Einbringen der zu untersuchenden DNA in einen geeigneten Vektor wird diese folglich in einen Wirt transformiert. Der typische Wirt ist ein Stamm des Bakteriums *Escherichia coli*. Ziel einer Klonierung ist, das klonierte Gen mit Hilfe des Wirts für weitere Funktionsanalysen zu amplifizieren.

2.23.1 TA-Klonierung mittels des *pcDNA3.1 TOPO[®] TA Expression Kit*

Die *Taq*-Polymerase besitzt eine terminale Transferase-Aktivität, bei der an die 3'-Enden eines PCR-Produktes unspezifisch ein einzelnes A angehängt wird, welches mangels einer Exonukleasefunktion des Enzyms nicht korrigiert werden kann. Basierend auf dieser Transferase-Aktivität sind die für die TOPO-Klonierung verwendeten Plasmidvektoren so modifiziert, dass an ihren 3'-Enden ein einzelnes T vorliegt.

Das Prinzip der TA-Klonierung mittels dieses *pcDNA3.1 TA Expression Kits* (Invitrogen) beruht darauf, dass ein DNA-Insert durch die komplementäre Basenpaarung zwischen T und A in den linear vorliegenden Vektor ligiert werden kann. Ergänzt wird dieses System durch die Typ-I-DNA-Topoisomerase des *Vaccinia*-Virus. Diese Ligaseaktivität des Enzyms macht sich das im Rahmen dieser Arbeit verwendete Klonierungssystem zunutze. Nach spezifischer komplementärer Basenpaarung der TA-Überhänge von Vektor und Insert ligiert die kovalent an den Vektor gebundene Topoisomerase I diese miteinander, wobei die Topoisomerase-Bindung gelöst und das rekombinante Plasmid zirkularisiert wird. Die Wahrscheinlichkeit einer richtigen *Insert*-Orientierung liegt dabei bei 50% und muss anschließend durch einen Restriktionsverdau überprüft werden.

Zur Selektion der transformierten Zellen enthalten Expressionsvektoren Resistenz-Gene gegen unterschiedliche Antibiotika. So können auf den mit Antibiotika versetzten Agarplatten nur die Bakterien wachsen, die dieses Plasmid aufgenommen und die Antibiotika-Resistenz erworben hatten.

2.23.2 Ligation und Transformation

Das zu klonierende PCR-Produkt (~ 8 µl) wurde mit 2 µl Salz-Lösung versetzt und anschließend mit 2 µl des vom Hersteller präparierten *pcDNA3.1*-Vektors vorsichtig vermischt und zur Ligation für 30 min bei RT inkubiert. Für die Transformation wurden chemisch kompetente *E. coli*-Zellen (TOP10-Zellen) verwendet. Nach der Ligation wurden 8 µl des Ligationsansatzes mit den auf Eis aufgetauten kompetenten Zellen vorsichtig

vermischt und für 30 min auf Eis inkubiert. Während dieser Inkubationsphase erfolgte die Anlagerung der Fremd-DNA an die Bakterienzellmembran. Durch einen Hitzeschock bei 42°C für 30 sec wurde die Bakterienmembran so destabilisiert, dass die Aufnahme der DNA in die Wirtszelle erfolgen konnte. Nach einer kurzen Inkubationszeit auf Eis wurde 250 µl SOC-Medium hinzugegeben. Durch Schütteln der Bakterien bei 37°C für eine Stunde sollten sich die Bakterien regenerieren und mit der Expression des auf den Plasmid kodierten Antibiotikum-Resistenz-Gens beginnen. Die Ansätze wurden schließlich auf Antibiotikum-haltigen Selektionsplatten ausplattiert. Die Inkubation der Platten erfolgte bei 37°C über Nacht im Bakterienbrutschrank.

Zur Kultivierung wurde eine sterile Pipettenspitze durch eine Einzelkolonie gezogen und in mit Antibiotikum versetztes LB-Medium überführt. Die Inkubation erfolgte über Nacht bei 37°C in einem Inkubationsschüttler. Je nach weiterem Verwendungszweck oder gewünschtem Volumen zur Plasmid-Isolierung wurden 5 ml (Mini) oder 50 ml (Midi) LB-Medium angeimpft.

2.23.3 DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen (Plasmid-Präparation)

Die DNA-Isolierung aus Bakterienkulturen erfolgte mittels des *GenElute™ Plasmid Mini-Prep Kit* oder dem *HiSpeed® Plasmid Midikit*. Das Prinzip dieser Reagenziensysteme beruht auf der alkalischen Lyse der Bakterienzellen [Birnboim *et al.*, 1979], auf die die Trennung der Plasmid-DNA von den restlichen Zellkomponenten durch spezifische Bindung an eine Silica-Gel-Membran folgt. Die Plasmid-Präparation einer Mini- bzw. Midi-Bakterienkultur erfolgte nach Hersteller-Angaben. Die Konzentrationsbestimmung der aufgereinigten Plasmid-DNA erfolgte photometrisch anhand des NanoDrop ND-1000 (Kapitel 2.12).

2.23.4 Glycerolstock von transformierten Bakterien

Zur langfristigen Lagerung von transformierten Bakterien bei gleichzeitiger Beibehaltung ihrer Vitalität wurden Glycerolstammlösungen angelegt, die bei -20°C und -70°C aufbewahrt wurden. So können die entsprechenden Bakterien rekultiviert werden.

Für eine Aufbewahrung bei -20°C wurden 500 µl einer Bakterien-Kultur mit 500 µl Glycerol versetzt. Bei einer Aufbewahrung bei -70°C wurden 200 µl Glycerin mit 800 µl Bakterien-Kultur versetzt.

2.23.5 Medien zur Kultivierung von Bakterien

SOC-Medium

2,0 %	Bacto Trypton
0,5 %	Hefe-Extrakt
10 mM	NaCl
2,5 mM	KCl
10 mM	MgCl ₂
10 mM	MgSO ₄
20 mM	Glukose

LB-Medium pH 7

1,0 %	Trypton
0,5 %	Hefe-Extrakt
1,0 %	NaCl
A. dest.	
20 min autoklavieren	

LB-Nährboden pH 7

1,0 %	Trypton
0,5 %	Hefe-Extrakt
1,0 %	NaCl
1,5 % (w/v)	Agar
A. dest.; 20 min autoklavieren	
Antibiotikum	

Ampicillin-Stammlösung

100 mg	Ampicillin
ad 1 ml	A. dest
steril filtrieren; Lagerung bei -20 °C	

Kanamycin-Stammlösung

10 mg	Kanamycin
ad 1 ml	A. dest

Tab. 2.13: Verwendeter Bakterienstamm zur Klonierung

Bakterium	Stamm	Genotyp	Firma
<i>E. coli</i>	TOP10	F- <i>mcrA</i> Δ(<i>mrr-hsdRMS-mcrBC</i>) Φ80/ <i>lacZ</i> ΔM15 Δ <i>lacX74 recA1 araD139</i> Δ(<i>araleu</i>) 7697 <i>galJ galK rpsL</i> (StrR) <i>endA1 nupG</i>	Invitrogen

Tab. 2.14: Verwendete Klonierungsvektoren

Bezeichnung	Beschreibung	Größe	Firma
pcDNA 3.1 V5/His	T7 Promotor, BGH Promotor, neoR, ampR, pUC Origin, f1 Origin, SV40 Origin	5523 bp	Invitrogen
pcDNA3.1 myc/His	T7 Promotor, BGH Promotor, neoR, ampR, pUC Origin, f1 Origin, SV40 Origin	5500 bp	Invitrogen

2.24 Restriktionsverdau von DNA mittels Endonukleasen

Die Restriktion von DNA beruht auf dem Einsatz spezifischer Restriktionsenzyme, die normalerweise in Bakterienzellen fremde, eingedrungene DNA, z. B. von Phagen, unter Schonung des eigenen Genoms zerschneiden [Nathans *et al.*, 1975]. Sie weisen eine hohe Spezifität der Substrat- und Basenerkennung auf und bauen spezifisch interne Phosphodiester-Bindungen eines DNA-Moleküls ab. Die Erkennungssequenzen bestehen meist aus palindromischen Sequenzen von vier bis acht Basenpaaren. Ein Restriktionsenzym kann sogenannte *sticky ends* mit einem Überhang oder *blunt ends* mit bündigem Schnitt erzeugen.

Die verwendeten Restriktionsenzyme wurden überwiegend von der Firma *New England Biolabs* bezogen und sind Tabelle 2.16 zu entnehmen. Unter Berücksichtigung der Herstellerangaben zu den einzusetzenden Puffern und den Enzym-Konzentrationen wurde ein Restriktionsansatz zusammengestellt (Tab. 2.15).

Tab. 2.15: Reaktionsansatz für einen Restriktionsverdau

Komponente	Mengenangabe
Puffer (10 X)	3 µl
BSA (10 X)	3 µl
Restriktionsenzym	1 µl [10.000 U/ml]
DNA	~ 800 ng
H ₂ O	Add 30 µl
Σ	30 µl

Die Inkubation erfolgte in der Regel bei 37°C für mehrere Stunden oder über Nacht. Anschließend wurde der Verdau auf ein Agarose-Gel aufgetragen und die gewünschten Banden konnten für weitere Zwecke wie z.B. Ligation oder Sequenzierung ausgeschnitten und aufgereinigt werden.

Tab. 2.16: Tabellarische Zusammenfassung der verwendeten Restriktionsenzyme

Restriktionsenzym	Erkennungssequenz	Konzentration	Firma
<i>BamHI</i>	5'...G▼GATCC...3'	20.000 U/ml	NEB
<i>BglII</i>	5'...A▼GATCT...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>BsiWI</i>	5'...C▼GTACG...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>BsrGI</i>	5'...T▼GTACA...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>Bsu36I</i>	5'...CC▼TNAGG...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>EcoRI</i>	5'...G▼AATTC...3'	20.000 U/ml	NEB
<i>EcoRV</i>	5'...GAT▼ATC...3'	20.000 U/ml	NEB
<i>HindIII</i>	5'...A▼AGCTT...3'	20.000 U/ml	NEB
<i>HphI</i>	5'...GGTGA(N) ₈ ▼...3'	5.000 U/ml	NEB
<i>HpyCH4III</i>	5'...ACN▼GT...3'	5.000 U/ml	NEB
<i>KpnI</i>	5'...GGTAC▼C...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>MfeI</i>	5'...C▼AATTG...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>NotI</i>	5'...GC▼GGCCGC...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>PmeI</i>	5'...GTTT▼AAAC...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>PshAI</i>	5'...GACNN▼NNGTC...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>PstI</i>	5'...CTGCA▼G...3'	20.000 U/ml	NEB
<i>SanDI</i>	5'...GG▼G(A/T)CCC ...3'	10.000 U/ml	Stratagene
<i>SbfI</i>	5'...CCTGCA▼GG...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>SgrAI</i>	5'...C(A/G)▼CCGG(C/T)G...3'	10.000 U/ml	NEB
<i>XbaI</i>	5'...T▼CTAGA...3'	20.000 U/ml	NEB

2.25 Einführung von Mutationen in Wildtyp-Expressionsvektoren – PCR-Mutagenese

Das Prinzip der PCR-Mutagenese besteht darin, eine bestimmte Mutation an einer definierten Stelle einer Wildtypsequenz einzuführen [Hutchison *et al.*, 1978]. Dies erfolgt in der Regel mit zwei komplementären modifizierten Primern (P2 und P3), die jeweils die gewünschte Mutation beinhalten. Sie dienen dazu, jeweils mit einem genspezifischen Primer (P1 und P4) ein modifiziertes PCR-Produkt zu erzeugen, welches die Mutation beinhaltet. Dieses PCR-Produkt dient wiederum als *Template* und wird mit den außen liegenden Primern (P1 und P4) in einer PCR zu einem Fusions-Produkt amplifiziert. Das Prinzip dieser PCR ist in Abbildung 2.3 schematisch dargestellt.

Das die Mutation enthaltende PCR-Produkt kann anschließend mittels Restriktionsenzymen verdaut und zur Ligation (*T4 Ligase*; Roche) eingesetzt werden.

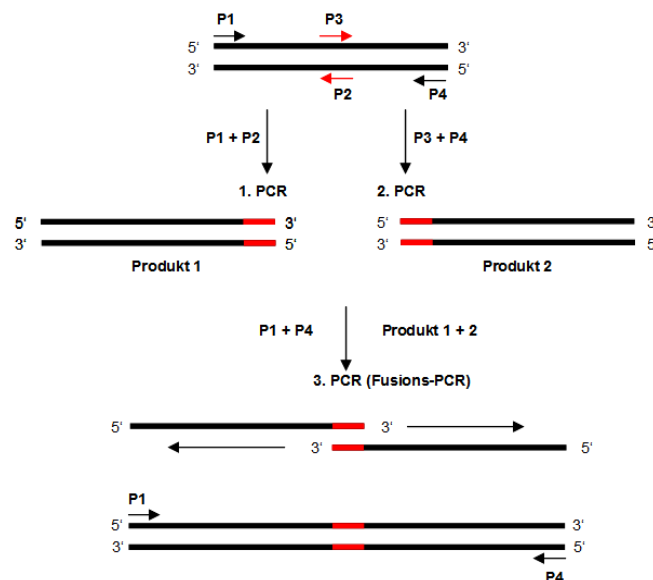


Abb. 2.3: Schematische Darstellung des Prinzips einer PCR-Mutagenese

Die im Rahmen dieser Arbeit generierten Konstrukte und die dazugehörigen Primer sind in den Tabellen 2.17 und 2.18 sowie im Anhang Tabelle 7.4 aufgeführt. Die Expressionsvektoren mit myc-markiertem Wildtyp-*LRP5* (*pcDNA3.1-LRP5-full-length* und *pcDNA3.1-LRP5ΔC-truncated* ohne Transmembran und cytosolische Domäne) wurden von Prof. Matthew Warman (*Department of Genetics and Center for Human Genetics, Case School of Medicine and University Hospital of Cleveland, Cleveland, Ohio, USA*) bereitgestellt.

Tab. 2.17: Mittels PCR-Mutagenese generierte *LRP5*-Konstrukte

Konstrukt	Mutagenese-Primer (P1-P4)				Enzyme	Ziel-Konstrukt
	P1	P2	P3	P4		
Mut _{3L}	<i>LRP5</i> -D13-F1	3er-Allel-R	Del-Mut2-F	<i>LRP5</i> -D13-R1	<i>HindIII</i> + <i>BsiWI</i>	pcDNA3.1- <i>LRP5</i> - (WT _{9L}) Full-length -myc/His
6 Leu		6er-Allel-R				
7 Leu		7er-Allel-R				
8 Leu		8er-Allel-R				
10 Leu		10er-Allel-R				
11 Leu		11er-Allel-R				
A29T	<i>LRP5</i> -D13-F1	Pkt-Mut1-R	Pkt-Mut1-F	<i>LRP5</i> -D13-R1		

Tab. 2.18: Durch RT-PCR aus Patienten-RNA und Restriktionsverdau generierte *LRP5*-Mutations-Konstrukte

Konstrukt	Primer zur RT-PCR aus Patienten RNA	Enzyme	Ziel-Konstrukt
Ex14_16del	MUT-EX14-16-F3 + MUT-EX14-16-R2-R3	<i>SalI</i>	pcDNA3.1- <i>LRP5</i> - (WT _{9L}) Full-length -myc/His
p.E528_V529ins21	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex5-F + <i>LRP5</i> -cDNA-Ex10-R1	<i>PshI</i>	

Alle in Tabelle 2.17 aufgeführten Konstruktvarianten wurden anhand eines *Bsu36I/BglII*-Restriktionsverdaus sowie das p.E528_V529ins21-Konstrukt mittels eines *PshI*-Verdaus in das pcDNA3.1-*LRP5*- Δ C-myc/His-Konstrukt (*truncated*) umkloniert.

2.26 Zellbiologische Methoden

2.26.1 Kultivierung von Säugerzellen

Aufgrund der allgemein hohen Anfälligkeit von Säugerzellen für Kontaminationen durch Bakterien oder Pilze wurde bei der Kultivierung ausschließlich unter der Sterilbank gearbeitet sowie sterile Lösungen und Geräte verwendet. Des Weiteren wurden dem verwendeten Medium (DMEM; Lonza) die Antibiotika und -mykotika Penicillin, Streptomycin und Amphotericin B zugefügt. Das Medium enthielt außerdem das am häufigsten verwendete Serum-Supplement Fötale Kälberserum (FKS). Als Zusatz zu Zellkulturmedien liefert es Transport- und Bindungsproteine, Anheftungsfaktoren, niedermolekulare Nährstoffe, Hormone und Wachstumsfaktoren sowie ein breites Spektrum an Makromolekülen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Hek293T-Zellen (humane, embryonale Nierenzellen) und Osteosarkomzellen (SaOs2 und HOS) bei 5% CO₂ und 37°C in 10 cm-Kulturschalen in einem Brutschrank kultiviert. Um ein Überwachsen und folglich das Sterben der kultivierten Zellen zu verhindern, musste das Kulturmedium regelmäßig gewechselt und die Zellen regelmäßig verdünnt werden. Dabei wurde ein kleiner Teil der Zellen in eine neue Schale mit frischem Medium überführt und so ein Überwachsen verhindert. Das verbrauchte Medium

wurde abgesaugt und die Zellen mit sterilem 1 X PBS gewaschen. Durch Zugabe von Trypsin-EDTA wurden die adhären wachsenden Zellen vom Schalenboden gelöst. Mit Zugabe von frischem Medium wurde die Wirkung von Trypsin abgestoppt. Mittels wiederholtem Auf- und Abpipettieren wurden die Zellen innerhalb des Mediums verteilt und vom Zellboden gelöst. Aus diesem Ansatz wurde die gewünschte Menge an Zell-Suspension in eine neue Kulturschale überführt und mit Medium verdünnt und im Brutschrank kultiviert.

2.26.1.1 Medien zur Kultivierung von Säugerzellen

<u>Kultivierungsmedium</u>		<u>10 X PBS (pH 7)</u>	
DMEM	Lonza	80,0 g	NaCl
FKS	Invitrogen	2,0 g	KCl
Penicillin / Streptomycin	Sigma	14,4 g	Na ₂ HPO ₄
Amphotericin B	Sigma	2,4 g	KH ₂ PO ₄
		ad 1 l	A. dest.
Trypsin-EDTA (1X)	Sigma	autoklavieren	

2.26.2 Transfektion

Zur Funktionsanalyse eines Gens, das in einem eukaryotischen Expressionsvektor integriert wurde, kann dieses in einem Zellkultursystem exprimiert werden. Es gibt verschiedene Methoden zellfremde DNA in Zellen einzubringen (Transfektion). Die im Rahmen dieser Arbeit verwendete Lipofektion-Permeabilisierung basiert auf artifiziellen DNA-enthaltenden Liposomen (*LipofectamineTM2000*, Invitrogen). Das Prinzip der Methode beruht darauf, dass ein positiv geladenes Lipidmolekül mit negativ geladener DNA assoziiert und so einen Liposom-Nukleinsäure-Komplex bildet [Felgner *et al.*, 1987]. Durch die positive Gesamtladung des Komplexes wird eine hohe Transfereffizienz erreicht. Die enge Assoziation des Komplexes mit der negativ geladenen Membran der Zielzelle führt schließlich zur Aufnahme der DNA durch Endozytose in die Säugerzelle.

2.26.2.1 Transfektion von Plasmid-DNA mittels *LipofectamineTM2000* (Invitrogen)

Die zu transfizierenden Hek293T-Zellen wurden am Abend vor der Transfektion ausgesät. Zur Transfektion von Plasmid-DNA wurde diese mit OPTIMEM (Gibco) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Parallel dazu wurde *LipofectamineTM2000* mit OPTIMEM in einem separaten Reaktionsgefäß vermischt und ebenfalls für 5 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden beide Gemische zusammenpipettiert und für 20 min bei RT inkubiert. In Abhängigkeit des Versuchs wurden entsprechende Mengen an Zellen ausgesät und entsprechende Plasmidmengen transfiziert.

Tab. 2.19: Transfektionstabelle mit *Lipofectamine*TM2000 (Invitrogen). In Abhängigkeit der Zellmenge wurden entsprechende Kulturschalen sowie Mengen an Plasmid-DNA, OPTIMEM und *Lipofectamine*TM2000 verwendet

Schale	Zellmenge	Menge an Plasmid-DNA	OPTI MEM	Lipofectamine	OPTIMEM	DMEM ohne Zusätze	Endvolumen
24-well	1,5 x 10 ⁵	300-450 ng	50 µl	1,5 µl	50 µl	150 µl	250 µl
6-well	5,0 x 10 ⁵	1 µg	250 µl	10 µl	250 µl	500 µl	1 ml
10 cm Schale	1,5 x 10 ⁶	6 µg	1500 µl	35 µl	1500 µl	3000 µl	6 ml

Da Antibiotika und -mykotika sowie FKS die Transfektionseffizienz beeinträchtigen können, wurden die Zellen vor der Transfektion in serumfreies Medium überführt. Anschließend wurde das Plasmid-*Lipofectamine*-Gemisch vorsichtig auf die Zellen gegeben und diese im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Fünf Stunden nach der Transfektion wurde die doppelte Menge an Medium mit 20% FKS hinzugeben. Nach der gewünschten Inkubationszeit von 24 bis 48 Stunden Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen für funktionelle Analysen verwendet.

2.26.2.2 Transfektion von siRNA mittels *Dharmafect*[®] (Thermo Scientific)

Die Transfektion von siRNA (*small interfering RNAs*; validiert und *Customer designed*; Qiagen) mittels *Dharmafect* erfolgte nach dem gleichen Prinzip und Protokoll wie unter Kapitel 2.26.2.1 beschrieben. Entsprechende Mengen sind der Transfektionstabelle 2.20 zu entnehmen.

Tab. 2.20: Transfektionstabelle mit *Dharmafect*[®] mit Angabe der Größe der Kulturschale, Zellmenge, Menge an siRNA sowie Volumina an OPTIMEM und *Dharmafect*

Schale	Zellmenge	Menge an siRNA	OPTI MEM	Dharmafect	OPTIMEM	DMEM + 10 % FKS	Endvolumen
24-well	1,0 x 10 ⁵	25 µl [2µM]	25 µl	1,5 µl	48,5 µl	400 µl	500 µl
6-well	1,5 x 10 ⁵	200 µl [1µM]	200 µl	6,0 µl	194,0 µl	1600 µl	2 ml

Nach 15 min Inkubation wurde DMEM mit 10% FKS zum siRNA-*Dharmafect*-Gemisch pipettiert und dann vorsichtig auf die Zellen gegeben und diese für 48 Stunden im Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert.

2.26.3 Zell-Ernte und -Lyse

Nach Transfektion und einer Inkubationszeit von 24 bis 48 Stunden wurden die Zellen für weitere funktionelle Analysen (z.B. Westernblot-Analyse, etc.) geerntet und lysiert. Dies erfolgte je nach Verwendungszweck der Lysate mittels eines geeigneten Lysis-Puffers (z.B. RIPA-Puffer, usw.). Dazu wurden die Zellen zunächst mit kaltem 1 x PBS gewaschen und anschließend mit dem entsprechenden Lysis-Puffer versetzt. Nach kurzer Inkubationszeit auf Eis wurden die so lysierten Zellen für weitere Versuche eingefroren. Das Einfrieren erhöht den Lysis-Effekt und erzielt somit eine bessere Zugänglichkeit zu den Proteinen.

2.26.3.1 Lösungen zur Zellernte

RIPA-Puffer	pH 8,6	Passive Lysis Puffer	Promega
150 mM	NaCl		
1 %	IGPAL	Ladepuffer	
0,5 %	DOC	1000 µl	NuPage [®] LDS Ladepuffer (4X)
0,1 %	SDS	200 µl	β-Mercaptoethanol
50 mM Tris		200 µl	<i>Protease Inhibitor Cocktail</i>
		600 µl	H ₂ O

2.27 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mit Hilfe des *BCA Protein Assay Kit* (Pierce Chemical), bei der nach Herstellerangaben vorgegangen wurde. Die Messung erfolgte am NanoDrop ND 100 mit Hilfe einer BSA-Eichkurve.

2.28 Westernblot-Analyse

Jede im Rahmen dieser Arbeit zur Westernblot-Analyse eingesetzte Proteinprobe wurde 1:1 mit einem 2 x Ladepuffer bestehend aus SDS-Ladepuffer (Invitrogen), β-Mercaptoethanol (Auffaltung von Disulfidbrücken) und *Protease Inhibitor* (Roche) versetzt, 5 min bei 95°C denaturiert und anschließend elektrophoretisch in einem SDS-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt.

2.28.1 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Proteine können über ein SDS-Polyacrylamid-Gel nach ihrer Molekulargröße elektrophoretisch aufgetrennt werden [Laemmli, 1970]. Obwohl bei einer Elektrophorese mit Polyacrylamid die Wanderungsgeschwindigkeit der Proteine sowohl von ihrer Ladung als auch von ihrer Größe abhängig ist, kann die Ladung der Proteine vernachlässigt werden, da SDS (Sodium Dodecyl Sulfat) im Überschuß hinzugefügt wird. Das anionische Detergenz SDS bindet in einem Verhältnis von etwa 1,4:1 (w/w) an hydrophobe Regionen der Proteine,

wodurch ihre ursprüngliche Ladung von der negativen Ladung des SDS überdeckt wird. Die Mobilität der aufzutrennenden Proteine wird demnach in erster Linie durch die Masse des SDS-Protein-Komplexes bestimmt. Das Trägermaterial der SDS-PAGE ist Polyacrylamid. Durch die Polymerisation von Acrylamid (AA) und die Vernetzung mit Methylen-Bisacrylamid (BIS) entsteht ein Polyacrylamid-Gel. Tetramethylethyldiamin (TEMED) katalysiert dabei als Starter eine Radikalkettenreaktion, wodurch Ammoniumpersulfat (APS) mit H₂O freie Radikale bildet. Diese reagieren mit AA zu Acrylamidradikalen, die sich mit weiteren Radikalen zu lange Ketten schließen. Das Co-Polymerisat BIS formt schließlich mit AA Netzstrukturen. Die Porenweite eines Polyacrylamid-Gels hängt von der AA-Konzentration ab. Das Verhältnis von AA und BIS bleibt dabei konstant. Je höher der prozentuale Anteil an AA innerhalb eines Gels ist, desto engmaschiger ist es. Bei einer diskontinuierlichen Elektrophorese verfügen Polyacrylamid-Gele oftmals über verschiedene Porengrößen, wodurch eine scharfe Auftrennung der Proteine erreicht werden kann. Das im Rahmen dieser Arbeit verwendete *NuPage*TM3-8% Tris-Acetat-Gel besitzt einen Gradienten an AA. Mit einem AA-Anteil von 3% im oberen Gelbereich sind die Poren relativ groß, während die Porengröße mit der kontinuierlichen Zunahme des AA-Anteils bis auf 8% abnimmt. Die Auftrennung der denaturierten Proteine erfolgte in einem von der Firma Invitrogen vertriebenen System. Sowohl die Elektrophorese der Proteine als auch der daran anschließende Transfer dieser auf eine PVDF-Membran wurden in einer *XCell SureLock*TM-Minizelle durchgeführt. Das kommerzielle *NuPage*TM3-8% Tris-Acetat-Gel wurde dazu in das System eingespannt und die Kammern mit dem entsprechenden Laufpuffer gefüllt. Anschließend wurden 5 µg der zuvor denaturierten Proteinproben sowie 10 µl des *Novex* Protein-Markers (Invitrogen) auf das Gel aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 200 Volt für 55 min.

2.28.2 Proteintransfer auf eine PVDF-Membran

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der Proteine wurden diese auf eine Polyvinylidenfluorid-Membran (PVDF) transferiert (*Blotting*), um sie so für Antikörper frei zugänglich zu machen. Dabei wanderten die negativ geladenen Proteine durch ein angelegtes elektrisches Feld aus dem Gel auf die PVDF-Membran. Vor dem sogenannten *Blotting* wurde die auf die Größe des Gels zugeschnittene PVDF-Membran zur Erhöhung der Transfereffizienz für 30 sec in Methanol inkubiert. Nach kurzem Waschen der Membran in H₂O schloss sich eine Äquilibrierungsphase von mindestens 15 min in Transferpuffer an. Die Membran wurde anschließend, von *Blotting*-Polstern und Filterpapieren umgeben, so in das *XCell*TM-II-Blot-Modul eingesetzt, dass sich die Proteine vom Gel in Richtung Anode bewegen und auf der Membran gebunden werden. Der Transfer erfolgte für 1 Stunde 15 min bei 32 Volt und 210mA.

2.28.3 Substanzen zur Western-Blot-Analyse (Amersham Biosciences; Invitrogen)

Hybond™-P PVDF Membran	Novex® Sharp Standard (Protein-Leiter)
NuPage™ 3-8 % Tris-Acetate Gel	NuPage®-Tris-Acetate SDS Laufpuffer (20x)
NuPage® SDS Ladepuffer (4X)	NuPage® Transferpuffer (20X)

Laufpuffer A

40 ml (20X)	Tris-Acetate SDS Laufpuffer
ad 800 ml	A. dest

Laufpuffer B

200 ml	Laufpuffer A
500 µl	Antioxidanz

Transferpuffer

25 ml (20X)	NuPage® Transferpuffer
50 ml	Methanol
500 µl	Antioxidanz
ad 500 ml	A. Dest

2.28.4 Immunoblot-Chemilumineszenz-Detektion

Die geblotteten Proteine konnten anschließend mittels spezifischer Antikörper-Bindung analysiert werden. Die Detektion der an die PDVF-Membran gebundenen Proteine erfolgte durch eine Immunoblot-Chemilumineszenz-Detektion. Das Prinzip beruht dabei auf dem Einsatz zweier verschiedener Antikörper. Der Primär-Antikörper erkennt spezifisch das zu untersuchende Protein, indem er an das für den Antikörper spezifische Epitop bindet. Dieses kann entweder genspezifisch oder spezifisch für einen sogenannten Protein-Affinitäts-Tag (wie *c-myc* oder *His*) sein, welcher im Expressionsvektor enthalten ist. Gegen diesen ist der Sekundär-Antikörper, an den zusätzlich das Enzym Meerrettich-Peroxidase (*horse-radish peroxidase*, HRP) gekoppelt ist, gerichtet. Durch die Einwirkung der HRP kommt es beim Prozeß der Chemilumineszenz zu einer oxidativen Freisetzung von Stickstoff aus Luminol. Dies führt zu einer Abstrahlung von Lichtenergie, wobei das emittierte Licht eine Wellenlänge von 400 bis 700 nm hat. Durch Auflegen eines Röntgenfilms kann das Ausmaß der Reaktion quantifiziert werden. Je stärker die Oxidation, desto intensiver ist die Schwarzfärbung.

2.28.5 Immunoblot

Nach dem Transferprozeß der Proteine auf die PVFD-Membran wurden die Proteine mittels Bindung von spezifischen Antikörpern analysiert. Die Membran wurde dazu nach dem Proteintransfer zur Entfernung des Methanols kurz mit Aqua dest. gewaschen. Zum Blocken von Bindestellen für unspezifische Antikörper-Reaktionen wurde die Membran für eine Stunde in einer TBS-Lösung mit einem Milchpulver-Anteil von 6% auf einem Schüttler inkubiert.

Die Bindung der Primär-Antikörper erfolgte in einer mit den entsprechenden Antikörper versetzten 3%igen Milchpulver-TBST-Lösung bei 4 °C über Nacht auf einem Rollator.

TBS-(T)		pH-Wert 7,56		Blockierungslösung A	
20 mM	Tris	6 %	Milchpulver	in TBS	
137 mM	NaCl				
(0,5 %	Tween 20)	Blockierungslösung B			
	A. dest	3 %	Milchpulver	in TBS-T	

Tab. 2.21: Zur Immunodetektion verwendete Antikörper

Antikörper	Verdünnung	Isotyp	Firma
α - β -Aktin	1 : 20.000	IgG _{2a}	Sigma
α -Calnexin	1 : 1.000	IgG ₁	BD Biosciences
α -LRP5/6	1 : 250	IgG _{2b}	Calbiochem
α -c-myc	1 : 1.000	IgG ₁	Santa Cruz Biotechn.
α -V5	1 : 2.500	IgG _{2a}	Invitrogen
α -Maus	1 : 5.000	IgM-HRP-Ziege	Perbio

Nach der Inkubation wurden alle nicht gebundenen Antikörper durch dreimaliges Waschen für jeweils 5 min in TBST entfernt. Anschließend erfolgte die Bindung des Sekundär-Antikörpers (α -Mouse-HRP; 1:5.000) in einer 3%igen Milchpulver-TBST-Lösung. Nach einer Inkubation von einer Stunde auf einem Rollator bei RT wurde die Membran zur Beseitigung ungebundener Antikörper erneut dreimal für 5 min in TBST gewaschen und zur Detektion mit Chemilumineszenz eingesetzt.

2.28.6 Chemilumineszenz-Detektion

Die Membran wurde anschließend mit der Proteinseite nach oben auf eine Glasplatte gelegt und die Chemilumineszenz-Lösung, ein Gemisch aus Luminol und einem Peroxidpuffer in einem Verhältnis von 1:1, gleichmäßig aufgetropft. Nach einer Inkubation von 5 min bei RT wurde die Membran abgetropft, in Folie eingepackt und in eine Filmkassette eingelegt. Zur Quantifizierung wurde jeweils ein Röntgenfilm für unterschiedliche Zeiträume exponiert.

Chemilumineszenzlösung

750 μ l	<i>Super Signal[®] West Dura Luminol/Enhancer Solution</i>	Perbio
750 μ l	<i>Super Signal[®] West Dura Stable Peroxide Buffer</i>	Perbio

2.29 Luciferase Reporter Assay

Zur funktionellen Analyse von LRP5 (*low-density lipoprotein receptor-related protein 5*) sowie verschiedener Varianten und Mutationen dieses Transmembranrezeptors wurde ein *Luciferase Reporter Assay* durchgeführt [Ai *et al.*, 2005]. Reporter-Systeme werden z.B. zur Analyse von Rezeptoren, Transkriptionsfaktoren und des intrazellulären *Signaling* eingesetzt. Der im Rahmen dieser Arbeit verwendete *Luciferase Reporter Assay* (Promega) macht sich die *Firefly-Luciferase* als Reporter-Gen zunutze. Die *Firefly-Luciferase* ist ein Enzym des Glühwürmchens *Photinus pyralis*, das bei der Katalyse einer Oxidationsreaktion Licht emittiert, welches mit Hilfe eines Luminometers gemessen werden kann.

Das Prinzip des im Rahmen dieser Arbeit verwendeten *Luciferase Reporter Assays* zur Analyse der WNT/NDP-Signaltransduktionsaktivität von LRP5 bzw. seinen Varianten ist in Abbildung 2.4 dargestellt. Im inaktiven Zustand dieser WNT/NDP-Signalkaskade sind FZD und LRP5 ungebunden. Dadurch liegt β -Catenin durch Bindung an den ternären Degradationskomplex bestehend aus Axin, GSK3 und APC in einem phosphorylierten Zustand vor und wird über den Ubiquitin-Proteasom-Abbauweg inhibiert. Es findet keine Transkription im Zellkern statt. Die Aktivierung des Signalweges wird durch Bindung von Norrin oder WNT an den Rezeptor Frizzled und den Co-Rezeptor LRP5 erreicht (Kapitel 1.8). Im Rahmen des hier verwendeten *Luciferase Assays* wurden Expressionsvektoren vom Wildtyp-*LRP5* bzw. einer zu analysierenden Mutation oder Variante von *LRP5* transient in Hek293T-Zellen transfiziert und dadurch überexprimiert. Durch Co-Transfektion von Expressionsvektoren mit *NDP* und *FZD4* wurde der WNT/NDP-Signaltransduktionsweg in Abhängigkeit von LRP5 aktiviert. Dadurch unterbleiben die Phosphorylierung und somit auch der proteolytische Abbau von β -Catenin. Dies führte zu einer Akkumulation von β -Catenin im Cytosol und seiner Translokation in den Zellkern, wo es an den Transkriptionsfaktor TCF binden und die Transkription des Zielgens, der ebenfalls co-transfizierten *Firefly-Luciferase*-Konstrukte, aktivieren konnte. Das hier verwendete *Firefly-Luciferase*-Reporter-Gen-Konstrukt (*Topflash TCF Reporter Plasmid*; Upstate) enthält im Promoterbereich mehrere TCF-Bindungsstellen und wird somit im Falle einer aktivierten Signaltransduktion transkribiert. Die Aktivität der Luciferase und damit auch die transkriptionelle Aktivierung wurden luminometrisch bestimmt. Die gemessene Luciferase-Aktivität lieferte wiederum Rückschlüsse über die Fähigkeit des exogen zugeführten LRP5-Proteins zur Signaltransduktion.

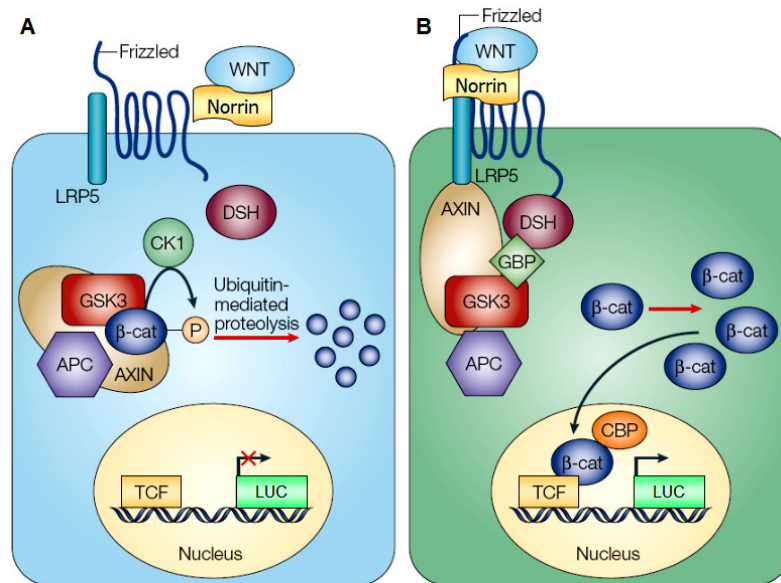


Abb. 2.4: Schematische Darstellung des Prinzips des *WNT/NDP-Signaling Luciferase Reporter Assays* zur Analyse der LRP5-Signaltransduktion. **A:** Inaktiver Zustand. Bei ungebundenem LRP5 und Frizzled an Norrin und WNT ist β -Catenin im phosphoryliertem Zustand inhibiert. Es findet keine Transkription im Zellkern statt. **B:** Nach Aktivierung der WNT-Signaltransduktion durch Bindung von Norrin oder eines WNT-Proteins an den Rezeptor Frizzled und dem Co-Rezeptor LRP5, wird die Phosphorylierung von β -Catenin aufgehoben, wodurch es in den Zellkern gelangt, an den Transkriptionsfaktor TCF bindet und durch seine transaktivierende Domäne die Transkription der Luciferase initiiert. APC = *adenomatous polyposis coli*; β -cat = β -Catenin; CBP = CREB-Bindeprotein; CK = Casein Kinase; DSH = *Dishevelled*; GBP = GSK3-Bindeprotein; GSK = Glykogen Synthase Kinase; LRP = Low Density Lipoprotein Rezeptorprotein; P = Phosphorylierung; TCF = Transkriptionsfaktor [Moon *et al.*; 2004; modifiziert].

Hek293T-Zellen wurden in einer 24-well Platte mit einer Dichte von $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät und mit dem zu untersuchenden *LRP5*-Expressionsvektor (*LRP5*-WT, -Mut bzw. *LRP5L*) und den Expressionskonstrukten für *Norrin* (*NDP*), *Frizzled-4* (*FZD4*), der *Firefly*- und *Renilla-Luciferase* transient co-transfiziert. Zusätzlich wurde jeder Transfektionsansatz mit dem Expressionskonstrukt des Chaperons *Mesoderm development candidate 2* (*MESDC2*) co-transfiziert, welches für die korrekte Faltung von LRP5 notwendig ist [Hsieh *et al.*, 2003; Ai *et al.*, 2005]. Nach einer Inkubationszeit von 30 Stunden wurden die transfizierten Zellen mit 100 μ l *Passive Lysis*-Puffer lysiert. Nach kurzer Inkubation auf Eis wurden die Zellen über Nacht eingefroren. Schließlich wurde die *Firefly-Luciferase*-Aktivität jeder einzelnen Probe anhand des *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System Kits* (Promega) in einem *GloMaxTM 96 Microplate Luminometer* (Promega) gemessen. Dieses System ermöglicht die sequentielle Bestimmung der *Firefly*-(*Photinus pyralis*) und der *Renilla*-(*Renilla reniformis*) Luciferase in einer Probe. Letztere ist unabhängig vom oben beschriebenen Signaltransduktionsweg und diente als interne Kontrolle der Transfektionseffizienz und zur Normalisierung. Zur Kontrolle der eingesetzten Mengen an Zell-Lysaten wurde die Expression der einzelnen Proteine mittels Westernblot-Analyse untersucht.

2.30 Quantifizierung der Westernblot-Signalintensitäten

Zur Quantifizierung der Westernblot-Signalintensitäten von LRP5 wurden diese und die von β -Aktin anhand des *Quantity Ones Basic Systems* (version 4.5.1; BioRad) digital gemessen. Die gemessenen Werte der LRP5 Signale wurden erst durch die Mittelwerte der entsprechenden *Renilla*-Luciferase-Werte (aus dem *Luciferase Reporter Assay*) dividiert und diese schließlich durch die β -Aktin-Werte geteilt. So wurden alle Werte zur Kontrolle der Transfektionseffizienz sowie zur Kontrolle der aufgetragenen Menge an Proteinen normalisiert.

2.31 N-Glykosylierung

Zur Untersuchung einer möglichen N-Glykosylierung eines Proteins kann ein einfacher N-*Glykosidase*-Verdau durchgeführt und anschließend über einen Westernblot analysiert werden. N-glykosylierte Proteine weisen nach dieser Behandlung mit *N-Glykosidase* ein geringeres Molekulargewicht als unbehandelte auf. Unglykosylierte Proteine dagegen dürften trotz *N-Glykosidase*-Behandlung keinen Unterschied im Molekulargewicht aufzeigen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden Hek293T-Zellen mit *LRP5*-Expressionsvektoren (*LRP5*-WT_{9L} bzw. *LRP5*-Mut_{3L}) und dem Expressionsvektor für *MESDC2* (Kapitel 2.29) transient transfiziert und nach 24 bis 48 Stunden Inkubation mit RIPA-Puffer lysiert. Das Zell-Lysat (19,5 μ l) wurde mit 5 μ l β -Mercaptoethanol-haltigem SDS-PAGE Puffer (5x) gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Zu diesem Mix wurde anschließend 20 μ l PNGase Reaktionspuffer (2,5x) (NEB) hinzugegeben und für 5 min bei 100°C erhitzt. Anschließend wurde die Probe mit 5 μ l NP-40 und 1 μ l (500 *Units*) *N-Glykosidase F* (*PNGase F*; NEB) versetzt und über Nacht bei 37°C inkubiert. Die Analyse der *N-Glykosidase* behandelten Proben erfolgte mittels Westernblot.

2.32 Ultrazentrifugation

Zur subzellulären Fraktionierung von cytosolischen und membranständigen Proteinen wurde die Methode der Ultrazentrifugation angewendet. Dabei wurden die Zellbestandteile nach einer schonenden Homogenisierung in einem Sucrose-Puffer nach ihrer Größe und Dichte durch Zentrifugation aufgetrennt [Marsh *et al.*, 1987].

Hek293T-Zellen wurden in einer 10 cm Schale kultiviert und mit jeweils 2 μ g des Expressionsvektors für das zu untersuchende Protein (*LRP5*-WT_{9L} bzw. eine *LRP5*-Mutante) sowie des Expressionskonstrukts des Chaperons *MESDC2* (Kapitel 2.29) transient transfiziert. Nach 24 Stunden wurden die Zellen in eiskaltem 1 x PBS gewaschen und für 10 min bei 500 x g und 4°C pelletiert. Das Zell-Pellet wurde in 2,7 ml Sucrose-Puffer und 300 μ l Protease Inhibitor resuspendiert und in einen Glaskolben überführt. Durch Auf- und

Abziehen des Pistills (ca. 20-30x) wurden die Zellen lysiert. Zell-Trümmer wurden durch Zentrifugation für 10 min bei 700 x g und 4°C pelletiert und verworfen. Der Überstand wurde in ein Beckmann-Reaktionsgefäß überführt, das der hohen Zentrifugalkraft in der Ultrazentrifuge standhält. Dabei war es wichtig, den Überstand ganz vorsichtig und nicht vollständig abzunehmen, damit kein unnötiger Zell-Schutt das Ergebnis verfälschen könnte. Die Probe wurde dann für 30 min bei 45.000 x g in einer *Optima™ Max Ultracentrifuge* (Beckman Coulter) zentrifugiert. Während der Überstand die cytosolischen Proteine beinhaltet, wurden die Membranproteine pelletiert. Anschließend wurde das Zellpellet in RIPA-Puffer resuspendiert und zusammen mit der cytosolischen Fraktion zur Westernblot-Analyse eingestezt. Als Kontrollen einer erfolgreichen Trennung von cytosolischen und membranständigen Proteinen dienten Antikörper gegen das Membranmarkerprotein Calnexin und das cytosolische Protein β -Aktin.

2.32.1 Sucrose-Puffer für die Ultrazentrifugation

0,25M Sucrose

10 mM Triethanolamin pH 7.8

10 mM Essigsäure

1 x *Protease inhibitor cocktail*

2.33 Secretion Assay

Zur Analyse des intrazellulären Transports von LRP5 bzw. seinen Mutanten und Varianten wurden Hek293T-Zellen mit Expressionvektoren kodierend für *LRP5*-Wildtyp und die verschiedenen *LRP5*-Mutanten (*LRP5* Δ C-Konstrukte ohne Transmembran- und cytoplasmatische Domäne) sowie des Expressionsvektors des Chaperons *MESDC2* (Kapitel 2.29) mittels *Lipofectamine™ 2000* (Invitrogen) transient transfiziert [Ai et al, 2005]. Durch Fehlen der Transmembrandomäne, sollte LRP5 bei korrekter intrazellulärem Transport in den Überstand (*Conditioned Medium*) sezerniert werden. Dazu wurde das Kulturmedium jeder Schale 24 Stunden nach der Transfektion durch 1 ml serumfreies DMEM auswechselt und die Zellen für weitere 24 Stunden inkubiert. Durch diesen Mediumwechsel waren die Proteinmengen vom Zeitpunkt 0 bis zum Zeitpunkt 24 aller Proben äquivalent. Das *Conditioned Medium* (CM) wurde schließlich in ein Reaktionsgefäß überführt und die Zellen in 1 ml RIPA-Puffer lysiert (LY). Sowohl die CM- als auch die LY-Proben wurden mit SDS-Ladepuffer versetzt und über Westernblot-Immunodetektion mittels eines LRP5-Antikörpers (Calbiochem) analysiert.

2.34 *In silico*-Analyse von Poly-Leucin-Signalpeptiden im humanen Genom

In Zusammenarbeit mit Dr. Jan Freudenberg aus dem *Center for Genomics and Human Genetics* des *Feinstein Institute for Medical Research (North Shore–Long Island Jewish (LIJ) University Hospital, Manhassat, New York, USA)* wurde *in silico* genomweit nach Poly-Leucin-Signalpeptiden gesucht. Humane autosomale Gene wurden anhand der *Ensembl* Datenbank (Version 37.35) ermittelt und über ein Signalpeptid-Prädiktionsprogramm gefiltert [Emanuelsson *et al.*, 2007]. Die genomischen Sequenzen der gefilterten Proteine mit prädiertem Signalpeptid sowie eine mögliche Annotation repetitiver Sequenzen wurden über den UCSC Genome Browser (*University of California, Santa Cruz*) erhalten. Die Repeat-Annotationen wurden außerdem über die beiden *Tools* des *RepeatMasker* (www.repeatmasker.org) sowie *TandemRepeatFinder* [Benson, 1999] genauer analysiert. Schließlich wurden einige dieser bioinformatisch ermittelten Leucin-*Repeats* innerhalb eines Signalpeptids eines Gens anhand von PCRs mit fluoreszenz-markierten Primern genotypisiert (Kapitel 2.21 und 3.2.3).

2.35 Statistische Auswertungen

Statistisch auszuwertende Experimente wurden in mehreren unabhängigen Läufen und Mehrfachmessungen durchgeführt. Daraus konnten Mittelwerte und entsprechende Standardabweichungen berechnet werden. Mit Hilfe des *Student's T-Test* (Excel, Microsoft Office) wurde eine mögliche statistische Signifikanz der Ergebnisse in Bezug zu entsprechenden Kontrollen ermittelt. Die p-Werte sind in den Diagrammen mit einem Stern (*) markiert. Es gilt: * = $p < 0,05$; ** = $p < 0,01$; *** = $p < 0,001$.

3 ERGEBNISSE

3.1 Familie #1

3.1.1 Genomweite Kopplungsanalyse (*Linkage Analysis*)

In Anbetracht der bislang in der Literatur noch nicht beschriebenen Kombination aus Augenfehlbildungen, einer fortschreitenden Muskelatrophie und einer milden mentalen Retardierung in der türkischen Familie, ließ sich ein neues autosomal-rezessives Syndrom vermuten. Zur Identifikation und positionellen Klonierung des ursächlichen Gens wurde eine genomweite Kopplungsanalyse durchgeführt. Trotz der Konsanguinität, die eine homozygote *Founder*-Mutation vermuten ließ, konnte keine größere homozygote Region bei den betroffenen Familienmitgliedern mittels der genomweiten Kopplungsanalyse mit einem *GeneChip*[®] *Human Mapping 10K Array Xba142* (Affymetrix, Santa Clara, CA) ermittelt werden. Dennoch fanden sich vier potentiell gekoppelte Regionen mit einem *LOD-Score* von > 2 durch eine parametrische Analyse der Kopplungsdaten unter Berücksichtigung eines autosomal-rezessiven Erbgangs und der Vernachlässigung der Konsanguinität. Folgende vier Regionen, die in der graphischen Darstellung in Abbildung 3.1 mit einem blauen Pfeil hervorgehoben wurden, konnten identifiziert werden:

- Chromosom 1p21.2 mit einer Größe von ca. 1,9 MB
- Chromosom 6p21.1-21.2 mit einer Größe von ca. 7,5 MB
- Chromosom 11q12.1-13.5 mit einer Größe von ca. 18,8 MB
- Chromosom 11q22.1-22.3 mit einer Größe von ca. 5,6 MB

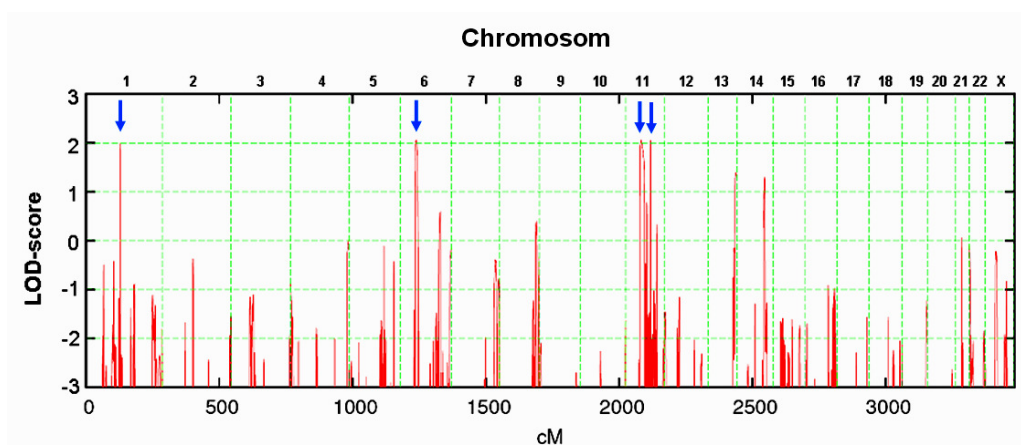


Abb. 3.1: Graphische Darstellung des Ergebnisses der genomweiten Kopplungsanalyse mittels des *GeneChip*[®] *Human Mapping 10K Arrays* und parametrische *LOD-Score*-Berechnung, aus der insgesamt vier Regionen mit einem maximalen *LOD-Score* von > 2 hervorgingen. Diese sind jeweils mit einem blauen Pfeil gekennzeichnet.

3.1.2 Sequenzierung von Kandidatengenen am Locus 11q12.1-13.5

Aufgrund der phänotypischen Überlappung des Fehlbildungssyndroms in der türkischen Familie, insbesondere der Augenphänotypen, mit dem Norrie-, OPGG-Syndrom und der FEVR, die alle auf eine gestörte WNT-Signaltransduktion zurückzuführen sind, fokussierte sich die Analyse auf Kandidatengene, die im WNT/NDP-Signaltransduktionsweg involviert sind oder sein könnten. Insbesondere der im Rahmen der genomweiten Kopplungsanalyse identifizierte Locus auf Chromosom 11q12.1-13.5 (Abb. 3.2) bot sich als ein vielversprechender Locus an. Aus diesem wurden insgesamt 8 Kandidatengene (*HTATIP*, *DRAP1*, *LRP5*, *FGF19*, *FGF4*, *FGF3*, *WNT11*, *FZD4*), die eine mögliche Rolle im WNT/NDP-Signaltransduktionsweg spielen, vollständig sequenziert. Krankheitsauslösende Mutationen waren in 7 der sequenzierten Kandidatengenen nicht nachweisbar.

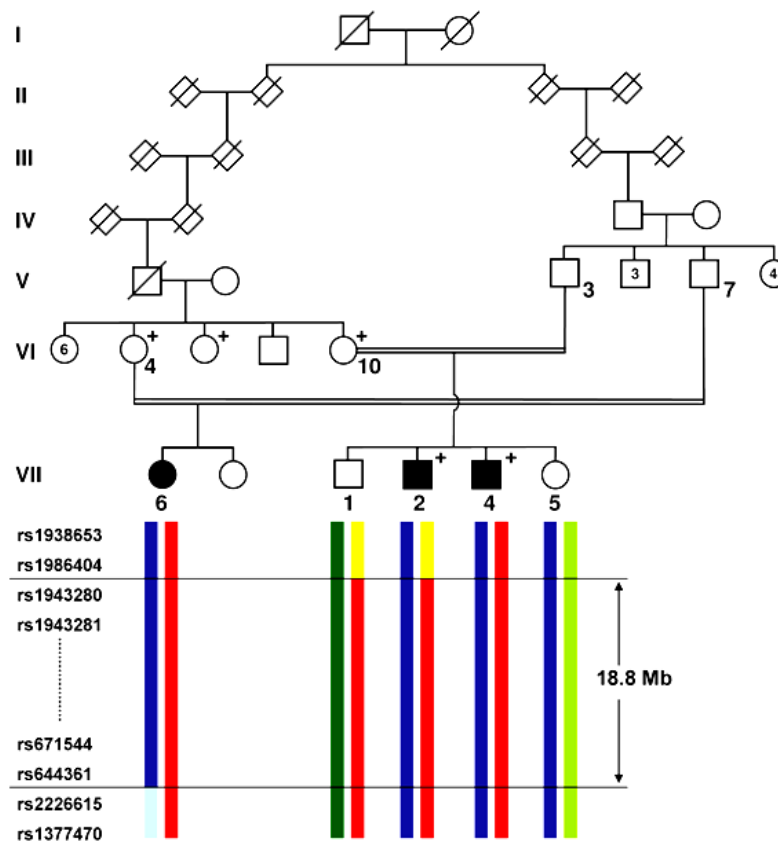


Abb. 3.2: Erweiterter Stammbaum der türkischen Familie mit drei betroffenen Individuen und Haplotypen der Generation VII in der gekoppelten Region auf Chromosom 11q12.1-13.5. Individuen mit einer arabischen Zahl neben bzw. unter ihrem Stammbaumsymbol (Quadrat = männlich bzw. Kreis = weiblich) wurden in die genomweite Kopplungsanalyse (10K SNP Array) einbezogen. Träger einer Phänotyp-unabhängigen, balancierten Translokation $t(6;19)(p11;p13)$, welche durch konventionelle Karyotypisierung identifiziert wurde, sind mit einem Plusymbol gekennzeichnet. In der kritischen Region von 18,8 Mb teilen sich alle drei betroffenen Familienmitglieder die gleiche Haplotypkombination (blau und rot gekennzeichnet). SNPs, die die Rekombinationsbruchpunkte flankieren, sind links von den Haplotypen angegeben.

3.1.3 Mutations-Screening in *LRP5*

Alle 23 kodierenden Exons und flankierende Intronbereiche von *LRP5* auf Chromosom 11q13.2 wurden per Standard-PCR anhand genomischer Patienten-DNA amplifiziert und direkt sequenziert und mit der Referenz-Sequenz aus der Datenbank des *UCSC Genome Browsers* mit Hilfe des Programmes *DNASTAR-SeqMan* abgeglichen. Dabei musste beachtet werden, dass spezifisch *LRP5* (Chromosom 11) und nicht die hoch-homologe Sequenz des Pseudogens *LRP5L* auf Chromosom 22 amplifiziert wurde. Das Pseudogen besitzt 90% Homologie zu Exon 1 sowie zu Exon 3 bis 9 von *LRP5*.

In 15 der 23 Sequenzierabschnitte von *LRP5* wurden sowohl heterozygote als auch homozygote Sequenzveränderungen identifiziert. Diese wurden jedoch als nicht pathogen eingestuft, da für diese bereits Annotationen als SNPs bei *NCBI dbSNP* vorhanden waren. Bei einer nicht annotierten Sequenzveränderung in Intron 13 (c.3027+68c>t) wurden gesunde Kontrollen mittels Restriktionsverdau mit *HpyCH4III* auf die Sequenzveränderung hin untersucht. Von den 90 Kontrollen trugen 3 % die gleiche Veränderung, wodurch diese folglich ebenfalls als ursächlich ausgeschlossen werden konnte. Eine tabellarische Zusammenfassung der identifizierten SNPs ist in Tabelle 3.1 wiedergegeben.

Tab. 3.1: Tabellarische Übersicht über alle bei den Betroffenen gefundenen homozygoten und heterozygoten SNPs in *LRP5* mit Angabe der Lokalisation, der Annotation bei *NCBI dbSNP*, des Aminosäure-Austauschs und des Genotypen der Betroffenen.

LOKALISATION	NCBI dbSNP ANNOTATION	AMINOSÄURE-AUSTAUSCH	BETROFFENEN-GENOTYP
INTRON 2	rs643981 [c/t]	---	HOMOZYGOT [t/t]
INTRON 3	rs11574424 [c/t]	---	HETEROZYGOT [c/t]
INTRON 4	rs314776 [t/c]	---	HOMOZYGOT [c/c]
INTRON 5	rs17848255 [c/t]	---	HOMOZYGOT [t/t]
INTRON 6	rs4988320 [g/a]	---	HOMOZYGOT [a/a]
EXON 8	rs545382 [T/C]	F549F	HETEROZYGOT [T/C]
INTRON 8	rs4988332 [c/t]	---	HETEROZYGOT [c/t]
EXON 9	rs2277268 [G/A]	E644E	HETEROZYGOT [G/A]
INTRON 10	rs4988322 [c/t]	---	HETEROZYGOT [t/c]
INTRON 11	rs2242339 [c/t]	---	HETEROZYGOT [c/t]
INTRON 13	c.3027+68c>t [c/t]	---	HETEROZYGOT [c/t]
INTRON 14	rs554734 [t/g]	---	HOMOZYGOT [g/g]
EXON 15	rs556442 [A/G]	V1119V	HOMOZYGOT [G/G]
INTRON 16	rs607887 [c/t]	---	HOMOZYGOT [t/t]
EXON 18	rs3736228 [C/T]	A1330V	HETEROZYGOT [C/T]

3.1.4 Identifikation einer Mutation im Signalpeptid von *LRP5*

Exon 1 von *LRP5* ist besonders GC-reich und erwies sich als sehr schwer zu amplifizieren. Durch die direkte Sequenzierung fand sich eine heterozygote *in-frame*-Deletion von 18 bp innerhalb eines CTG-Repeat in Exon 1 bei allen drei betroffenen Patienten sowie den beiden Vätern und einem gesunden Geschwister. Das Wildtyp-Allel (WT_{9L}) bestand aus 9 CTG-Repeat und kodiert 9 Leucine. Das mutierte Allel hingegen wies lediglich 3 CTG-Repeat (3 Leucine = Mut_{3L}) auf (Abb. 3.3).

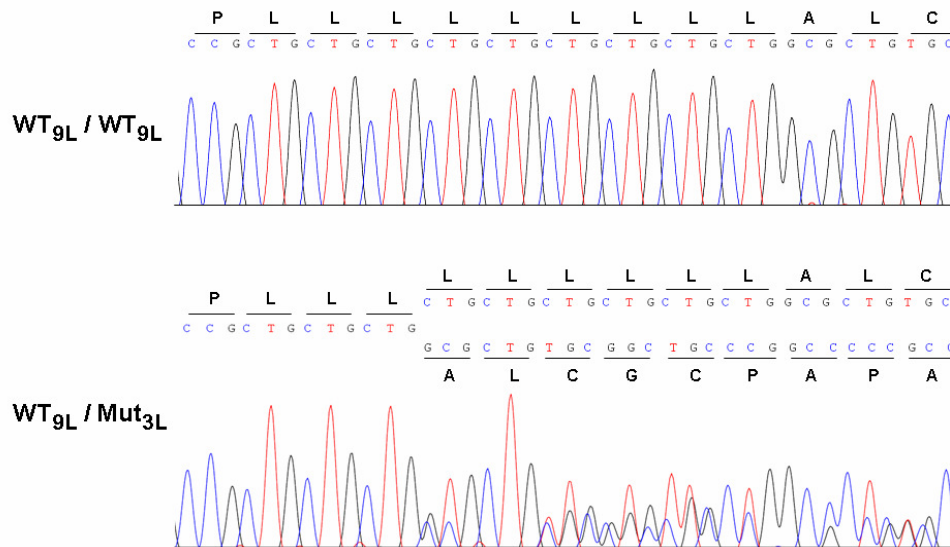


Abb. 3.3: Elektropherogramme eines Ausschnitts der direkten Sequenzierung der genomischen PCR-Produkte von Exon 1 in *LRP5*. Die gesunde Mutter (VI:4; obere Sequenz) ist homozygot für das Wildtyp-Allel mit 9 Leucinen (WT_{9L}). Der Betroffene (VII:6; untere Sequenz) dagegen ist heterozygot für ein Allel mit einer 18 bp-Deletion im CTG-Repeat (Mut_{3L}) und das WT_{9L}-Allel.

Die identifizierte Deletion befindet sich in einem Leucin-*Stretch* innerhalb des N-terminalen Signalpeptids des Rezeptors, welches die Plasmamembran-Lokalisation des Proteins vermittelt. Mit Hilfe des *SignalP*-Prädiktionsprogrammes [www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/] wurde diese Mutation auf einen möglichen Effekt auf das Signalpeptid zunächst bioinformatisch analysiert. Das Ergebnis dieser Signalpeptid-Prädiktion ist graphisch in Abbildung 3.4 wiedergegeben. Es ließ sich anhand dieses Prädiktionsprogrammes zeigen, dass der sogenannte *S-Score* (grüne Linie) für ein Signalpeptid in *LRP5* mit nur 3 anstatt 9 Leucinen stark abnimmt und insbesondere für die Aminosäuren 8 bis 15 deutlich unter den Schwellenwert 0,5 (rot gestrichelte Linie) fällt. Dieser *S-Score* gibt die Wahrscheinlichkeit einer jeden Aminosäure an, Teil eines Signalpeptides zu sein.

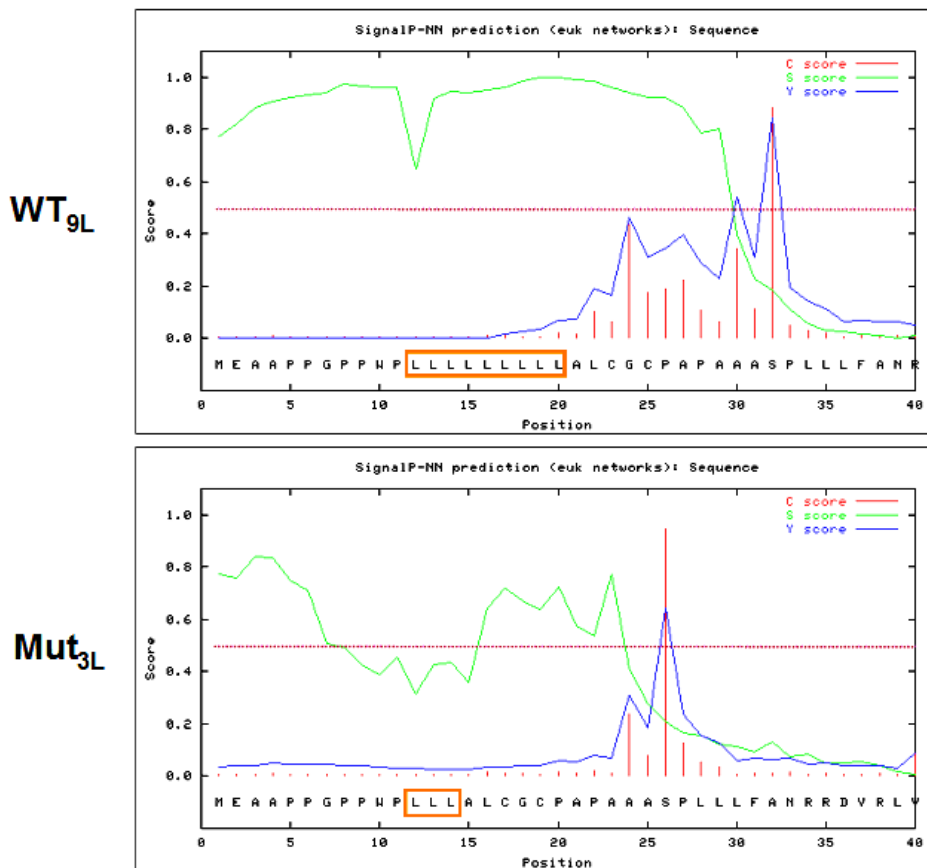


Abb. 3.4: *In silico* Analyse des LRP5-Signalpeptids. Der N-Terminus mit den ersten 40 Aminosäuren des LRP5-Wildtyp-Allels (WT_{9L}) bzw. des mutierten Allels (Mut_{3L}) wurde anhand der Datenbank *SignalP_3.0 Server* www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ *in silico* analysiert. Der S-Score (grüne Linie), der jede einzelne Aminosäure als Teil eines Signalpeptids einordnet, fällt bei der mutierten Signalpeptid-Sequenz (Mut_{3L}) unter den Schwellenwert (rot gestrichelte Linie bei 0,5). Sowohl der C-Score als auch der Y-Score geben die Position zur Signalpeptid-Abspaltung an.

Dieser Leucin-*Stretch* im Signalpeptid von *LRP5* ist in der Literatur als polymorph beschrieben [van Wesenbeck *et al.*, 2003; Crabbe *et al.*, 2005]. Allerdings betrug das bislang kürzeste beobachtete Allel 6 statt 9 Leucine. Ein Allel mit nur 3 Leucinen war nicht beschrieben. Aus diesem Grunde wurde dieser CTG-*Repeat*/Leucin-*Stretch* mittels eines PCR basierten *GeneScan*-Assays mit Fluoreszenz-markierten Primern bei 876 Kontroll-Chromosomen typisiert. Keines der insgesamt 176 türkischen und 262 kaukasischen Kontroll-Individuen wies ein Allel mit nur 3 statt 9 Leucinen im CTG-*Repeat* auf.

Neben dem Wildtyp-Allel mit 9 Leucinen [(CTG)₉], das in nahezu 90 % der türkischen als auch der kaukasischen Kontroll-Chromosomen vorlag, wurde in den beiden Kontrollgruppen das bereits in der Literatur beschriebene 10 Leu-Allel [(CTG)₁₀] mit einer Frequenz von 10% identifiziert.

Vier weitere Allele waren außerdem unter den deutschen Kontroll-Individuen zu finden. Mit einer Frequenz von 1 % lag das ebenfalls bereits beschriebene Allel mit 6 Leucinen [(CTG)₆] vor. Die Häufigkeit der Allele mit 7, 8 und 11 Leucinen [(CTG)_{7,8,11}] betrug weniger als 1 %.

Die Allel-Verteilung der unterschiedlichen CTG-*Repeats* unter den Kontroll-Chromosomen ist in Tabelle 3.2 wiedergegeben. Es waren ausschließlich heterozygote Abweichungen von der Referenz-*Repeat*-Länge (CTG)₉ zu beobachten, homozygote Abweichungen wurden nicht identifiziert.

Tab. 3.2. Allel-Verteilung des CTG-*Repeats* im Signalpeptid von *LRP5* in 262 deutschen und 176 türkischen Kontroll-Individuen.

ALLELE	6 LEU ¹ (CTG) ₆	7 LEU ¹ (CTG) ₇	8 LEU ¹ (CTG) ₈	9 LEU ¹ (CTG) ₉	10 LEU ¹ (CTG) ₁₀	11 LEU ¹ (CTG) ₁₁	TOTAL
DEUTSCHE KONTROLLEN							
Absolute Frequenz	7	1	1	460	54	1	524
Relative Frequenz	1,34 %	0,19 %	0,19 %	87,79 %	10,30 %	0,19 %	100 %
TÜRKISCHE KONTROLLEN							
Absolute Frequenz	–	–	–	316	36	–	352
Relative Frequenz	–	–	–	89,77 %	10,23 %	–	100 %

¹ Alle genotypisierten Individuen mit diesem Allel tragen das (CTG)₉/WT_{9L}-Allel auf dem anderen Chromosom.

Da das Allel mit nur 3 Leucinen im Signalpeptid von *LRP5* ausschließlich in der türkischen Familie und nicht in den 876 Kontroll-Chromosomen zu finden war und zudem anhand der *in silico*-Analyse ein Effekt auf das Signalpeptid prädiziert wurde, war davon auszugehen, dass es sich hierbei um eine pathogene Mutation handelt. Nach der offiziellen Nomenklatur der *Human Genome Variation Society* trägt diese Mutation die Bezeichnung *c.43_60del* bzw. *p.Leu15_Leu20del6*. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde für diese Mutation die Abkürzung Mut_{3L} verwendet.

3.1.5 Identifikation einer genomischen Mutation in *LRP5* (Ex14_16del)

Trotz der Konsanguinität der türkischen Familie war mit Identifikation der heterozygoten 18 bp-Deletion im Signalpeptid von *LRP5* wider Erwarten keine homozygote „Founder“-Mutation gefunden worden, die für die Erkrankung der Betroffenen allein ursächlich ist. Viel mehr lässt diese Heterozygotie darauf schließen, dass wahrscheinlich zwei unabhängige Mutationen, für die die betroffenen Familienmitglieder *compound*-heterozygot sein müssten, für das Fehlbildungssyndrom verantwortlich sind. Allerdings war in keinem der 23 kodierenden Exons von *LRP5* mittels direkter Sequenzierung eine zweite Mutation nachweisbar. Aus diesem Grunde wurde für alle „homozygoten“ SNPs der drei betroffenen Kinder eine Segregationsanalyse anhand aller Familienmitglieder durchgeführt. Dadurch sollten mögliche Mendel-Inkonsistenzen (s.u.) in der Vererbung dieser SNPs und somit eventuell größere genomische Deletionen identifiziert werden. In zwei der homozygot erscheinenden SNPs (Intron 14 bzw. Exon 15) konnten anhand der Segregationsanalysen tatsächlich gezeigt werden, dass die Vererbung der SNPs nicht den Mendel'schen Regeln folgte. Formalgenetisch scheinen die betroffenen Kinder und ein gesundes Geschwister jeweils kein mütterliches Allel geerbt zu haben. Die Mütter waren demnach nicht wie angenommen homozygot, sondern hemizygot für diese SNPs und haben das deletierte Allel jeweils an die drei Betroffenen und ein gesundes Geschwister vererbt (Abb. 3.5).

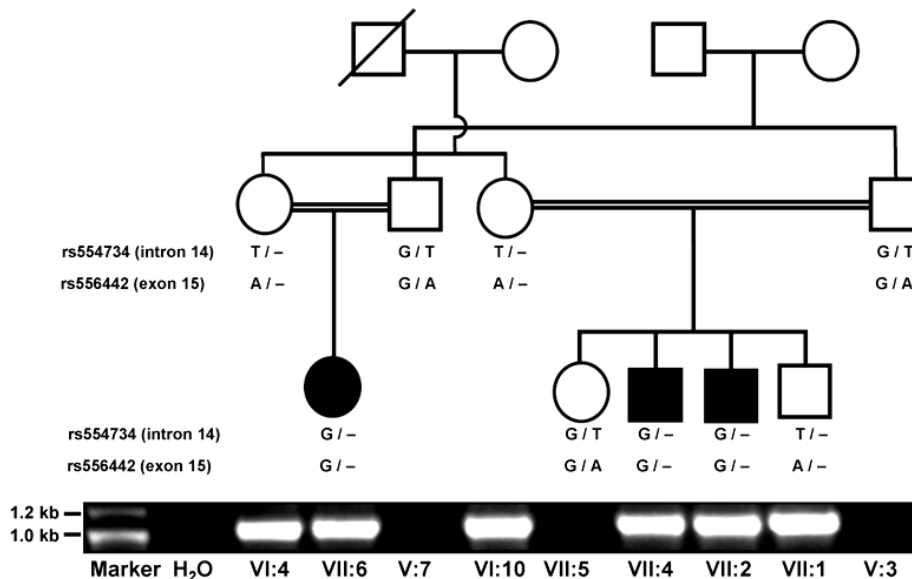


Abb. 3.5: Identifikation der *LRP5* Deletion g.Ex14_16del. Segregationsanalyse zweier SNPs in Intron 14 und Exon 15 von *LRP5* und Amplifikation eines die Deletion überspannenden genomischen Fragmentes (*junction fragment*). Das Vererbungsmuster zeigt, dass diese beiden SNPs Inkonsistenzen nach Mendel aufzeigen. Die bei der Sequenzierung scheinbar homozygoten Genotypen (VI:4, VI:10 und VII:1 sowie VII:2, VII:4 und VII:6) erweisen sich hierbei als hemizygot. Anstatt eines 9,3 kb großen WT-Fragmentes konnte mittels PCR auf genomischer DNA für ein Deletion überspannendes Fragment nur ein 1,1 kb großes Fragment bei den Deletionsträgern amplifiziert werden.

Da in Exon 13 und Exon 18 heterozygote SNPs bei den Betroffenen identifiziert wurden, musste die vermutete Deletion zwischen Intron 13 und Intron 17 liegen. Durch eine *long-range*-PCR-Amplifikation mit verschiedenen Primer-Kombinationen aus Intron 13 und Intron 17 konnte schließlich ein etwa 6 kb großes PCR-Produkt bei einem Betroffenen statt eines ca. 14 kb großen Wildtyp-Allels (*LPR5-ex13-Fb*, *LPR5_17R*) amplifiziert werden. Die Deletion betrug ca. 8 kb. Durch die anschließende Sequenzierung konnte der Bruchpunkt innerhalb eines *AluY*-Elementes, das sich aus Sequenzen eines *AluY-Repeats* in Intron 13 und in Intron 16 zusammensetzt, lokalisiert werden (Abb. 3.6). Durch weitere PCR-basierte Analysen mit Primern, die die Deletion unmittelbar überspannten (*LRP5-IVT13-7-Neu1* und *LRP5-cDNA_17R*), konnte ausschließlich ein PCR-Fragment (*Junction Fragment*) von 1,1 kb bei Deletionsträgern statt des 9,3 kb großen WT-Fragments amplifiziert werden. Auf Grundlage dieser PCR wurden alle Familienmitglieder zusätzlich und unabhängig von den Segregationsanalysen der SNPs auf diese Deletion hin untersucht (Abb.3.5). Zusätzlich wurden 100 türkische und 186 kaukasische, gesunde Kontroll-Individuen analysiert. Bei keinem der 286 Kontroll-Individuen war diese genomische Deletion nachweisbar. In der offiziellen Nomenklatur der *Human Genome Variation Society* trägt diese Mutation die Bezeichnung *g.Ex14_16del*.

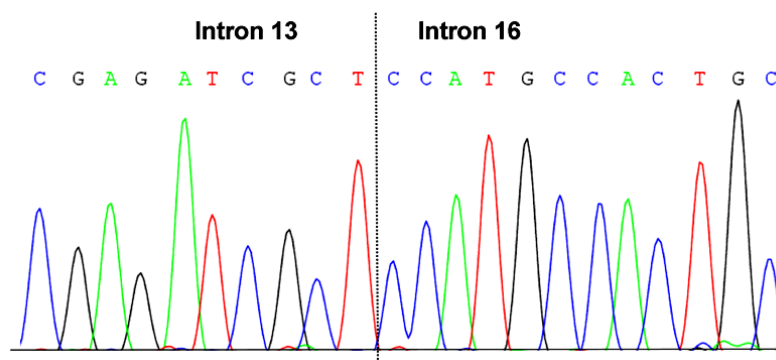


Abb. 3.6: Bruchpunktbestimmung durch direkte Sequenzierung des deletionsüberspannenden genomischen PCR-Produktes des Patienten VII:6. Die Bruchpunkte sind in Intron 13 und Intron 16 lokalisiert.

Diese Deletion war offenbar durch eine Homologen-Fehlpaarung mit anschließendem ungleichen *Crossing-Over* in der Meiose eines „*Founder*“-Individuums entstanden.

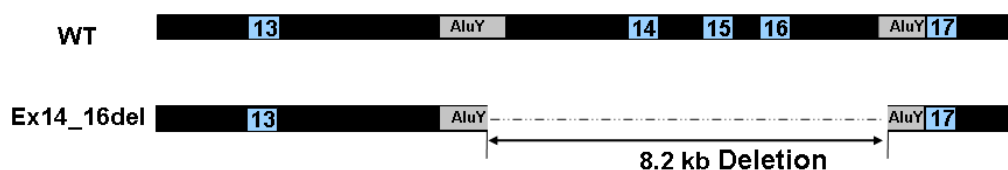


Abb. 3.7: Schematische Darstellung der 8,2 kb großen genomischen Ex14_16-Deletion in *LRP5*, flankiert von *AluY-Repeats* in Intron 13 und Intron 16, in denen sich die Bruchpunkte befinden.

3.1.6 RNA-Analysen der *LRP5*-Ex14_16-Deletion

Um zu überprüfen, welche Auswirkungen die Ex14_16-Deletion auf das mRNA-*Splicing* hat und ob das mutierte RNA-Molekül möglicherweise einem *nonsense-mediated mRNA decay* unterliegt, wurde eine RT-PCR mit RNA aus Blut eines heterozygoten Deletionsträgers und eines gesunden Kontroll-Individuums durchgeführt. Die Primer überspannten die Deletion und lagen in Exon 13 und Exon 21 (Mut-Ex14-16-F3, Mut-Ex14-16-R2-R3). Aus der RNA des Kontroll-Individuums wurde ein RT-PCR-Produkt mit einer Größe von 1,6 kb amplifiziert. Aus der RNA des Betroffenen wurde sowohl ein RT-PCR-Produkt mit einer Größe von 1,6 kb als auch ein zweites, etwa 970 bp großes RT-PCR-Produkt amplifiziert. Die direkte Sequenzierung der Amplimere ergab, dass es sich beim 1,6 kb großen Fragment um die Wildtyp-Sequenz handelte, während das kleinere 970 bp PCR-Produkt eine Deletion der Exons 14 bis 16 aufwies, so dass auf Exon 13 direkt Exon 17 folgte. Auf Proteinebene führt die Deletion zu einem *Frameshift*, wodurch es nach 37 „falschen“ Aminosäuren zu einem präterminalen Stop der Translation kommt (*p.Pro1010GlnfsX38*).

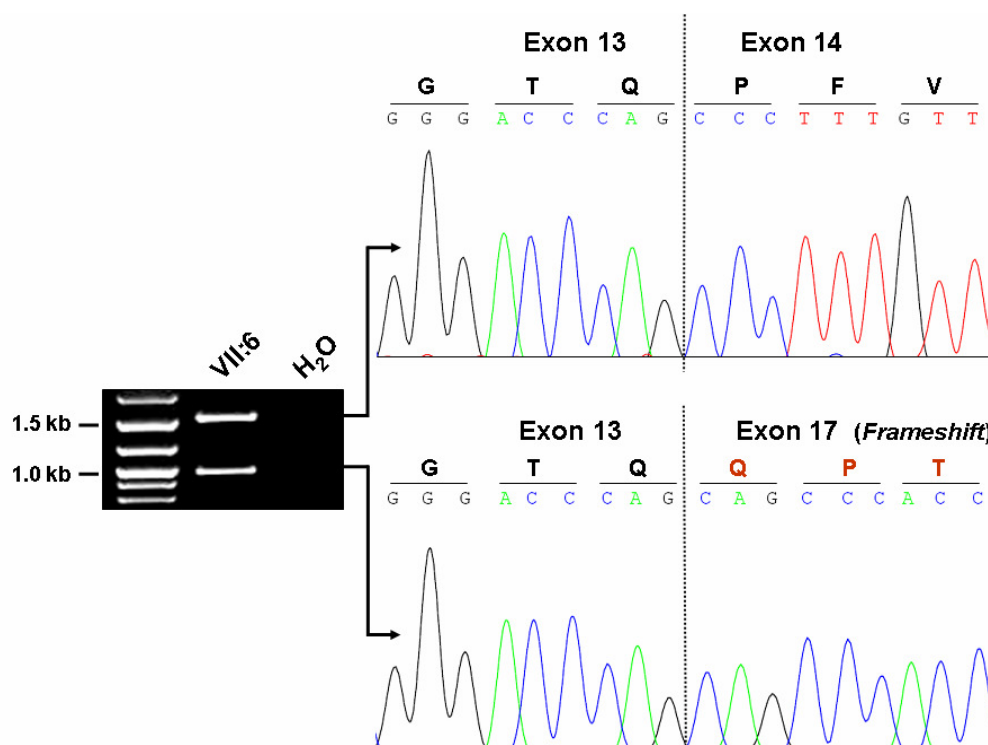


Abb. 3.8: Agarosegel des RT-PCR-Produktes und Elektropherogramm-Ausschnitt aus der direkten cDNA-Sequenzierung des Betroffenen VII:6. Die RT-PCR wurde mit peripherer RNA aus Blut des Patienten mit Primern in den Exons 13 und 21 durchgeführt. Zwei Fragmente, 1,6 kb und 970 bp, konnten amplifiziert werden. Die direkte Sequenzierung dieser Fragmente ergab zum einen die Wildtyp-Sequenz (oberes Sequenz), und zum anderen eine *Out-of-frame*-Deletion von 610 bp, bei der die Exons 14 bis 16 deletiert sind (untere Sequenz).

3.1.7 Familiäre Segregation der Mutationen

Die Segregationsanalyse beider neu identifizierten Mutationen in der gesamten Familie zeigte, dass nur die drei vom Fehlbildungssyndrom betroffenen Familienmitglieder *compound*-heterozygot für die oben beschriebene 18 bp-Deletion in Exon 1 (Mut_{3L}) und für die durch Mendel-Inkonsistenzen nachgewiesene 8,2 kb große intragenische Deletion (Ex14_16del) waren (Abb. 3.9). Die Positionen der beiden Mutationen sind in Abbildung 3.10 wiedergegeben.

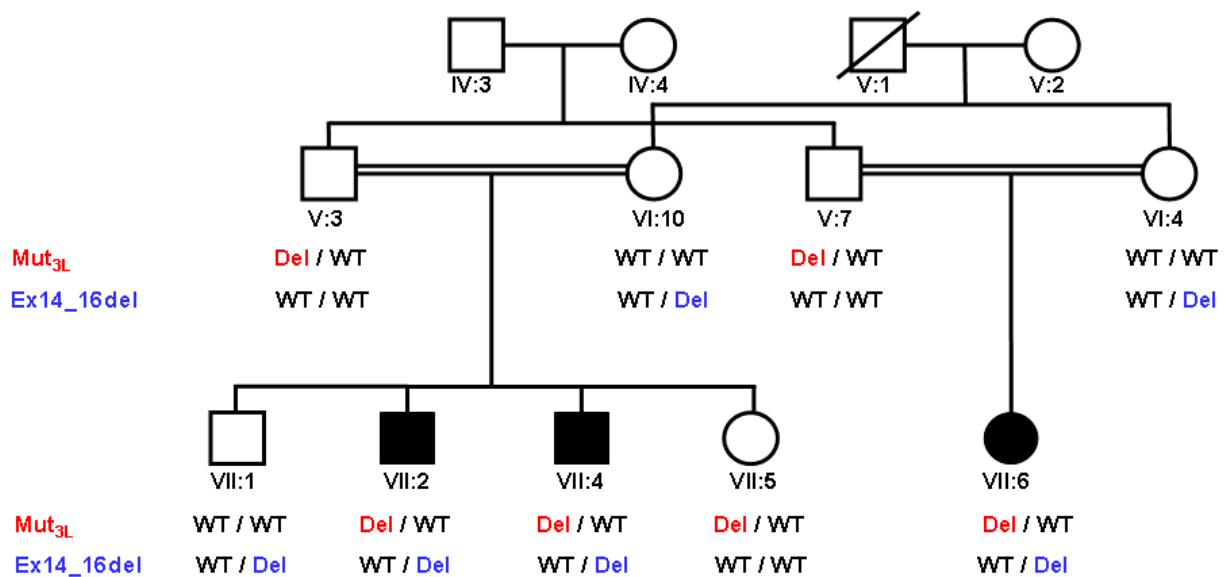


Abb. 3.9: Identifikation und Segregation der *LRP5*-Mutationen. Stammbaum der türkischen Familie und Genotypen der jeweiligen Individuen mit den identifizierten Mutationen Mut_{3L} und Ex14_16del bzw. mit dem Wildtyp in *LRP5*. Mut_{3L} = Deletion von 18 Basenpaaren im Signalpeptid; Ex14_16del = genomische 8,2 kb-Deletion, bei der die Exons 14 bis 16 deletiert sind; WT_{9L} = Wildtyp mit 9 Leucinen (CTG)₉ im Signalpeptid. Nur die drei betroffenen Familienmitglieder sind *compound*-heterozygot für die 6-Leucin-Deletion im CTG-Repeat des Signalpeptids (Mut_{3L} , rot markiert) und die 8,2-kb-Deletion einschließlich der Exons 14 bis 16 (Ex14_16del, blau markiert).

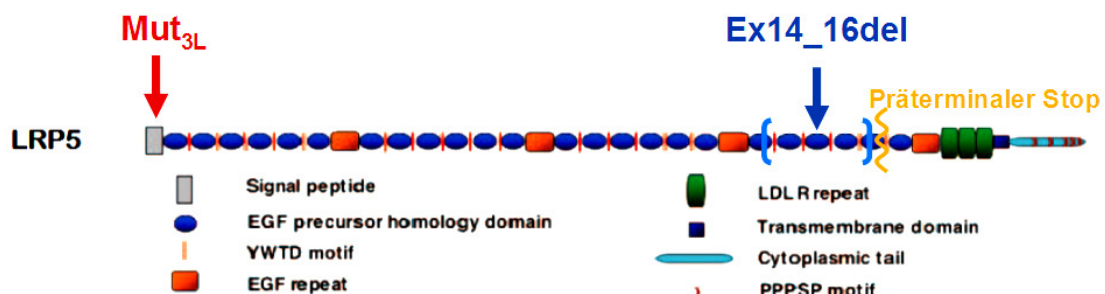


Abb. 3.10: Schematische Darstellung von *LRP5* mit seinen Domänen und der Lokalisation der neu identifizierten Mutationen Mut_{3L} (c.43_60del) und Ex14_16del [Ai *et al.*, 2005; adaptiert]. Letztere führt aufgrund eines *Frameshifts* zu einem vorzeitigen Stop der Translation nach 38 „falschen“ Aminosäuren.

3.1.8 Generierung von verschiedenen *LRP5*-Mutations-Expressionsvektoren

Zur Aufklärung des molekularen bzw. zellulären Pathomechanismus der beiden identifizierten *LRP5*-Mutationen wurden diese per PCR-Mutagenese bzw. RT-PCR anhand Patienten-RNA und anschließendem Restriktionsverdau und Ligation in zwei Expressionskonstrukte von *LRP5* (Wildtyp) eingeführt. Die *LRP5*-T390K-Mutante wurde bereits in der Literatur als pathogen beschrieben [Ai *et al.*, 2005] und diente im Rahmen der durchgeführten Experimente als Kontrolle. Für weitere Funktionsanalysen wurden außerdem noch die ebenfalls in Tabelle 3.3 aufgeführten Konstrukte der identifizierten Allel-Varianten des CTG-*Repeats* [(CTG)₆₋₁₁] sowie Konstrukte einer in der Literatur beschriebenen, aber nicht weiter analysierten *de-novo* Punktmutation A29T im Signalpeptid von LRP5 bei einer 16 jährigen Patientin mit juveniler Osteoporose [Hartikka *et al.*, 2005] generiert.

Tab. 3.3: Übersichtstabelle der generierten und verwendeten *LRP5*-Konstrukte mit Angabe ihrer im Rahmen der vorliegenden Arbeit verwendeten Bezeichnung, der Beschreibung der Abweichung vom Wildtyp, ihrer exakten Nomenklatur der *Human Genome Variation Society* und der entsprechenden Varianten als *full-length* oder *truncated LRP5ΔC* (ohne Transmembrandomäne und cytoplasmatische Domäne) sowie des Tags für die Immunodetektion. Alle dieser rekombinanten Konstrukte basieren auf dem Vektor pcDNA3.1 (Invitrogen).

BEZEICHNUNG	BESCHREIBUNG	EXAKTE NOMENKLATUR	EXPRESSIONS-VEKTOREN		TAG
WT _{9L}	WILDTYP (CTG) ₉		FULL-LENGTH	TRUNCATED	MYC
MUT _{3L}	18 BP-DEL. IM CTG-REPEAT DES SIGNALPEPTIDS → 3 STATT 9 LEU (CTG) ₃	C.43_60DEL P.LEU15_LEU20 DEL	FULL-LENGTH	TRUNCATED	MYC
EX14_16DEL	GENOM. DEL. VON 8,2 KB ZW. INTRON 13 U. 16 → DEL. DER EXONS 14 - 16; FRAMESHIFT → PRÄTERMINALER TRANSLATION-STOP IN EXON 17	P.PRO1010GLNFSX38	---	TRUNCATED	---
A29T	[HARTIKKA <i>ET AL.</i> , 2005]; DE-NOVO MISSENSE-MUTATION IM SIGNALPEPTID	P.A29T	FULL-LENGTH	TRUNCATED	MYC
6 LEU	(CTG) ₆	C.46_60DEL P.LEU18_LEU20DEL	FULL-LENGTH	TRUNCATED	MYC
7 LEU	(CTG) ₇	C.49_60DEL P.LEU19_LEU20DEL	FULL-LENGTH	TRUNCATED	MYC
8 LEU	(CTG) ₈	C.52_60DEL P.LEU20DEL	FULL-LENGTH	TRUNCATED	MYC
10 LEU	(CTG) ₁₀	C.60INS3 P.LEU20DUP	FULL-LENGTH	TRUNCATED	MYC
11 LEU	(CTG) ₁₁	C.60INS6 P.LEU19_LEU20DUP	FULL-LENGTH	TRUNCATED	MYC
T390K	[AI <i>ET AL.</i> , 2005]; MISSENSE-MUTATION, DIE DAS INTRAZELLULÄRE TRAFFICKING VON <i>LRP5</i> BEHINDERT	P.T390K	FULL-LENGTH	TRUNCATED	MYC
P.E528_V529INS21	AUSTAUCH DES 4. NUKLEOTIDS NACH EXON 7 → SPLICE DONOR SITE-VERSCHIEBUNG UM 63 BP → IN-FRAME-INSERTION VON 21 AMINOSÄUREN DIREKT NACH EXON 7	C.1584+4A>T P.E528_V529INS21	FULL-LENGTH	TRUNCATED	MYC

Eine weitere Mutation, die im Rahmen dieser Arbeit bei einer zweiten Indexfamilie mit klassischem OPPG-Syndrom identifiziert worden war (Kapitel 3.3.1), wurde ebenfalls subkloniert.

3.1.9 Luciferase Reporter Assay – Signaltransduktion der mutierten LRP5-Rezeptoren

Zur Analyse eines möglichen Funktionsverlustes der beiden mutierten LRP5-Rezeptoren in Form einer gestörten Signaltransduktion der WNT/NDP-Signalkaskade wurde ein *Luciferase Reporter Assay* (Kapitel 2.29) verwendet. Dazu wurden Hek293T-Zellen mit *LRP5*-WT_{9L}⁻, *LRP5*-Mut_{3L}⁻, *LRP5*-Ex14_16del⁻ oder mit Kontroll-Vektoren (Leervektor pcDNA3.1 bzw. *LRP5*-T390K) transfiziert. Jeweils co-transfiziert wurden Expressionsvektoren, die den *LRP5*-Co-Rezeptor, *Frizzled-4* (*FZD4*), den dazugehörigen Liganden *Norrin* (*NDP*) sowie das Chaperon *Mesoderm development candidate 2* (*MESDC2*), das für die korrekte Faltung von *LRP5* notwendig ist, exprimierten. Des Weiteren enthielten die Transfektionsansätze jeweils Expressionskonstrukte für die *Firefly*- und die *Renilla*-Luciferase. Letztere diente als interne Transfektionskontrolle. Die Signaltransduktionsfähigkeit des jeweiligen *LRP5*-Rezeptors (WT_{9L} bzw. Mutante) wurde in Form der Luciferase-Aktivität mittels des *Dual-Luciferase*[®] *Reporter Assay System Kits* (Promega) luminometrisch bestimmt. Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten wurden in Form des in Abbildung 3.11 dargestellten Diagramms wiedergegeben. Jedes *LRP5*- bzw. Kontroll-Konstrukt wurde pro Experiment in drei Ansätzen transfiziert.

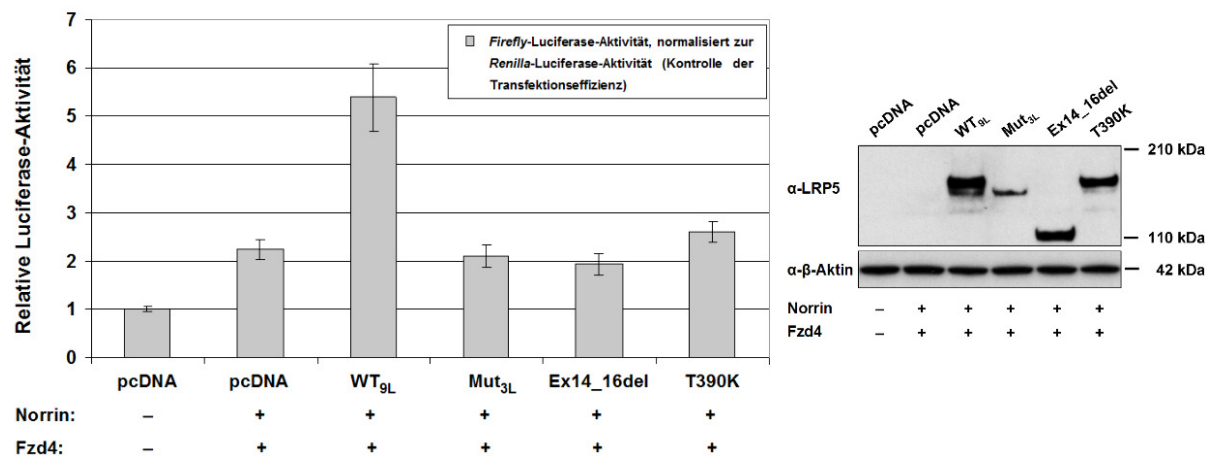


Abb. 3.11: Graphische Darstellung der relativen Luciferase-Aktivität (Mittelwerte und Standardabweichung) des Leervektors (pcDNA), des Wildtyps LRP5 (WT_{9L}) und der Mutanten Mut_{3L}, Ex14_16del sowie T390K, analysiert anhand des WNT/NDP-Signalweg *Luciferase Reporter Assays* und repräsentativer Westernblot der Zell-Lysate. Die gemessenen Werte der *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten wurden jeweils mit der entsprechenden *Renilla*-Luciferase-Aktivität zur Transfektionskontrolle normalisiert. Das Experiment wurde in fünf unabhängigen Versuchsreihen jeweils in dreifacher Ausführung durchgeführt. Die Aktivitäten der Mutanten Mut_{3L} und Ex14_16del zeigten keinen Unterschied zu der des Leervektors, wohingegen WT_{9L} eine deutlich erhöhte Aktivität aufwies. Die Mutante T390K diente als Positiv-Kontrolle für eine gestörte Signaltransduktion [Ai *et al.*, 2005]. Der repräsentative Westernblot der Zell-Lysate der transient transfizierten HEK293T-Zellen, welche im obigen *Dual-Luciferase Reporter Assay* eingesetzt wurden, bestätigte, dass sowohl WT_{9L} als auch die drei mutierten LRP5-Rezeptoren exprimiert wurden. Das Molekulargewicht von Mut_{3L} war etwas geringer und das von Ex14_16del deutlich geringer als das des Wildtyps und T390K.

Beide mutierten LRP5-Rezeptoren (Mut_{3L} bzw. Ex14_16del) zeigten wie die T390K-Mutante (zur Kontrolle einer gestörten Signaltransduktion) keine gegenüber dem Leervektor erhöhte Luciferase-Aktivität auf und waren folglich nicht in der Lage, Signale über diesen *Pathway* zu transduzieren. Die Westernblot-Analysen der transfizierten Zell-Lysate zeigten jedoch, dass jeweils ein stabiles Protein exprimiert wurde (Abb.3.11). Erwartungsgemäß wies das LRP5-Ex14_16del-Protein mit einer großen *out-of-frame* Deletion der Exons 14 bis 16 und einem daraus resultierenden präterminalen Stop im Westernblot ein deutlich geringeres Molekulargewicht auf als das LRP5-WT_{9L}-Protein. Überraschenderweise hatte auch das LRP5-Mut_{3L}-Protein ein ca. 10 kDa geringeres Molekulargewicht als das Wildtyp-Protein.

3.1.10 N-Glykosylierung – Analyse der posttranslationalen Modifikation von LRP5

Da das LRP5-Mut_{3L}-Protein lediglich sechs Aminosäuren kürzer als das LRP5-WT_{9L}-Protein war, durfte dies im hier verwendeten 3-8%igen Tris-Acetat-SDS-Gel keinen sichtbaren Unterschied von 10 kDa im Molekulargewicht machen. Dies führte zu der Annahme, dass diese Mutante nicht adäquat posttranslational modifiziert wurde. Posttranslationale Modifikationen von Transmembranproteinen spielen sich in der Regel im Endoplasmatischen Retikulum (ER) ab. In Anbetracht der 18 bp-Deletion im Signalpeptid und der bioinformatischen Prädiktion eines gestörten Signalpeptids, wurde das mutierte Protein vermutlich vom sogenannten *Signal Peptide Recognition Particle* (SRP) nicht erkannt. Es konnte folglich womöglich nicht ins ER gelangen, um dort cotranslational in die Membran eingebaut und posttranslational modifiziert zu werden. Eine der häufigsten posttranslationalen Modifikationen von Transmembranproteinen ist die N-Glykosylierung, bei der Zuckerreste an ein Stickstoffmolekül der Polypeptidkette angehängt werden. Aus diesem Grunde wurde ein N-Glykosidase-Verdau von Zell-Lysaten, die zuvor mit Expressionsvektoren für *LRP5-WT_{9L}* bzw. Mut_{3L} und *MESDC2* (Kapitel 2.29) transient co-transfiziert wurden, durchgeführt und diese anschließend über einen Westernimmunoblot analysiert. Der mit N-Glykosidase behandelte Wildtyp migriert im Gegensatz zum unbehandelten auf der gleichen Höhe wie die Mutante (Abb. 3.12). Diese zeigte keinen Unterschied im Molekulargewicht vor und nach dem N-Glykosidase-Verdau. Die Mutante war offensichtlich nicht N-glykosyliert.

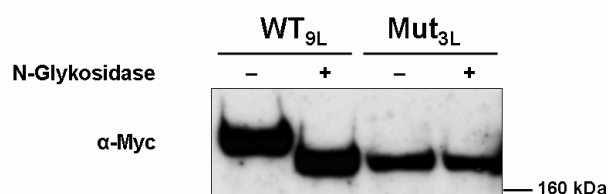


Abb. 3.12: Westernblot nach N-Glykosidase-Verdau von Hek293T-Zellen, die mit Expressionsvektoren für *LRP5-WT_{9L}* bzw. Mut_{3L} transient transfiziert und die Lysate mit N-Glykosidase behandelt wurden. Die unterschiedlichen Molekulargewichte von *LRP5-WT_{9L}* und der Signalpeptid-Mutation Mut_{3L} rührten offensichtlich von der N-Glykosylierung des Wildtyp-Proteins her. Diese Form der posttranslationalen Modifikation erfolgt im ER.

3.1.11 Subzelluläre Lokalisation des LRP5-Wildtyp- und des mutierten LRP5-Proteins

Nach der posttranslationalen Modifikation im ER werden Transmembranproteine unter anderem schließlich durch abgeschnürte Vesikel zur Plasmamembran transportiert. Unter der Annahme, dass die Mutante mit nur 3 Leucinen aufgrund des gestörten Signalpeptids nicht ins ER gelangen konnte, um dort posttranslational modifiziert zu werden, wurde sie vermutlich auch nicht von dort weiter in die Plasmamembran transportiert. Aus diesem Grunde wurde zur subzellulären Lokalisierung des mutierten Proteins eine subzelluläre Fraktionierung von cytosolischen und membranständigen Proteinen durchgeführt. Hek293T-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren *LRP5*-Wildtyp bzw. Mut_{3L} und dem Expressionsvektor des Chaperons *MESDC2* transient co-transfiziert. Durch Homogenisierung mittels eines milden Sucrose-Puffers und einer anschließenden Ultrazentrifugation wurden membranständige von cytosolischen Proteinen getrennt und über einen Westernblot analysiert (Abb. 3.13). Zur Kontrolle einer erfolgreichen Trennung dienten das Membran-Markerprotein Calnexin und das cytosolische Markerprotein β -Aktin. Während das Wildtyp-LRP5-Protein mit 9 Leucinen im Signalpeptid erwartungsgemäß nahezu ausschließlich in der Membranfraktion nachweisbar war, war die Signalpeptid-Mutante Mut_{3L} mit nur 3 Leucinen ausschließlich im Cytosol zu lokalisieren.

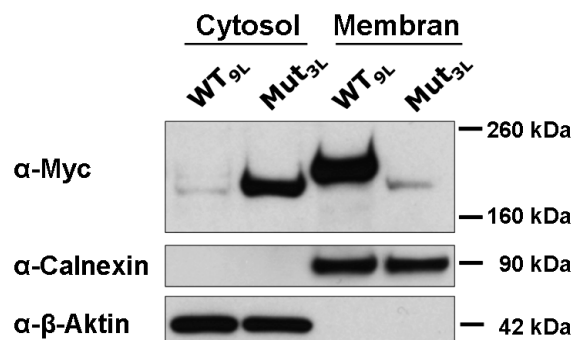


Abb. 3.13: Westernblot nach Ultrazentrifugation transient transfizierter Hek293T-Zellen mit LRP5-Wildtyp bzw. Mut_{3L}. Mittels der Ultrazentrifugation wurden membranständige von cytosolischen Proteinen getrennt. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Trennung dienten Calnexin (Membran-Markerprotein) und β -Aktin (cytosolisches Markerprotein). Die Signalpeptid-Mutante Mut_{3L} mit nur 3 Leucinen war ausschließlich im Cytosol nachweisbar, während das Wildtyp-LRP5-Protein mit 9 Leucinen im Signalpeptid nahezu ausschließlich in der Membranfraktion zu finden war.

3.1.12 Secretion Assay – Intrazellulärer Transport der mutierten LRP5-Rezeptoren

Der *Secretion Assay* war ein weiterer experimenteller Ansatz, der im Rahmen dieser Arbeit durchgeführt wurde, um das intrazelluläre *Trafficking* der mutierten Proteine zu untersuchen. Dazu wurden Expressionskonstrukte vom *LRP5*-WT_{9L} sowie den Mutationen Mut_{3L}, Ex14_16del und T390K, denen die Transmembran- und cytoplasmatische Domäne (*LRP5* Δ C) fehlt, mit dem Expressionsvektor für das Chaperon *MESDC2* in Hek293T-Zellen transient co-transfiziert. Nach einer Inkubation von 24 Stunden im serumfreien Kulturmedium

wurden sowohl das Kulturmedium als auch die Zell-Lysate anhand eines Westernimmunoblots analysiert. Bei korrektem intrazellulären Transport des Proteins sollte dieses aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne unter anderem in den Überstand (*Conditioned Medium*) sezerniert werden. Die anschließende Westernblot-Analyse zeigte, dass ausschließlich der WT_{9L} ins *Conditioned Medium* sezerniert wurde, während alle drei Mutanten (inklusive T390K; [Ai *et al.*, 2005]) im Lysat zurückblieben (Abb. 3.14).

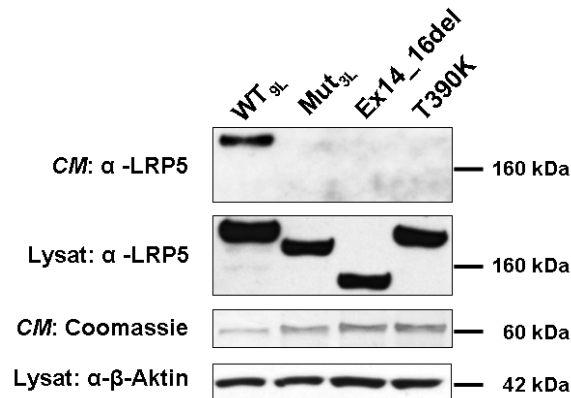


Abb. 3.14: Repräsentativer Westernblot des Überstandes (*Conditioned Medium* = CM) und der Zell-Lysate (LY) von HEK293T-Zellen, die mit *LRP5*-WT_{9L}-, Ex14_16del-, Mut_{3L}- und T390K-Expressionskonstrukten, denen die Transmembran- und cytoplasmatische Domäne fehlt, transient transfiziert wurden. Bei korrektem intrazellulärem Transport sollten diese ins *Conditioned Medium* sezerniert werden. Nur der WT_{9L} ist im *Conditioned Medium* detektierbar. Als Ladekontrolle dient β-Aktin für die Lysate bzw. Coomassie-Färbung eines 60-kDa Proteins für das *Conditioned Medium*.

Anhand dieser Ergebnisse lässt sich daraus schließen, dass es sich bei den beiden in dieser türkischen Familie neu identifizierten, neuartigen *LRP5*-Mutationen um pathogene Veränderungen handelt, da sie innerhalb der Familie co-segregieren und ausschließlich die drei betroffenen Familienmitglieder *compound*-heterozygot für diese sind. Des Weiteren waren diese bislang noch nicht in der Literatur beschriebenen Mutationen nicht in Kontroll-Individuen nachweisbar. Schließlich bestätigten die durchgeführten *in vitro*-Assays, dass diese Mutationen einen Funktionsverlust bedingen (Null-Mutationen).

3.2 Poly-Leucin-*Stretch* im Signalpeptid von *LRP5*

3.2.1 *Luciferase Reporter Assay* – *LRP5*-Signaltransduktion

Der Poly-Leucin-*Stretch* im Signalpeptid von *LRP5* ist – wie bereits in der Literatur beschrieben – polymorph. Auch im Rahmen dieser Arbeit wurde dies bestätigt (Kaptiel 3.1.4; Tab. 3.2), indem verschiedene Signalpeptid-Varianten mit 6 bis 11 Leucinen unter 438 Kontroll-Individuen identifiziert wurden. Ein möglicher Effekt dieser Varianten und somit dieses Polymorphismus auf die Funktionalität des Rezeptors wurde allerdings bislang nicht untersucht. Aus diesem Grunde wurden die identifizierten *LRP5*-Signalpeptid-Varianten (6 Leu bis 11 Leu) sowie eine in der Literatur beschriebene, aber ebenfalls nicht weiter untersuchte *Missense*-Mutation (A29T) im Signalpeptid zur funktionellen Analyse subkloniert (Kapitel 3.18; Tab. 3.3).

Mit Hilfe des *WNT/NDP-Signaling Luciferase Reporter Assays* (Kapitel 2.29) sollte *in vitro* ein möglicherweise funktioneller Effekt dieser verschiedenen Signalpeptid-Varianten geklärt werden. Die Durchführung erfolgte wie in Kapitel 2.29 und 3.1.9 beschrieben. Hek293T-Zellen wurden jeweils mit den Expressionsvektoren, die die verschiedenen *LRP5*-Signalpeptid-Varianten bzw. die A29T-Mutante enthielten transfiziert. Jeweils co-transfiziert wurden die Expressionskonstrukte für *Norrin (NDP)*, *Frizzled-4 (FZD4)*, *Mesoderm development candidate 2 (MESDC2)* sowie *Firefly-* und *Renilla-Luciferase*. Die Signaltransduktionsfähigkeit des jeweiligen *LRP5*-Rezeptors wurde in Form der Luciferase-Aktivität mittels des *Dual-Luciferase® Reporter Assay System Kits* (Promega) luminometrisch bestimmt. Die berechneten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden schließlich in prozentualer Relation zum Wildtyp-Allel mit 9 Leucinen (100%) gesetzt und in Form eines Diagramms wiedergegeben. Das in Abbildung 3.15 (links) dargestellte Diagramm umfasst insgesamt 12 unabhängige Experimente, in denen jedes *LRP5*- bzw. Kontroll-Konstrukt in drei Ansätzen transfiziert wurde.

Die Luciferase-Aktivität nach Transfektion von *LRP5* mit dem 9 Leu-Allel war verglichen mit den anderen getesteten Allelen am stärksten. *LRP5*-Rezeptoren der Allele mit einer deutlichen Verkürzung (6 Leu) bzw. Verlängerung (10 Leu und 11 Leu) des Leucin-*Stretches* sowie der A29T-Mutante führten zu einer signifikanten Reduktion der Luciferase-Aktivität und wiesen damit eine signifikante verminderte Signaltransduktion auf. Die in einem klassischen *Student's T-Test* errechneten P-Werte lagen für diese Varianten unter 0.001 [...]. Auch die anderen Varianten zeigten eine relativ verminderte Signaltransduktion auf. Erwartungsgemäß war die Signaltransduktion der Mutante mit nur 3 Leucinen vollständig aufgehoben, d. h. die Luciferase-Aktivität entsprach in diesen Ansätzen den Werten, die bei Transfektion des pcDNA3.1-Leervektors zusammen mit *NDP*- und *FZD4*-Expressionsvektoren ermittelt wurden (Kapitel 3.1.9).

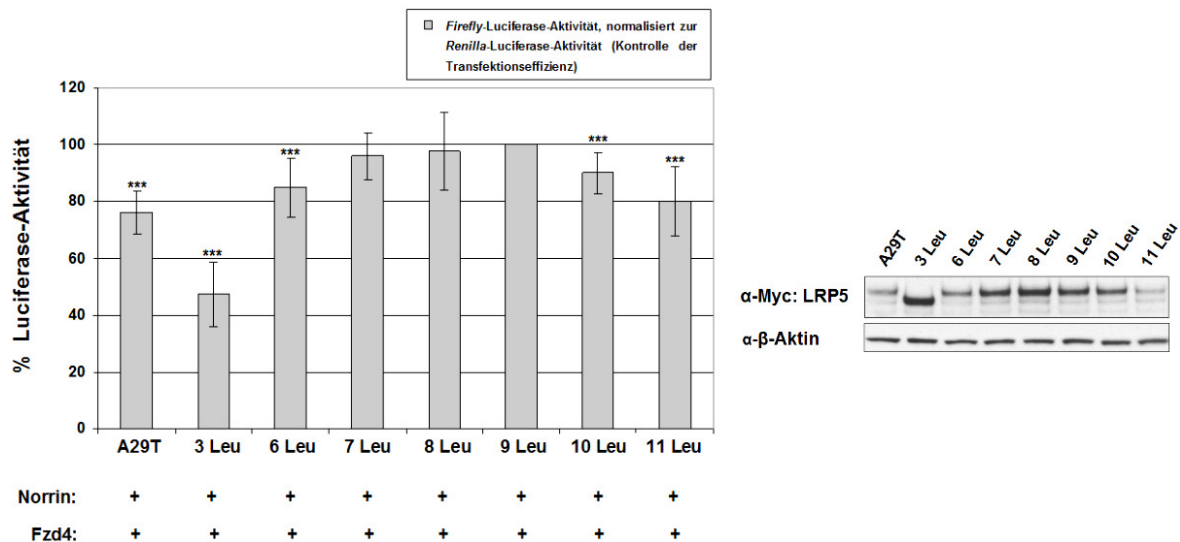


Abb. 3.15: *WNT/NDP-Signaling Luciferase Reporter Assay* für identifizierte LRP5-Signalpeptid-Varianten. Diagramm der normalisierten Luciferase-Aktivität der LRP5-Varianten mit 6 bis 11 Leucinen [(CTG)₆₋₁₁] im Signalpeptid bzw. der Mutanten Mut_{3L} (3 Leu) und A29T [Hartikka *et al.*, 2005] und repräsentativer Westernblot Zell-Lysaten aus einem von 12 *WNT/NDP-Signaling Luciferase Reporter Assays*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus insgesamt 12 unabhängigen Experimenten, jeweils in drei Ansätzen transfiziert und gemessen. Mut_{3L} zeigt eine schwerste Beeinträchtigung der Signaltransduktion, wohingegen A29T, 6 Leu, 10 Leu und 11 Leu jeweils eine statistisch signifikante verminderte Signaltransduktion gegenüber dem Wildtyp zeigten. Die P-Werte lagen <0.001 [...] (*Student's T-Test*). Aus dem repräsentativen Westernblot ist erkennbar, dass die LRP5-Signalpeptid-Varianten deutlich unterschiedliche Expressionsstärken aufzeigen. Mut_{3L} weist ein im Vergleich zum LRP5-Wildtyp und zu den anderen Signalpeptid-Varianten mit 6 bis 11 Leucinen geringeres Molekulargewicht auf.

Alle 12 unabhängigen Westernblot-Analysen der Zell-Lysate, die in insgesamt 12 *Luciferase Reporter Assay* Experimenten eingesetzt wurden, ergaben, dass die verschiedenen LRP5-Varianten unterschiedlich stark exprimiert waren. Ein repräsentativer Westernblot (aus 12 Experimenten) ist in Abbildung 3.15 (rechts) dargestellt. LRP5 mit der Signalpeptid-Mutation Mut_{3L} (3 Leu) wies ein geringeres Molekulargewicht auf (Kapitel 3.1.9), war aber stark exprimiert. Die Expressionsstärke der restlichen LRP5-Proteine (6 Leu bis 11 Leu) korrelierte mit ihrer jeweiligen Luciferase-Aktivität. Um dies zu bestätigen, wurden die Westernblot-Signalintensitäten der 12 durchgeführten Westernblot-Analysen digital quantifiziert. Dies erfolgte mit Hilfe des *Quantity Ones Basic* Systems. Die Signalintensitäten jeder einzelnen LRP5-Proteinbande wurden digital gemessen und anschließend mit der dazugehörigen gemessenen Aktin-Proteinbande normalisiert. Mittelwerte und Standardabweichungen aus den 12 unabhängigen Westernblot-Experimenten wurden berechnet und in einem Diagramm dargestellt (Abb. 3.16). LRP5 mit 9 Leucinen im Signalpeptid wurde auf 100% und die anderen Varianten dazu in Relation gesetzt.

Die errechneten Intensitäten bestätigten, dass die Expressionsstärke von LRP5 mit den Signalpeptid-Varianten 6 Leu bis 11 Leu sowie A29T mit ihrer ermittelten Luciferase-Aktivität korrelierten.

Insbesondere die am stärksten vom Wildtyp abweichenden Varianten mit 6 und 11 Leucinen sowie die Punktmutante wiesen eine signifikant geringere Expressionsstärke auf. Die mittels des *Student's T-Test* errechneten P-Werte lagen auch hier unter 0.0001 [***].

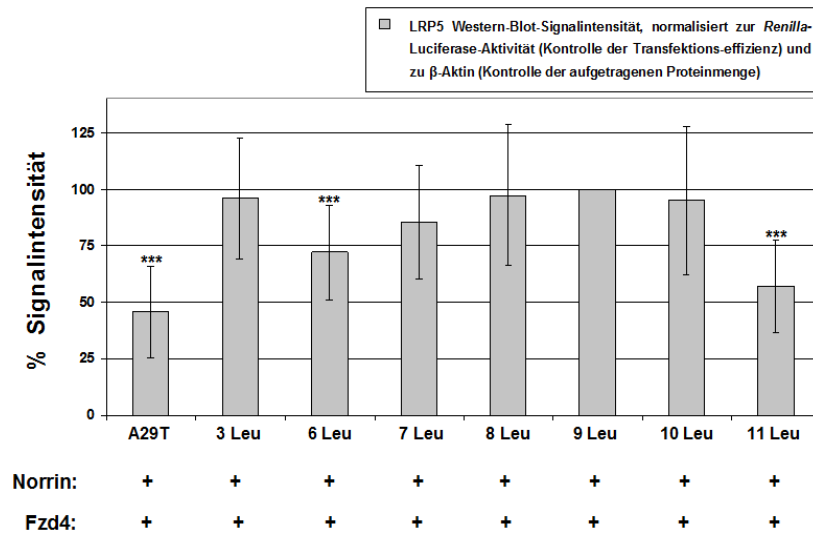


Abb. 3.16: Quantifizierung der Westernblot-Signalintensitäten der LRP5-Signalpeptid-Varianten aus Zell-Lysaten der *Luciferase Reporter Assay*-Experimente. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus insgesamt 12 Messungen. Die Expressionsstärke der verschiedenen LRP5-Varianten (6 Leu bis 11 Leu sowie A29T) korreliert jeweils mit ihrer in Abbildung 3.15 dargestellten Luciferase-Aktivität.

3.2.2 Subzelluläre Lokalisation der LRP5-Signalpeptid-Varianten

Die Ergebnisse des *Luciferase Reporter Assays* und der Westernblot-Analysen führten zu der Annahme, dass die Signalpeptide der LRP5-Varianten 6 Leu und 11 Leu möglicherweise (wie Mut_{3L}) nicht effizient erkannt wurden und diese Proteine deshalb teilweise im Cytoplasma zurückblieben. Eine subzelluläre Lokalisation sollte Aufschluss über den intrazellulären Transport dieser Varianten geben. Expressionsvektoren von *LRP5-WT_{9L}* (9 Leu), 3 Leu sowie 6 Leu und 11 Leu wurden in Hek293T-Zellen transient transfiziert. Die Zell-Lysate wurden mittels eines Sucrose-Puffers homogenisiert und anschließend durch Ultrazentrifugation in cytosolische und membranständige Proteine fraktioniert. Die Fraktionen der verschiedenen LRP5-Proteine wurden in einem Westernimmunoblot analysiert. Ein repräsentativer Westernblot von insgesamt vier unabhängigen Experimenten ist in Abbildung 3.17 dargestellt. Während *LRP5-WT_{9L}* erwartungsgemäß nahezu ausschließlich in der Membranfraktion vorlag und 3 Leu im Cytosol zurückblieb (Kapitel 3.1.11), waren 6 Leu und 11 Leu sowohl in der Membranfraktion als auch im Cytosol nachweisbar. Da zur Kontrolle einer erfolgreichen Trennung das Membran-Markerprotein Calnexin und das cytosolische Markerprotein β -Aktin eingesetzt wurden, konnte eine unvollständige Fraktionierung ausgeschlossen werden.

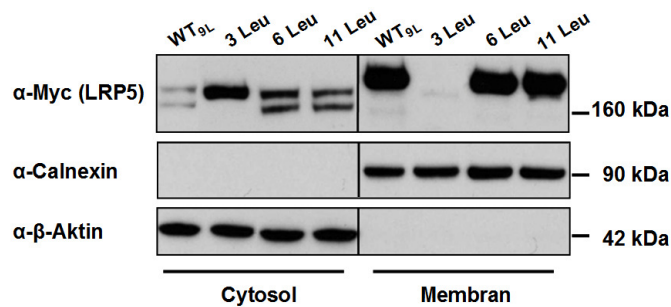


Abb. 3.17: Repräsentativer Westernblot nach Ultrazentrifugation transient transfizierter Hek293T-Zellen mit LRP5-WT_{9L}, Mut_{3L} (3 Leu), 6 Leu bzw. 11 Leu. Mittels der Ultrazentrifugation wurden membranständige von cytosolischen Proteinen getrennt. Zur Kontrolle einer erfolgreichen Trennung dienten Calnexin (Membran-Markerprotein) und β-Aktin (cytosolisches Markerprotein). Das LRP5-Protein mit 9 Leucinen war fast ausschließlich in der Membranfraktion und die Signalpeptid-Mutante 3 Leu ausschließlich im Cytosol nachweisbar. 6 Leu und 11 Leu konnten sowohl in der Membranfraktion als auch im Cytosol detektiert werden. Mut_{3L} fungierte hierbei als Kontrolle (Kapitel 3.1.11).

Eine dreifache Quantifizierung der Westernblot-Signalintensitäten bestätigte dieses Ergebnis. Die Mittelwerte und Standardabweichung aller vier durchgeführten subzellulären Fraktionierungs-Experimente sind in den Diagrammen in Abbildung 3.18 dargestellt.

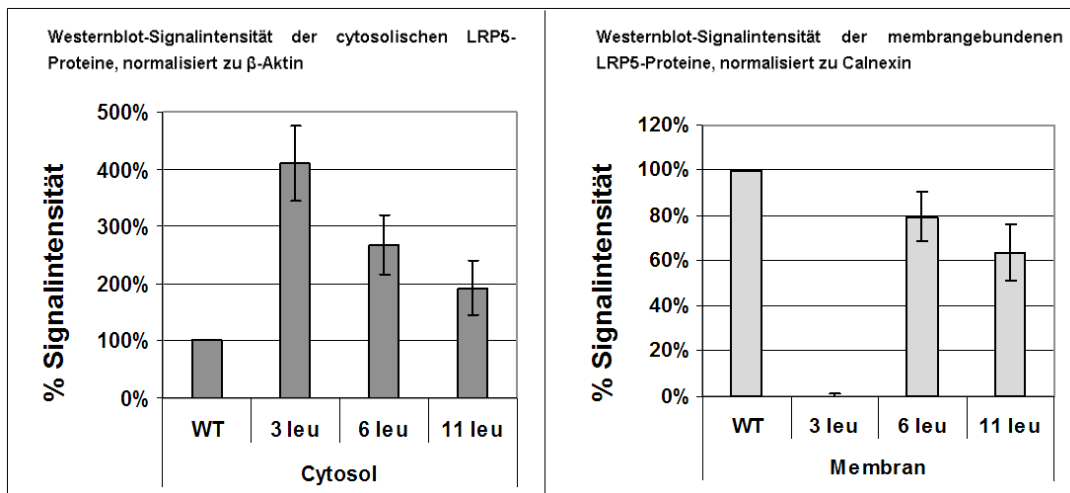


Abb. 3.18: Quantifizierung der Westernblot-Signalintensitäten der cytosolischen (links) und membrangebundenen (rechts) LRP5-Proteine der Signalpeptid-Varianten WT_{9L}, 3 Leu (Mut_{3L}), 6 Leu und 11 Leu nach Ultrazentrifugation. Die Expressionsstärke der vier untersuchten LRP5-Varianten in der Membranfraktion korreliert jeweils mit ihrer in den Abbildungen 3.15 und 3.16 dargestellten Luciferase-Aktivität. Ein Teil der Signalpeptid-Varianten 6 Leu und 11 Leu bleibt ebenfalls im Cytosol.

Die LRP5-Signalpeptid-Varianten 6 Leu und 11 Leu zeigten eine doppelt so starke Signalintensität als das Wildtyp-Protein im Cytosol auf, während sie etwas geringere Signalintensitäten als der Wildtyp-Rezeptor in der Membranfraktion aufzeigten. Die Mutante mit nur 3 Leucinen diente hierbei als Kontrolle der Retention des Rezeptors im Cytosol (Kapitel 3.1.11).

3.2.3 Genomweite Suche nach Poly-Leucin-Signalpeptiden

Die Tatsache, dass in der Allgemein-Bevölkerung vorkommenden Varianten des Poly-Leucin-*Stretches* im LRP5-Signalpeptid offensichtlich einen Effekt auf dessen effektive Funktionsstärke ausüben, ließ die Frage aufkommen, ob derartige Signalpeptid-Längenpolymorphismen auch in anderen Proteinen vorkommen und somit ein bislang nicht untersuchter Grund für funktionelle Variabilität darstellen könnten. Bislang fanden sich in der Literatur allerdings keine Angaben zu der Häufigkeit von Poly-Leucin-*Stretches*. Deshalb wurden in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Freudenberg vom *Center for Genomics and Human Genetics* des *Feinstein Institute for Medical Research (North Shore–Long Island Jewish University Hospital, Manhassat, New York, USA)* diesbezüglich bioinformatische Analysen durchgeführt. Unter den insgesamt 4.145 in der *Ensembl* Datenbank (www.ensembl.org) enthaltenen Proteinen mit einer Signalpeptid-Annotation fanden sich 441 mit mindestens fünf aufeinanderfolgenden identischen Aminosäuren innerhalb des Signalpeptids. Bei 397 Proteinen handelte es sich um Leucine. Für 124 dieser Proteine war dieser Leucin-*Stretch* als repetitive Sequenz in DNA-Datenbanken wie *UCSC* oder *Ensembl* annotiert, wobei es sich in den meisten Fällen um Poly-CTG/CAG-*Repeats* handelte. Für 18 Gene, die mindestens fünf aufeinanderfolgende CTGs aufwiesen oder für die in der *dbSNP* Datenbank des NCBI Längen-Varianten des Signalpeptids annotiert waren, wurden daraufhin bis zu 96 Kontroll-Individuen genotypisiert. Tatsächlich fand fand sich bei 9 dieser 18 Gene mindestens ein weiteres Allel (Tab. 3.4).

Tab. 3.4: Ergebnisse der Genotypisierung von 9 polymorphen der untersuchten 18 Signalpeptid-CTG-*Repeats*.

GEN	LEU	rs-ID ¹	ALLELE	ANZAHL DER CHROMOSOMEN MIT ALLEL					
				1	2 ²	3 ²	4 ²	5 ²	6 ²
<i>NOTCH4</i>	11	rs9281675 rs35795312	6	85	45 (-3bp)	20 (+3bp)	18 (+6bp)	10 (-12bp)	2 (+9bp)
<i>PCSK9</i>	9	rs45454392 rs35574083	3	115	40 (+3bp)	1 (+6bp)			
<i>STRC</i>	11		3	176	6 (+3bp)	1 (+6bp)			
<i>GDF10</i>	6	rs34420310	2	182	4 (-3bp)				
<i>CELSR2</i>	9	rs10629280 rs59201433	2	130	60 (-3bp)				
<i>DCHS1</i>	9	rs56194704	2	176	14 (+3bp)				
<i>EIF2AK3</i>	8	rs1805190	2	29	9 (+3bp)				
<i>PPGB</i>	9		2	119	69 (+3bp)				
<i>TIP39</i>	9		2	191	1 (-6bp)				

¹ Annotierte Längenpolymorphismen im Signalpeptid nach NCBI dbSNP.

² Längenunterschiede dieses Allels zu Allel 1 ist in Klammern wiedergegeben.

3.3 Familie #2

Im Rahmen dieser Arbeit war eine zweite türkische Familie (Familie #2) mit Betroffenen, die ein eher klassisches OPPG-Syndrom (*Osteoporosis-pseudoglioma syndrome*; MIM 259770) aufweisen, rekrutiert worden. Die Eltern der beiden Betroffenen sind Cousin und Cousine ersten Grades. Zwei ihrer drei Kinder sind von Geburt an blind und weisen eine starke juvenile Osteoporose auf. Die Patienten erlitten aufgrund der schweren verminderten Knochendichte seit ihrer Kindheit multiple Frakturen. Die ersten Knochenbrüche von Radius, Femur und der Hüfte traten im Alter von 11 Jahren bzw. 6-7Jahren auf. Aufgrund dieser zahlreichen und schlecht heilenden Frakturen zeigen die Patienten starke Knochendeformationen auf und sind seit ihrem 16. bzw. 9. Lebensjahr auf einen Rollstuhl angewiesen. Es galt auch hier den in dieser Familie zugrunde liegenden molekulargenetischen und zellulären Pathomechanismus aufzuklären. Durch direkte Sequenzierung des Kandidatengens *LRP5* und im Falle einer Identifikation einer Mutation sollten weitere funktionelle Analysen des mutierten Proteins durchgeführt werden.

3.3.1 Identifikation einer *Splice Site*-Mutation in *LRP5*

Durch Amplifikation und direkter Sequenzierung aller 23 kodierenden Exons von *LRP5* mit genomischer DNA des Indexpatienten wurden 5 homozygote annotierte SNPs und ein homozygoter Basenaustausch an Position +4 der *Donor Splice Site* in Intron 7 identifiziert (Tab. 3.5).

Tab. 3.5: Tabellarische Übersicht über alle bei einem Betroffenen mit OPPG gefundenen Sequenzveränderungen mit Angabe der Lokalisation in *LRP5*, der Annotation bei *NCBI dbSNP*, des Aminosäure-Ausstausch und dem Genotypen des Betroffenen.

LOKALISATION	NCBI dbSNP ANNOTATION	AMINOSÄURE-AUSTAUSCH	BETROFFENEN-GENOTYP
INTRON 2	rs643981 [c/t]	---	HOMOZYGOT [t/t]
INTRON 4	rs314776 [t/c]	---	HOMOZYGOT [c/c]
INTRON 6	rs4988320 [g/a]	---	HOMOZYGOT [a/a]
INTRON 7	c.1584+4a>t [a/a]	<i>SPLICE SITE SCORE</i>	HOMOZYGOT [t/t]
EXON 8	rs545382 [T/C]	F549F	HOMOZYGOT [C/C]
EXON 10	rs4988322 [C/T]	N740N	HOMOZYGOT [t/t]
INTRON 14	rs554734 [t/g]	---	HOMOZYGOT [g/g]
INTRON 16	rs607887 [c/t]	---	HOMOZYGOT [t/t]
EXON 18	rs3736228 [C/T]	A1330V	HOMOZYGOT [C/T]

Die in Abbildung 3.19 dargestellte Segregationsanalyse anhand aller Familienmitglieder ergab, dass beide Betroffenen homozygot und die Eltern heterozygot für diese nicht annotierte, intronische Sequenzveränderung waren. Die gesunde Schwester der beiden Betroffenen war homozygot für das Wildtyp-Allel.

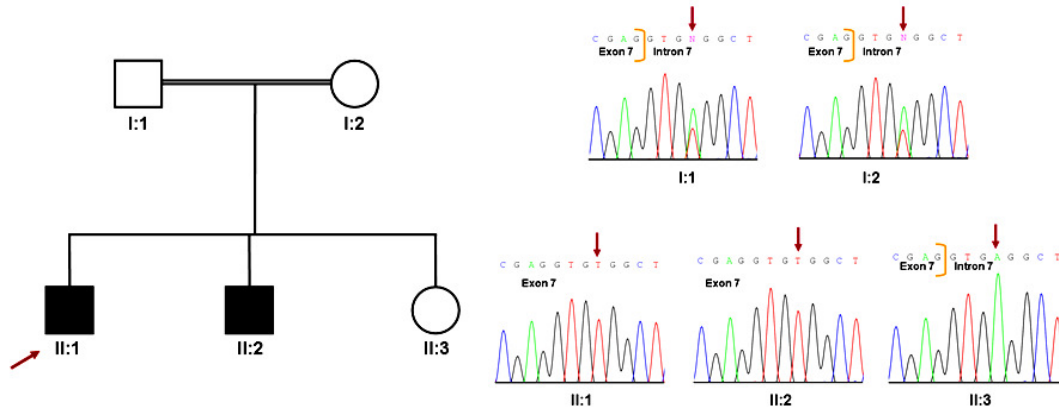


Abb. 3.19: Familienstammbaum der türkischen Familie #2 (links) mit der Segregationsanalyse der Sequenzveränderung c.1584+4a>t in *LRP5* (rechts). Beide betroffenen Familienmitglieder sind homozygot und die konsanguinen Eltern heterozygot für diesen Basenaustausch. Die gesunde Schwester ist homozygot für die Wildtyp-Sequenz.

Mittels eines für diese neu identifizierte Sequenzveränderung geeigneten Restriktionsverdau wurden 50 gesunde türkische Kontrollen genotypisiert. Exon 7 wurde mit seinen flankierenden Intronbereichen bei diesen Kontrollen per Standard-PCR (Primer: *LRP5-ex7F*, *LRP5-ex7R2*) amplifiziert und die PCR-Produkte mit dem Enzym *HphI* verdaut. Dieses Enzym erkennt und schneidet die Wildtypsequenz, während die durch den Basenaustausch veränderte Sequenz in Intron 7 nicht erkannt und folglich nicht geschnitten wird. In diesen 50 türkischen Kontroll-Individuen war dieser Basenaustausch nicht nachweisbar. Einige dieser Kontrollen wurden zur Verifizierung zusätzlich sequenziert. Das Ergebnis des Restriktionsverdau der türkischen Familie ist in Abbildung 3.20 wiedergegeben. Die Eltern (I:1 und I:2) zeigen Banden in Höhe von 475 bp (mutiertes Allel) sowie Banden bei ca. 381 bp und 94 bp (Wildtyp-Allel). Die PCR-Produkte der Betroffenen (II:2 und II:3) blieben unverdaut, während das der Schwester komplett verdaut wurde und sie somit homozygot für das Wildtyp-Allel ist.

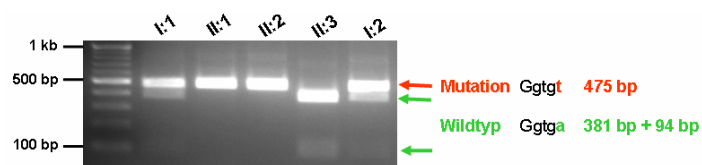


Abb. 3.20: Agarosegel nach Amplifikation und Restriktionsverdau zur Analyse der Sequenzveränderung in Intron 7. Die Eltern zeigen Banden für den heterozygoten Trägerstatus dieser Sequenzveränderung, während das Bandenmuster der Betroffenen sie als homozygot identifiziert. Die Schwester ist homozygot für den Wildtyp, der anhand *HphI* komplett geschnitten wurde.

Da sich diese in der Familie mit dem Phänotyp co-segregierende Sequenzveränderung unmittelbar nach der *Splice Donor Site* von Exon 7 in *LRP5* befand, wurde vermutet, dass diese eine Auswirkung auf das Spleißen haben könnte. Aus diesem Grunde wurde eine *in silico* Prädiktion der *Splice Site* durchgeführt.

Die Wildtyp-Sequenz bzw. die veränderte Sequenz wurden in die Maske der Prädiktionsprogrammes http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html eingegeben.

Während der *Splice Score* für das Wildtyp-Allel an der ursprünglichen *Splice Donor Site* 0,99 betrug, fiel dieser für die veränderte Sequenz auf 0,44 (Abb. 3.21). Eine kryptische *Splice Site* 63 bp *downstream* der ursprünglichen *Splice Site* wurde mit einem *Splice Score* von 0,89 prädiziert.

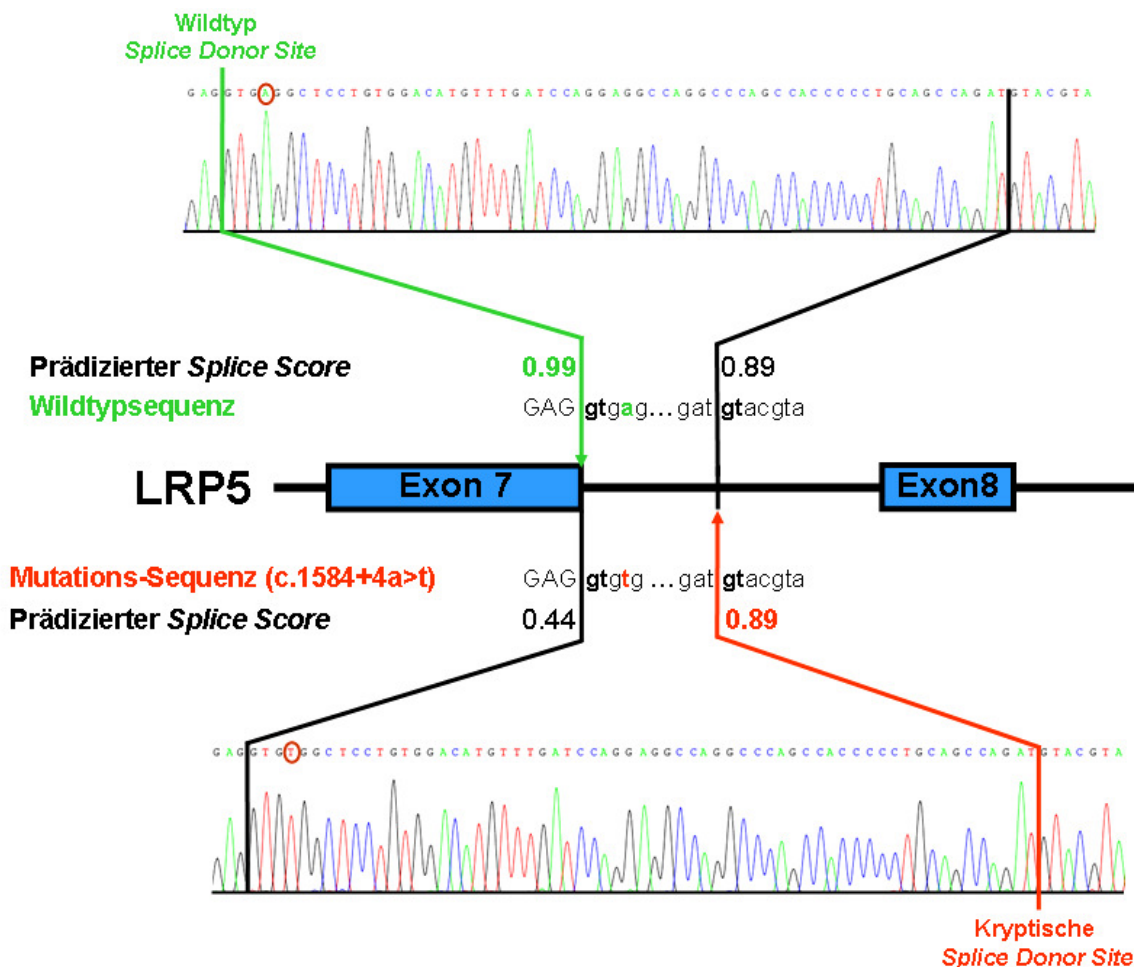


Abb. 3.21: Elektropherogramme der Sequenzier-Ergebnisse der genomischen DNA Amplimere von Exon 7 und den flankierenden Intronbereichen in *LRP5* sowie *Splice Site*-Prädiktion dieser. Die obere Sequenz ist die eines Kontroll-Individuums und die untere die des Indexpatienten II:1. Die Wildtyp-*Splice Donor Site* wird mit einem *Splice Score* von 0,99 prädiziert, während der *Splice Score* für die mutierte Sequenz c.1584+4a>t auf 0,44 fällt. Eine kryptische *Splice Site* mit einem Score von 0,89 wird 63 bp *downstream* der original *Splice Site* prädiziert und, wie experimentell ermittelt werden konnte, bei der mutierten Sequenz präferiert (Kapitel 3.3.2). Die *in silico* *Splice Site*-Prädiktion erfolgte mit der Datenbank: http://www.fruitfly.org/seq_tools/splice.html.

3.3.2 RNA-Analysen der *LRP5-Splice Site*-Mutation

Zur Analyse eines tatsächlichen Effekts der neu identifizierten Mutation auf das mRNA *Splicing* von *LRP5* wurde eine RT-PCR mit RNA aus Blut des Indexpatienten (II:1) und eines gesunden Kontroll-Individuums durchgeführt. Die verwendeten Primer zur Amplifikation waren in Exon 5 und Exon 9 von *LRP5* (*LRP5*-cDNA-Ex5-F, *LRP5*-cDNA-Ex9R) lokalisiert. Wie das Agarosegel-Bild in Abbildung 3.22 (rechts) zeigt, war das PCR-Produkt aus RNA des Indexpatienten verglichen mit dem PCR-Produkt aus RNA des gesunden Kontroll-Individuums etwas größer. Die erwartete Größe des PCR-Produktes betrug ~ 1 kb.

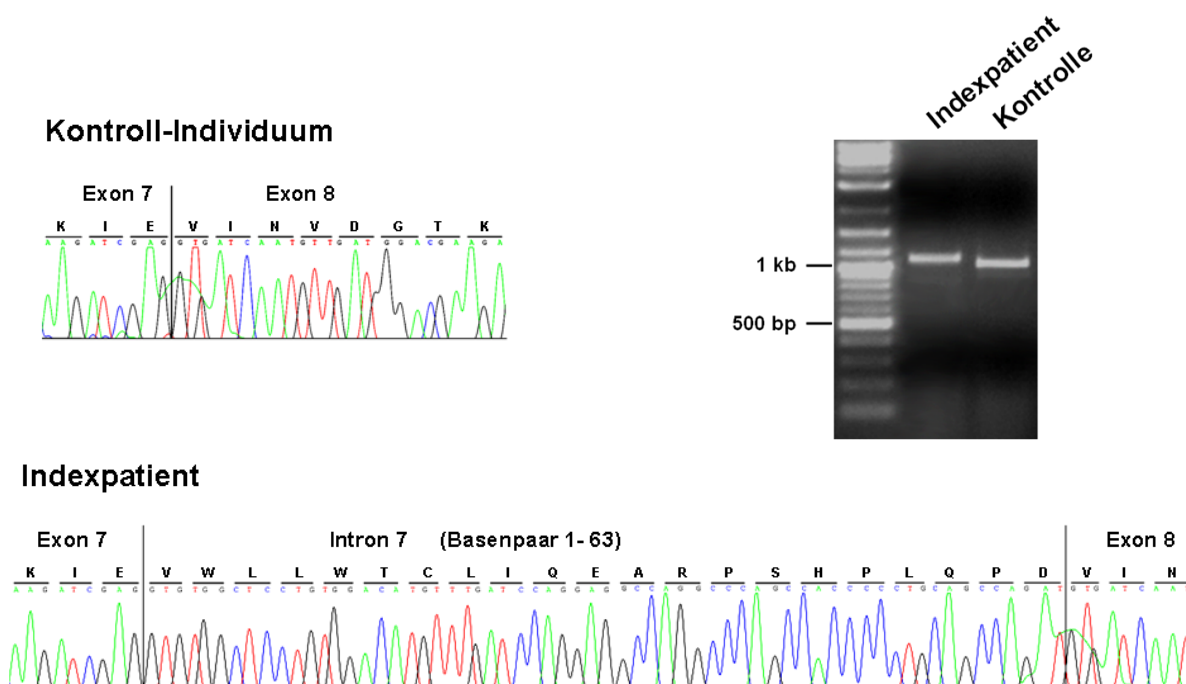


Abb. 3.22: Links: Elektropherogramme der *LRP5*-cDNA-Amplimere eines Kontroll-Individuums (obere Sequenz) und des Indexpatienten II:1 (untere Sequenz). Die RT-PCR wurde aus RNA des Indexpatienten sowie eines Kontroll-Individuums mit Primern, die in Exon 5 und Exon 9 lokalisiert waren. Die direkte Sequenzierung der RT-PCR-Produkte (rechts) zeigt eine mutierte *Splice Donor Site* nach Exon 7 mit 63 zusätzlichen Basenpaaren von Intron 7 beim Indexpatienten. Diese führen zu einer *in-frame* Insertion von 21 Aminosäuren, während die Wildtyp-Sequenz im Kontroll-Individuum korrekt gespleißt wird. **Rechts:** Agarosegel der RT-PCR aus RNA des Indexpatienten II:1 und eines gesunden Kontroll-Individuums. Das RT-PCR-Produkt des Patienten ist größer als das der Kontrolle.

Anhand der direkten Sequenzierung dieser PCR-Produkte wurden beim Indexpatienten 63 zusätzliche Basenpaare nach Exon 7, die aus der intronischen Sequenz herrühren, nachgewiesen. Dies führte demnach zu einer *in-frame* Insertion von 21 zusätzlichen Aminosäuren. Die Sequenz des Kontroll-Individuums zeigte einen normalen Übergang von Exon 7 zu Exon 8 auf. Nach der offiziellen Nomenklatur der *Human Genome Variation Society* trägt diese Mutation die Bezeichnung c.1584+4c>t bzw. p.E528_V529ins21.

3.3.3 Luciferase Reporter Assay – LRP5-Signaltransduktion des mutierten Rezeptors

Zur Untersuchung des molekularen und zellulären Pathomechanismus dieser *Splice Site*-Mutation, die zu einer *in-frame* Insertion von 21 Aminosäuren nach Exon 7 führt, wurde sie in die LRP5-Expressionskonstrukte (*full-length* und *truncated*, basierend auf pcDNA3.1; Kapitel 2.25) eingeführt. Anhand des WNT/NDP-Signaltransduktionsweg *Luciferase Reporter Assays* (Kapitel 2.29) sollte die Funktionalität des mutierten LRP5-Rezeptors analysiert werden. Die Durchführung erfolgte wie bereits in den Kapiteln 2.29 und 3.1.9 beschrieben. Das in Abbildung 3.23 (links) dargestellte Diagramm umfasst 5 unabhängige Experimente. Die Signaltransduktionsfähigkeit von LRP5 mit der neu identifizierten *Splice Site*-Mutation p.E528_V529ins21 ist deutlich beeinträchtigt. Es zeigt sich eine sehr geringe Luciferase-Aktivität und damit eine deutlich eingeschränkte Transduktion im Vergleich zum Wildtyp. LRP5-Mut_{3L} diente in diesem Falle als Kontrolle der gestörten Signaltransduktion. Auf Proteinebene konnte anhand von Westernblot-Analysen der Zell-Lysate eine eindeutige Expression des mutierten LRP5-Rezeptors gezeigt werden. Abbildung 3.23 (rechts) zeigt einen repräsentativen Westernblot dieser Analysen.

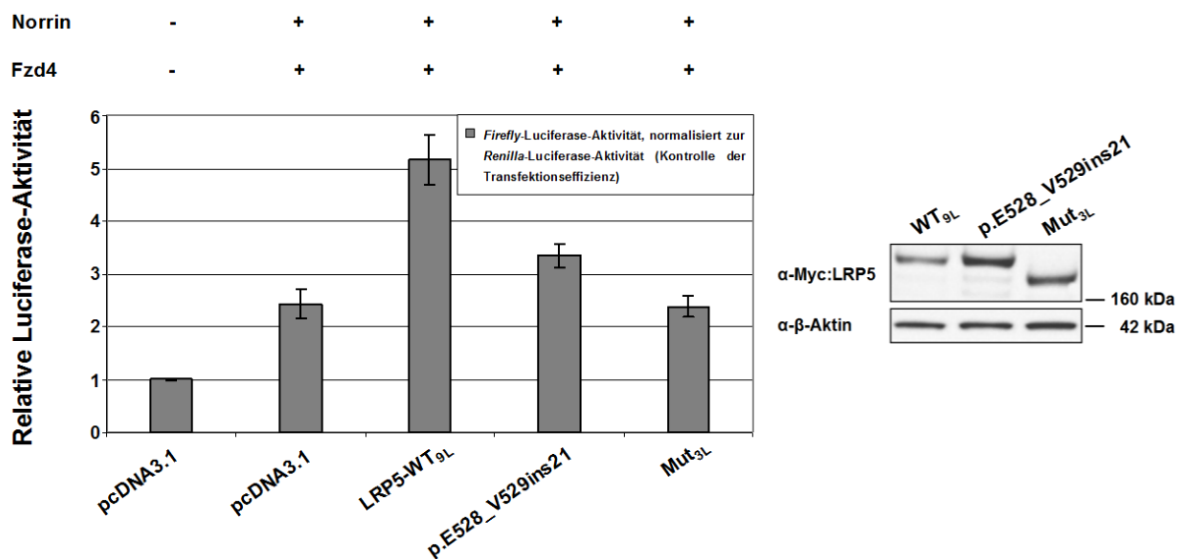


Abb. 3.23: Diagramm des *WNT/NDP-Signaling Luciferase Reporter Assay* des LRP5-WT_{9L}-Proteins sowie der Mutanten LRP5-p.E628_V529ins21 und LRP5-Mut_{3L} und des Leervektors und repräsentativer Westernblot der Zell-Lysate. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen der jeweiligen relativen *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten aus insgesamt fünf unabhängigen Experimenten, bei denen jedes *LRP5*- bzw. Kontroll-Konstrukt in drei Ansätzen transfiziert wurde. Die relative Luciferase-Aktivität der Mutante p.E528_V529ins21 ist signifikant niedriger als die von WT_{9L}. Die Mutante Mut_{3L} fungiert als Positivkontrolle einer beeinträchtigten Signaltransduktion. Der repräsentative Westernblot der Zell-Lysate, die im *Luciferase Reporter Assay* eingesetzt wurden, zeigt eine eindeutige Expression des WT_{9L} sowie der beiden mutierten LRP5-Rezeptoren.

3.3.4 Secretion Assay – Intrazellulärer Transport der mutierten LRP5-Rezeptoren

Mittels des *Secretion Assays* wurde das intrazelluläre *Trafficking* dieses mutierten Proteins untersucht. Die Expressionskonstrukte *LRP5* Δ C-WT_{9L} und *LRP5* Δ C-p.E528_V529ins21 (= ohne Transmembran- und cytoplasmatische Domäne) wurden in Hek293T-Zellen transient transfiziert und das *Conditioned Medium* und die Zell-Lysate zur Westernblot-Analyse eingesetzt. Bei korrektem intrazellulären Transport des Proteins sollte dieses aufgrund der fehlenden Transmembrandomäne unter anderem in den Überstand (*Conditioned Medium*) sezerniert werden. Die anschließende Westernblot-Analyse zeigte, dass ausschließlich der WT_{9L} ins *Conditioned Medium* sezerniert wurde, während die Mutante im Lysat zurückblieb (Abb. 3.24).

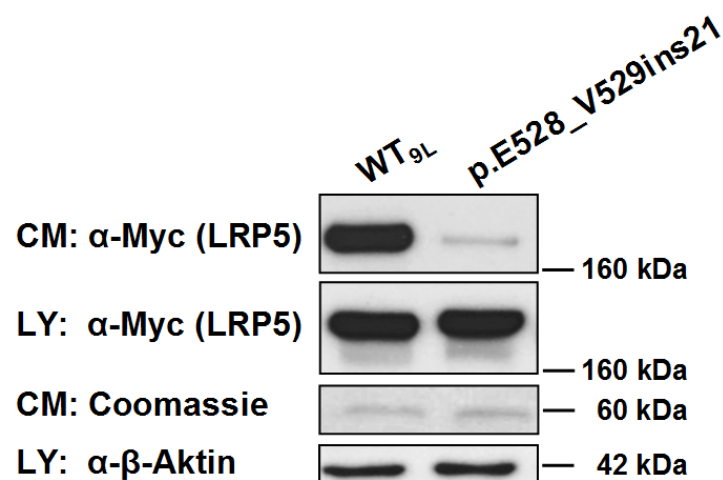


Abb. 3.24: Westernblot-Analyse des *Conditioned Medium* (CM) und der Zell-Lysate von HEK293T-Zellen, die mit *LRP5*-WT_{9L} und p.E528_V529ins21 Expressionskonstrukten ohne Transmembran- und cytoplasmatische Domäne transient transfiziert wurden. Bei korrektem intrazellulären Transport sollte der LRP5-Rezeptor unter anderem ins *Conditioned Medium* sezerniert werden. Während der WT_{9L} stark im *Conditioned Medium* nachzuweisen war, wurde die Mutante nicht ins *Conditioned Medium* sezerniert. Das Auftragen gleicher Proteinmengen des *Conditioned Medium* und der Zell-Lysate wurden mit Hilfe von β-Aktin (Lysate) und einer *Coomassie*-Färbung eines 60 kDa Protein im *Conditioned Medium* kontrolliert.

3.3.5 Subzelluläre Lokalisation des LRP5-Wildtyp- und des mutierten LRP5-Proteins

Zur Untersuchung einer möglichen Fehllokalisierung der p.E528_V529ins21-Mutante wurde diese mittels der subzellulären Fraktionierung untersucht. Die Expressionsvektoren von *LRP5*-WT_{9L} und der Mutante wurden in Hek293T-Zellen transient transfiziert. Nach Homogenisierung anhand eines Sucrose-Puffers und anschließender Ultrazentrifugation wurden die Zell-Lysate in cytosolische und membranständige Proteine getrennt und diese mit Hilfe eines Westernimmunoblots analysiert.

Sowohl das Wildtypprotein als auch das mutierte Protein sind nahezu ausschließlich in der Membranfraktion nachweisbar (Abb. 3.25). Eine korrekte Auftrennung beider Fraktionen wird durch Calnexin und β -Aktin bestätigt.

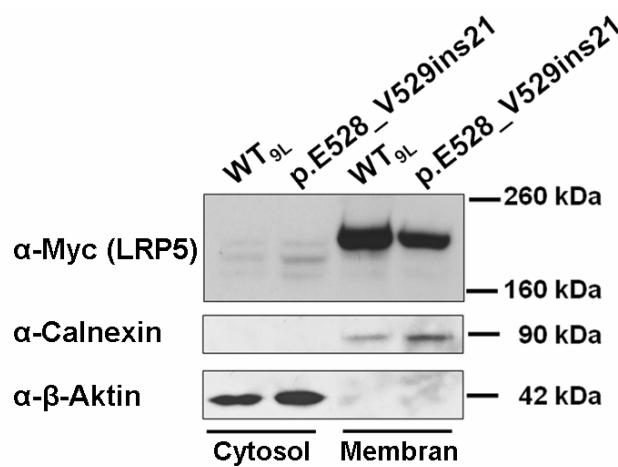


Abb. 3.25: Westernblot-Analyse nach subzellulärer Fraktionierung der Hek293T-Zell-Lysate, welche mit *LRP5*-WT_{9L} bzw. p.E528_V529ins21-Expressionsvektoren transient transfiziert wurden. Cytosolische und Membranproteine wurden mittels Ultrazentrifugation voneinander getrennt. Endogenes β -Aktin und Calnexin dienten als Positivkontrolle für eine korrekte Fraktionierung. Sowohl WT_{9L} als auch p.E528_V529ins21 sind nahezu ausschließlich in der Membranfraktion zu detektieren.

Anhand der hier dargestellten Ergebnisse wurde gezeigt, dass bei den Betroffenen in beiden Familien bis dato unbekannte, neuartige und innerhalb der jeweiligen Familie mit dem Phänotyp co-segregierende *LRP5*-Mutationen identifiziert wurden. Des Weiteren wurde deren Pathophysiologie mit Hilfe von molekulargenetischen *in vitro*-Assays nachgewiesen. Darüber hinaus ergab sich aus weiteren Analysen der in Kontroll-Individuen detektierten verschiedenen *LRP5*-Varianten mit 6 bis 11 Leucinen im Signalpeptid ein quantitativer Effekt, der möglicherweise im Rahmen des Knochenstoffwechsels klinisch relevant sein könnte. Somit wurde im Rahmen dieser Arbeit demonstriert, dass *LRP5* eine zentrale Rolle sowohl bei monogenen Erkrankungen wie OPPG als auch vermutlich bei komplexgenetischen Erkrankungen wie Osteoporose einnimmt.

Allerdings ist über die Regulation des *LRP5*-Gens bislang wenig bekannt. In Anbetracht dessen könnten sich aus der Analyse des annotierten, exprimierten *LRP5L*-Pseudogens wichtige neue Erkenntnisse über eine mögliche Regulation von *LRP5* oder *vice versa* ergeben.

3.4 *LRP5L* – Pseudogen

Auf Chromosom 22q11.23 existiert ein Pseudogen zu *LRP5*. Dieses *LRP5L*-Pseudogen (*Low density lipoprotein receptor-related protein 5-like*) wurde bislang in der Literatur lediglich als mögliche Fehlerquelle bei der PCR-Amplifikation einzelner *LRP5*-Exons erwähnt [Gong *et al.*, 2001; Ai *et al.*, 2005]. Auch im Rahmen der vorliegenden Arbeit waren die hochhomologen Sequenzen des Pseudogens zu *LRP5* bei Amplifikation und Sequenzierung von *LRP5* berücksichtigt worden. Interessanterweise ist dieses Pseudogen stark exprimiert und wird, wie sich u.a. an zahlreichen annotierten *ESTs* in Genomdatenbanken des *UCSC*, *NCBI* und *ENSEMBL* ablesen lässt, prozessiert. Systematische experimentelle Daten zur genomischen Struktur und zum Expressionsmuster dieses Pseudogens liegen bislang nicht vor. Mehrere in den Datenbanken enthaltene *spliced ESTs* mit zusätzlichen Exons belegen, dass die genaue Struktur des Pseudogens ebenso wie die Größe und Orientierung des Transkriptes gegenwärtig unklar sind.

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten der Aufbau des Pseudogens mit Hilfe der *RACE-PCR* experimentell aufgeklärt werden. Dabei sollte die komplette Pseudogen-cDNA amplifiziert und die Struktur mittels Sequenzierung und bioinformatischen Analysen ermittelt werden. Nach Aufklärung der Struktur sollte das Pseudogen für weitere funktionelle Analysen in einen Expressionsvektor kloniert werden.

Anhand von Expressionsanalysen sollte außerdem das Expressionsmuster des Pseudogens untersucht werden. Der nächste Schritt war die Überprüfung der Hypothese, ob das Pseudogen *LRP5L* eine regulatorische Funktion für *LRP5* besitzen könnte. Genregulation durch transkribierte Pseudogene in Form von RNA-Interferenz wurde in den letzten Jahren wiederholt in der Literatur beschrieben. Watanabe *et al.* sowie Tam *et al.* zeigten, dass bei Mäusen endogene siRNA von Pseudogenen abstammten und diese durch RNA-Interferenz (RNAi) Gene regulieren konnten [Watanabe *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2008]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde eine mögliche Regulation von *LRP5* durch das Pseudogen *LRP5L* zum einen anhand des WNT/NDP-Signaltransduktionsweg *Luciferase Reporter Assays* untersucht und zum anderen durch RNA-Interferenz-Experimente analysiert. Letztere erfolgten durch Transfektion von siRNA in eine *LRP5L*- und *LRP5*-exprimierende Zelllinie und anschließender quantitativer *Real-Time-PCR* zur Analyse eines möglichen Effektes des Pseudogen-*Knock downs* auf die endogene Transkription von *LRP5* und *vice versa*.

3.4.1 Aufklärung der *LRP5L*-Pseudogen-Struktur

3.4.1.1 Datenbank-Analysen

In den Genom-Datenbanken des *UCSC*, *NCBI* sowie bei *ENSEMBL* war anhand von annotierten *ESTs* das *LRP5L*-Pseudogen mit sechs Exons und einem maximalen *Open Reading Frame* von 756 bp (252 Aminosäuren) auf Chromosom 22q11.23 prädiziert worden (*Low density lipoprotein receptor-related protein 5-like*; NM_182492; NM_001135772). Allerdings zeigten zahlreiche *spliced ESTs* mit zusätzlichen Exons, dass die genaue Struktur des Pseudogens sowie Größe und Orientierung des Transkriptes noch nicht definitiv aufgeklärt waren. Ein Vergleich und Abgleich der annotierten *EST*-Daten aller drei Datenbanken mit Hilfe von *NCBI-Blast* und *UCSC-BLAT* ergaben, dass die annotierten *EST*-Sequenzen deckungsgleich waren; es handelte sich teilweise um die gleichen Klone. Der in Abbildung 3.26 dargestellte Ausschnitt aus Chromosom 22 des *UCSC Genome Browsers* gibt eine Übersicht über das prädizierte Pseudogen *LRP5L* und den umgebenden *spliced ESTs* wieder. Diese *ESTs* zeigten, dass möglicherweise noch ein oder zwei zusätzliche Exons zu den bisher sechs prädizierten Exons des Pseudogens existierten. Um die tatsächliche Struktur des *LRP5L*-Pseudogens zu rekonstruieren, wurden vier ausgewählte *EST*-Sequenzen genauer analysiert. Diese vier *ESTs* zeigten möglichst geringe Abweichungen zur Genom-Sequenz auf Chromosom 22 auf und deckten außerdem insgesamt alle prädizierten Exons und *ESTs* von *LRP5L* vollständig ab. Sie sind in der Abbildung mit roten Pfeilen gekennzeichnet. Abweichungen vom Genom, die in der Regel von Sequenzier-Artefakten der einzelnen Klone herrühren, sind farblich gekennzeichnet.

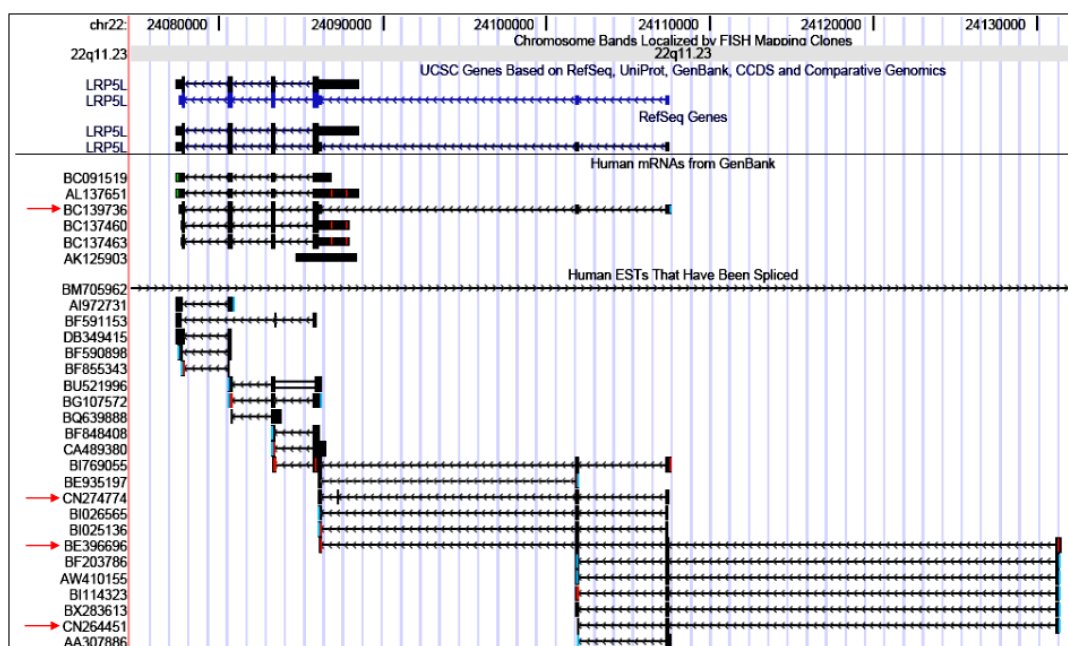


Abb. 3.26: Ausschnitt aus *UCSC Genome Browser* auf Chromosom 22 (chr22:24,074,626-24,134,477; Human March 2006 Assembly). Dargestellt sind das prädizierte *LRP5L*-Pseudogen und die dieses umgebenden *spliced ESTs*. Die mit einem roten Pfeil gekennzeichneten *ESTs* wurden für weitere *in silico*-Analysen und zur genauen Aufklärung der Gen-Struktur ausgewählt.

Eine *in silico*-Analyse mittels *UCSC-BLAT* der vier *EST*-Sequenzen BE13936, CN274774, BE396696 und CN264451 mit insgesamt acht prädierten Exons von *LRP5L* auf Chromosom 22 zeigte, dass diese eine hohe Homologie zu Exon 1, Exon 3 und 4 sowie zu Exon 6 bis Exon 9 von *LRP5* auf Chromosom 11 aufweisen. Eine Homologie des in der Abbildung 3.27 mit 5* gekennzeichneten Exons eines *ESTs* zu einem Exon in *LRP5* lag rein bioinformatisch nicht vor.

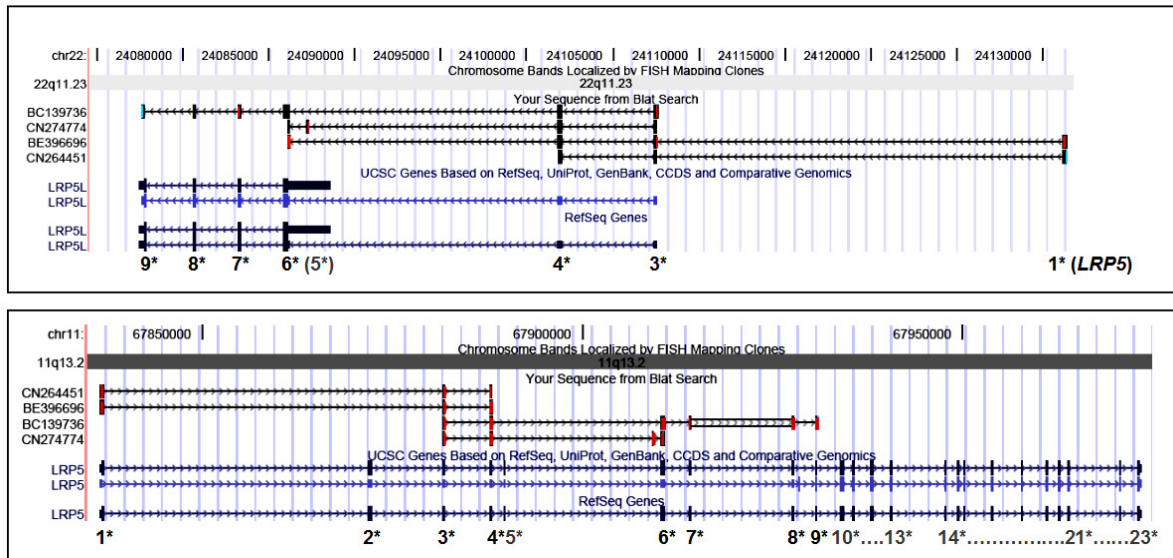


Abb. 3.27: Ausschnitt aus dem *UCSC Genome Browser* von Chromosom 22 (oberer Ausschnitt) (chr22:24,074,626-24,134,477; *Human March 2006 Assembly*) mit prädiertem *LRP5L* und vier ausgewählten *spliced ESTs*, die alle *LRP5L*-Exons komplett abdecken. Diese weisen eine hohe Homologie zu Exon 1*, Exon 3* und 4* sowie zu Exon 6* bis Exon 9* von *LRP5* auf Chromosom 11 (unterer Ausschnitt: chr11:67,835,000-67,975,000; *Human March 2006 Assembly*) auf.

Die Sequenzen der vier ausgewählten humanen *spliced ESTs* sowie die des prädierten *LRP5L*-Pseudogens wurden mit den Sequenzen des humanen Genoms auf Chromosom 22 und 11 genau abgeglichen. Aufgrund der hohen Homologie des Pseudogens zu *LRP5* war dies notwendig, um pseudogenspezifische Primer zur experimentellen Aufklärung der *LRP5L*-Struktur und andere funktionelle Analysen zu generieren.

3.4.1.2 RACE (*Rapid Amplification of cDNA-Ends*)-PCR von *LRP5L*

Bei den prädierten *LRP5L*-Exons handelte es sich lediglich um bioinformatische Daten, die auf den Sequenzierungsergebnissen einiger *EST*-Klone gestützt waren. Die tatsächliche Struktur des Pseudogens erschloss sich allein aus diesen Informationen nicht. Zur experimentellen Ermittlung der *LRP5L*-Struktur sollte das Gen auf cDNA-Ebene vollständig amplifiziert und sequenziert werden. Da die 5'- und 3'-cDNA-Enden dieses Pseudogens bislang unbekannt waren und eine reine *in silico* Prädiktion der Enden die Existenz aller *EST*-Exons nicht sicherstellte, wurde die in Abbildung 3.28 dargestellte Strategie der *RACE*-PCR angewendet.

Diese ermöglichte die Amplifikation der unbekannt cDNA-Enden des Pseudogens. Die pseudogenspezifischen Primer (*LRP5L*-GSP-F1 bis F4 sowie *LRP5L*-GSP-R1 bis R4) lagen etwa 100 bis 600 Basenpaare von den bioinformatisch prädizierten Enden entfernt.

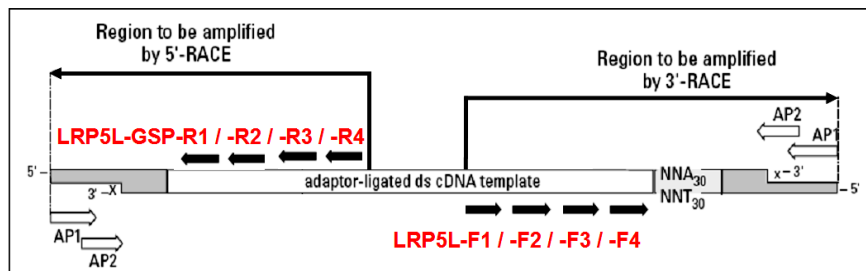


Abb. 3.28: Strategie der RACE-PCR mit den pseudogenspezifischen Primern *LRP5L*-GSP-R1 bis R4 für die Amplifikation des 5'-Endes sowie *LRP5L*-GSP-F1 bis F4 zur Ermittlung des 3'-Endes von *LRP5L*. Die Primer AP1, AP2 und die Marathon-Ready cDNA waren von der Firma Clontech bezogen [Bildquelle: *Marathon-Ready™ cDNA-Handbuch*, Clontech; modifiziert].

3.4.1.2.1 Bestimmung des 5'-cDNA-Endes von *LRP5L*

Die Bestimmung des 5'-cDNA-Endes von *LRP5L* erfolgte mit Hilfe der *RACE*-PCR aus verschiedenen pseudogenspezifischen Primerkombinationen in zwei Amplifikationsrunden. Die erste Runde erfolgte mit einer *Tochdown*-PCR bei 74 bis 59°C in den Primerkombinationen AP1 und *LRP5L*-GSP-R3 bzw. *LRP5L*-GSP-R4. Als *Template* diente *Marathon-Ready* cDNA aus der humanen Leber. Für die *Nested*-PCR unter den gleichen Temperatur-Bedingungen wurden die PCR-Produkte aus der ersten Runde eins zu fünf verdünnt und als *Template* verwendet. Hierzu wurden die Primerkombinationen AP2 und *LRP5L*-GSP-R1 bzw. AP2 und *LRP5L*-GSP-R2 eingesetzt. Die PCR-Produkte der *Nested*-PCR wurden auf ein Agarosegel aufgetragen. Da die tatsächlichen cDNA-Enden nicht bekannt waren, konnte die Größe des erwarteten PCR-Produktes nur geschätzt werden. Aufgrund der Prädiktionen wurden DNA-Banden zwischen etwa 120 und 450 bp erwartet. Diese in Abbildung 3.29 mit einem Sternchen versehenen Banden wurden herausgeschnitten und zur Sequenzierung aufgereinigt

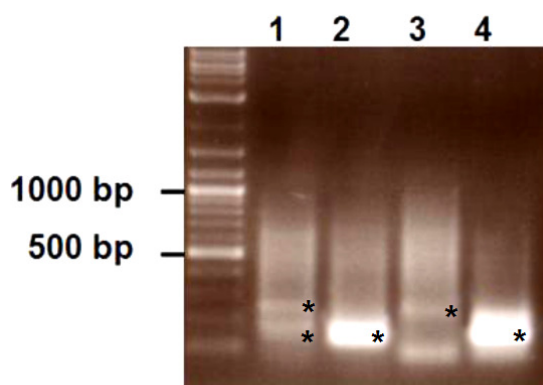


Abb. 3.29: Agarosegel der *Nested*-PCR-Produkte zur Ermittlung des 5'-cDNA-Endes von *LRP5L*. Die *Tochdown*-PCR (74-59°C) erfolgte mit der *HighFidelity*-Polymerase und verdünnten PCR-Produkten aus der ersten PCR-Runde als *Template*.

- 1: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L*-GSP-R3;
Primer: AP2 + *LRP5L*_GSP-R1.
- 2: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L*-GSP-R3,
Primer: AP2 + *LRP5L*_GSP-R2.
- 3: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L*-GSP-R4;
Primer: AP2 + *LRP5L*_GSP-R1.
- 4: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L*-GSP-R4;
Primer: AP2 + *LRP5L*_GSP-R2.

3.4.1.2.2 Bestimmung des 3'-cDNA-Endes von *LRP5L*

Zur Bestimmung des 3'-cDNA-Endes von *LRP5L* wurde die gleiche Strategie der *RACE-PCR* aus verschiedenen pseudogenspezifischen Primerkombinationen in zwei Runden angewendet. Die erste Amplifikations-Runde erfolgte mit einer *Two-Step-PCR* bei *Annealing*-temperaturen von 68°C und 66°C in den Primerkombinationen AP1 und *LRP5L-GSP-F1* bzw. *LRP5L-GSP-F2*, *LRP5L-GSP-F3* und *LRP5L-GSP-F4*. Als *Template* diente *Marathon-Ready* cDNA aus der humanen Leber. Für die *Nested-PCR* unter den gleichen Temperatur-Bedingungen wurden die PCR-Produkte aus der ersten Runde eins zu zehn verdünnt und diese als *Template* verwendet. Hierzu wurden die Primerkombinationen AP2 und *LRP5L-GSP-F3* bzw. *LRP5L-GSP-F4* eingesetzt. Die geschätzten erwarteten Größen der PCR-Produkte betragen etwa 400 bis 650 bp. Die PCR-Produkte der *Nested-PCR* wurden auf ein Agarosegel aufgetragen und die Banden unterschiedlicher Größen zur Sequenzierung aus dem Gel herausgeschnitten und aufgereinigt (Abb. 3.30).

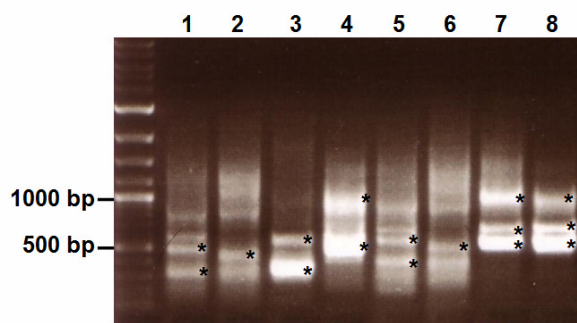


Abb. 3.30: Agarosegel der *Nested-PCR*-Produkte zur Ermittlung des 3'-cDNA-Endes von *LRP5L*. Die *2-step-PCR* (68°C + 66°C) erfolgte mit der *HighFidelity*-Polymerase und verdünnten PCR-Produkten aus der ersten PCR-Runde als *Template*. Die erwarteten Größen der PCR-Produkte betragen ca. 400-650 bp. Die mit einem Sternchen (*) versehenen Banden wurden herausgeschnitten und zur Sequenzierung aufgereinigt.

- 1: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L-GSP-F1*;
Primer: AP2 + *LRP5L_GSP-F3*.
- 2: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L-GSP-F2*;
Primer: AP2 + *LRP5L_GSP-F3*.
- 3: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L-GSP-F1*;
Primer: AP2 + *LRP5L_GSP-F4*.
- 4: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L-GSP-F2*;
Primer: AP2 + *LRP5L_GSP-F4*.

- 5: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L-GSP-F3*;
Primer: AP2 + *LRP5L_GSP-F3*.
- 6: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L-GSP-F4*,
Primer: AP2 + *LRP5L_GSP-F3*.
- 7: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L-GSP-F3*;
Primer: AP2 + *LRP5L_GSP-F4*.
- 8: *Template*: 1. *RACE* mit AP1 + *LRP5L-GSP-F4*;
Primer: AP2 + *LRP5L_GSP-F4*.

Anhand eines *Alignments* der sequenzierten der PCR-Produkte aus den *Nested-PCRs* mit der Genom-Sequenz auf Chromsom 22 konnten die prädizierten Sequenz-Endabschnitte des 5'- und 3'-Endes größtenteils bestätigt werden. Das *Alignment* des 5'-Endes ergab, dass 51 prädizierte Basenpaare des 5'-cDNA-Endes auf cDNA-Ebene nicht nachweisbar waren. Das 3'-cDNA-Ende von *LRP5L* entsprach der Datenbank-Prädiktion und endet in einem Poly-A-Schwanz.

Mit Hilfe dieser experimentell ermittelten 5'- und 3'-End-Abschnitte wurde die komplette *LRP5L*-cDNA zur Analyse der tatsächlichen Gen-Struktur amplifiziert und vollständig sequenziert. Die PCR erfolgte mit *Human Universal cDNA* (Clontech) als *Template* und den Primern *LRP5L-RACE-1F* und *LRP5L-KI-1R* (Abb. 3.31, blau), die am neu identifizierten 5'-Ende und 3'-Ende lokalisiert waren. Die anschließend durch direkte Sequenzierung erhaltene komplette *LRP5L*-cDNA-Sequenz ist in Abbildung 3.31 wiedergegeben.

```

gtggagcccgagtgagcgcggcgccagcccgtccggcgctggacaacatggaggctgcaactgcccgggcccgc
cgtggccgctgctgctggcgctgtgcggtgcccggcccccgccgcaggtacatgtactgggcagattgggg
tgagacgccctggatcgagcaggtggggatggacgacagcaccagaagatcattgtggacttggacattta
ctggccaatagactgaccatcgacctgggggagaagaagctctactgggctgacactaagctcggcttcat
ccaccgtgcaacctggacggctcgttccggcagaaggtggtgaagggcagcctgacgaccccttcaccctg
aactctccggggacactctgcaactggatggactggctgacgtgctccatccatgctgcaacaggaacact
gcggggaagaggaacgagatcttgagcgcctctactcagcatggatatccagggtgctgagccaggagcagc
agcctttctgagccaaggaggtcctgctgctggcccggtagacggaccaatggagggtctcgtggacacac
cggacttcaccgacatcgtgctgcagctggacgacatccagcatgccatcgccatcaactatgacccaATGG
AGGGCCACGTCTACTGGACGGATGACGAGGTGTGGCCATCCGCAGGGCATACTGGATGGGTCTGGGGCGC
AGACGCTGATCAACACCAAGATCAACGACCCGATGACATCGCAGTCAACTGGGTGGCCGAAGCCTCTATT
GGACCCACACAGGCACTGAACACATCGAGGTGACGTGCCTCAACAGCACCTCCCACAAGATCCTGGTGTGAG
AGGACATGGACGAGCCCCGTGCCATTGCACTGCATCCCGAGATGGGCCTCACGTACTGGATAGACTGGGGAG
AGAACCCTGAAATCAAGCGTGCCAACCTGGACAGGCAGGAGCTGCGCGTGCTGGTCAATGCTTCCCTCGGGT
GGCCCAACGGCCTGGCCCTGGACCTGCAGGAAGGGAAGCTCTACTGGGGAGATGCCAAGACAGACAAGATCG
AGGCGATCAGTGTGATGAGACGAAGAGGCAGACCCTCCTGAAGGACAAGCTCCCACACATTTTCAGGTTC
CCCTGCTGGGGGACTTTCATCTACTGGACCGCCTGGCAGCACCACAGCATCAAGCGGGTACACAAGGTCAAGG
CCAACCGGGACGTCATCATTGACCAGCTGCCCGACCTGATGGGGCTCAAAGCTGTGAACGTGGACAAGGTGCG
TCGGAACCAACCCTCATGCGGACAGGAATGGGGGTGCAGCCACCTGTGCTTCTTTCAGCCCCACACAACCCG
GTTTGGCTGCCCCCATCTAGGGCCTGGAACTGCTGAgtgacatgaagacctgcatcatgcccgaaggccttctt
ggcttccaccagtagagccgcatccacaggatctccctcgagaccaacaacaacgatgtggccatcctgct
ctcggcgtcaaggaggcctcggcctggactttgatgtgtccagcaaccacatctactggacagacatcagc
ctgaaggtagcgtggggcccgaacatgcacacgtgcagcctatatgggaaaaccttcctctgtacctgcctc
aaaggtttcagacatTTTTTcttaaagcactataatatttattgtaacacaattcaagctaattaatatgag
caagcctatttcaaaaaaaa...

```

Abb. 3.31: Komplett amplifizierte cDNA-Sequenz von *LRP5L*. In rot ist der größte *Open Reading Frame* dargestellt, begrenzt durch das Start-Codon ATG und Stop-Codon TGA. Hellblau markiert sind die Grenzen der 7 Exons. Die 5'- und 3'-„UTRs“ sind schwarz gekennzeichnet. Fett in blau markierte und unterstrichene Sequenzabschnitte wurden als Primer zur Amplifikation der kompletten cDNA und zur Klonierung des *LRP5L-Full-length*-Expressionskonstruktes (Kapitel 2.2.3 und 3.4.3) verwendet worden. Fett in rot markierte und unterstrichene Primer-Sequenzen dienten zur Amplifikation und Klonierung des *LRP5L-ORF*-Expressionskonstruktes. Diese wurden für weitere funktionelle Analysen generiert (Kapitel 2.2.3 und 3.4.3).

NCBI-Blast- und *UCSC-BLAT*-Analysen zeigten, dass die Sequenz mit der Genom-Sequenz auf Chromosom 22 zu nahezu 100 % übereinstimmte. *LRP5L* bestand folglich aus sieben Exons mit einer Gesamtlänge von 1740 bp. Ein zusätzliches Exon zu den bereits von *UCSC* und *NCBI* prädizierten, welches als *EST*-Exon in den Datenbanken enthalten war, konnte so bestätigt werden. Das in Abbildung 3.27 mit 5* gekennzeichnete hypothetische *EST*-Exon konnte auch experimentell in *LRP5L* nicht nachgewiesen werden. Der größte *Open Reading Frame* war wie bereits in den Datenbanken vorhergesagt 756 bp groß (252 Aminosäuren)

und ist in Abbildung 3.31 in roten Großbuchstaben dargestellt. Da das Start-Codon dieses größten Leserahmens nur teilweise mit der Kozak-Sequenz (GCC**RCC**ATGG) übereinstimmt, die zur Initiierung einer Translation von Bedeutung ist und außerdem kein Polyadenylierungssignal *downstream* des Stop-Codons vorzufinden war, blieb offen, ob es sich hierbei um ein tatsächlich translatiertes Protein handelte [Kozak, 1986]. In Anbetracht der Fragestellung, ob das Pseudogen eine regulatorische Funktion auf *LRP5* ausübt, war dies jedoch nicht relevant, da primär nach einem auf RNA-Interferenz basierenden Mechanismus gesucht werden sollte [Watanabe *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2008].

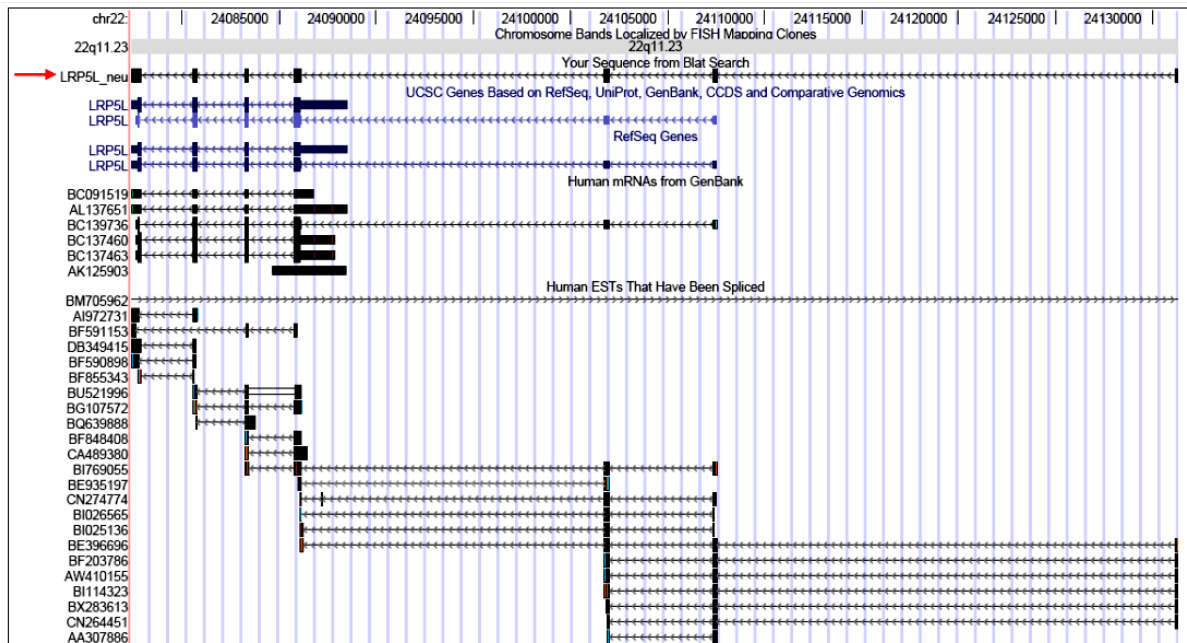


Abb. 3.32: UCSC-BLAT-Analyse der komplett amplifizierten cDNA-Sequenz von *LRP5L_neu* (roter Pfeil). Insgesamt wurden sieben *spliced* Exons auf cDNA-Ebene nachgewiesen, welche mit den *spliced* ESTs sowie den Genom-Sequenzen auf Chromosom 22 übereinstimmten. Das bislang in Abbildung 3.27 gekennzeichnete hypothetische Exon 5* (CN274774-EST) konnte für *LRP5L* nicht nachgewiesen werden.

3.4.2 Expressionsanalysen

3.4.2.1 *LRP5L*-Amplifikation mittels des *Multiple-Tissue-cDNA-Panels*

Anhand des *Multiple-Tissue-cDNA-Panels* wurde das Expressionsmuster dieses Pseudogens in verschiedenen Geweben analysiert. Das ausgewählte *Panel* enthielt humane cDNA aus 12 verschiedenen Geweben. Durch Standard-PCR wurden diese 12 cDNA-Gewebeproben jeweils mit den genspezifischen Primern *LRP5L*-MTN-1F und *LRP5L*-MTN-1R amplifiziert. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es wichtig, eine pseudogenspezifische Primerkombination zu verwenden, damit nicht fälschlicherweise *LRP5* amplifiziert wurde. Die Primer wurden in *LRP5L* so gelegt, dass ein pseudogenspezifisches PCR-Produkt im Fall von *LRP5L* 581 bp groß ist, im Gegensatz zu 1128 bp bei einer Amplifikation von *LRP5* (Abb. 3.33 und 3.34).

Die Stärke der Genexpression im entsprechenden Gewebe korrelierte mit der Intensität und Dicke der Bande auf einem Agarosegel.

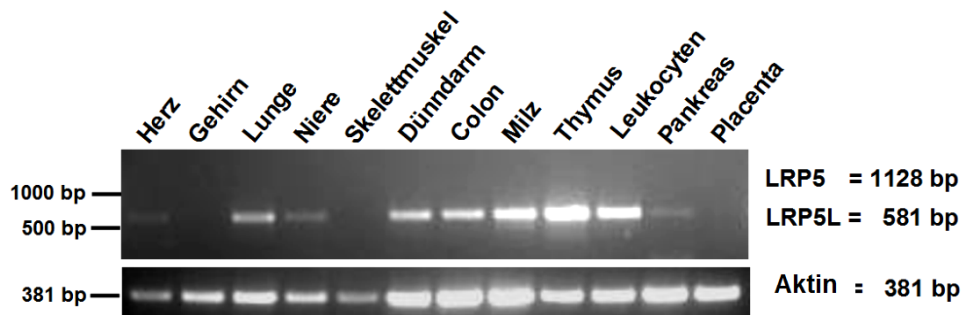


Abb. 3.33: Agarosegel der *LRP5L*-PCR-Produkte aus 12 verschiedenen cDNA-Gewebeproben des *Multiple-Tissue-cDNA* Panels. Die für die PCR eingesetzten cDNAs stammten aus Herz, Gehirn, Lunge, Niere, Skelettmuskel, Dünndarm, Colon, Milz, Thymus, Leukozyten, Pankreas und Placenta. In 9 der 12 Gewebe war das Pseudogen unterschiedlich stark exprimiert. Stärkste Expressionen zeigten Thymus, Milz und Leukozyten, eine mittlere Expression Lunge, Dünndarm und Colon, während Herz, Niere und Pankreas das Pseudogen nur sehr schwach exprimierten. In Gehirn, Skelettmuskel und Placenta konnte keine Expression detektiert werden. Die 2-Step-PCR (70 °C und 68 °C) erfolgte mit der *ReadyTaq*-Polymerase und den pseudogenspezifischen Primern *LRP5L*-MTN-1F und *LRP5L*-MTN-1R für ein PCR-Produkt von 581 bp. Zur Kontrolle des cDNA-Gewebeproben diente eine PCR für β -Aktin. Ein Aktin-PCR-Produkt mit 381 bp war in allen 12 cDNA-Gewebeproben nachweisbar.

In 9 der 12 Gewebe war das Pseudogen nachweisbar, wobei sich die Expression im Thymus, in der Milz und Leukozyten als am stärksten erwies. Die Expressionsstärke in Herz, Niere und Pankreas war dagegen sehr schwach. In Lunge, Dünndarm und Colon wies das Pseudogen eine mittlere Expressionsstärke auf. Eine Expression des Pseudogens wurde im Gehirn, Skelettmuskel oder in der Placenta nicht detektiert. Es wurde ausschließlich das Pseudogen amplifiziert. Eine Amplifikation von *LRP5* konnte aufgrund der Größe des PCR-Produktes ausgeschlossen werden. Zur Kontrolle der jeweiligen cDNA wurde eine PCR mit Primern für β -Aktin durchgeführt. Das entsprechende PCR-Produkt war 381 bp groß und war in allen 12 cDNA-Gewebeproben (wenn auch unterschiedlich stark) nachweisbar.

3.4.2.2 Northernblot-Analyse von *LRP5L*

Eine weitere Möglichkeit der Expressionsanalyse des *LRP5L*-Pseudogens in verschiedenen Geweben besteht in der Northernblot-Analyse. Dazu wurde ein *Human 12-Lane MTNTM Blot* verwendet, auf dem RNA aus den Geweben Gehirn, Herz, Skelettmuskel, Colon, Thymus, Milz, Niere, Leber, Dünndarm, Plazenta, Lunge und Leukozyten enthalten war. Eine zweite Northernblot-Membran (*RNA Blot*; mN3) enthielt RNA aus Gehirn, Uterus, Niere, Placenta, Milz und Lunge. Die zur Hybridisierung verwendete *LRP5L*-Sonde von 581 bp wurde mit dem Primerpaar *LRP5L*-MTN-1F und *LRP5L*-MTN-1R aus *Human Universal cDNA* amplifiziert. Diese war pseudogenspezifisch und wurde durch Sequenzierung verifiziert (Abb.3.34).

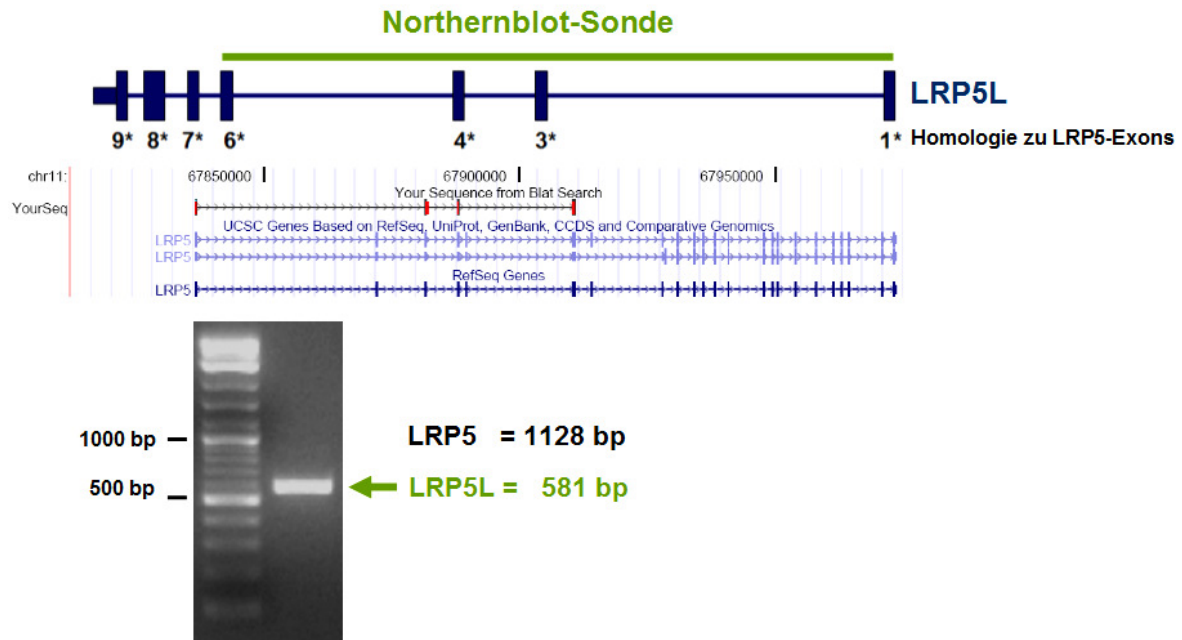


Abb. 3.34: Schematische Darstellung der *LRP5L*-Northernblot-Sonde (oben). Sie umfasste 581 bp und war pseudogenspezifisch, da sie Exon 2 und Exon 5 von *LRP5*, zu denen das Pseudogen keine Homologie aufwies, überspannte (mitte). Eine Amplifikation von *LRP5* hätte ein größeres PCR-Produkt von 1128 bp ergeben. Die Amplifikation und Sequenzierung des 581 bp großen PCR-Produktes bestätigte, dass es sich bei dem Amplimer um *LRP5L* handelte (unten links).

Die Rekonstruktion der kompletten *LRP5L*-cDNA ergab, dass bei der Northernblot-Analyse für das Pseudogen Signale bei etwa 1,7 kb zu erwarten waren. Sowohl bei der Northernblot-Analyse mit RNA aus 12 verschiedenen Geweben (Clontech) als auch bei der mit RNA aus sechs humanen Geweben (Biochain) war kein *LRP5L*-Transkript nachweisbar (Abb. 3.35 und 3.36, links). Die Filme wurden zwei bzw. acht Tage exponiert, um selbst eine schwache Expression detektieren zu können. Zur Kontrolle der RNA-Gewebeproben auf den beiden Northernblots wurde eine zweite Hybridisierung mit einer Aktin-Sonde (381 bp) bzw. einer *LRP5*-Sonde (500 bp) durchgeführt. Ein Aktin-Signal war bei ca. 2 kb zu erwarten und auch nahezu in allen 12 RNA-Spuren nachweisbar (Abb. 3.35, rechts). Die erwartete Transkript-Größe von *LRP5* betrug ca. 5,5 kb. Auch diese war auf dem Blot mit sechs verschiedenen RNA-Gewebeproben unterschiedlich stark detektierbar (Abb. 3.36, rechts). Das Expressionsmuster entsprach dem in der Literatur beschriebenen [Kim *et al.*, 1998; Hey *et al.*, 1998]. Die Filme wurden jeweils zwei Tage exponiert.

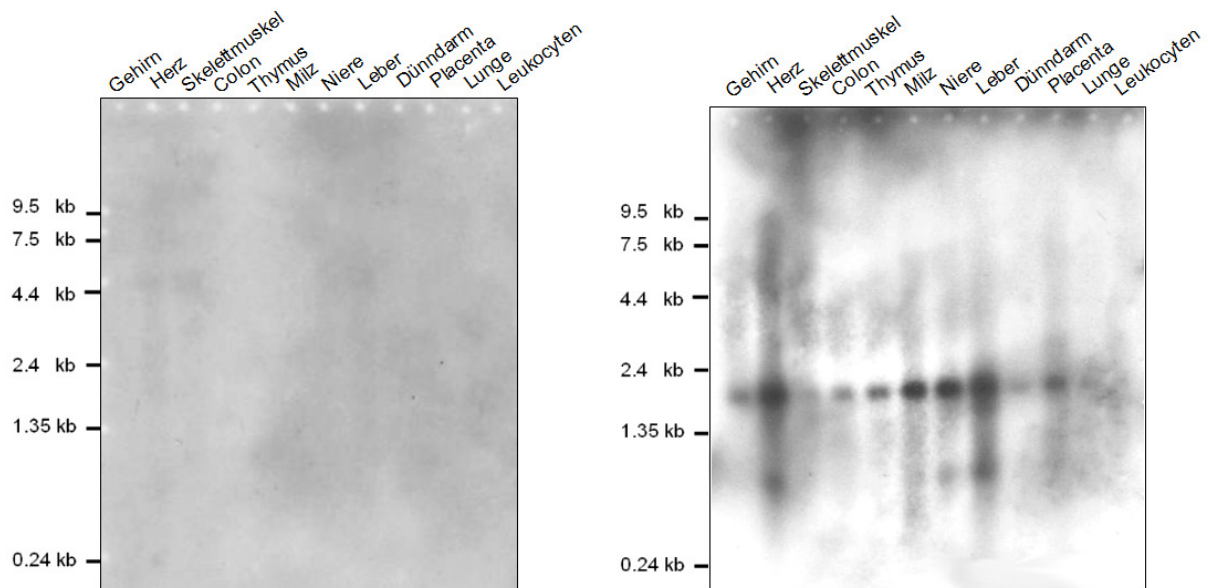


Abb. 3.35: Links: Northernblot-Analyse von *LRP5L* anhand des *Human 12-Lane MTNTM Blots* mit RNA aus den 12 verschiedenen humanen Geweben (Gehirn Gehirn, Herz, Skelettmuskel, Colon, Thymus, Milz, Niere, Leber, Dünndarm, Placenta, Lunge und Leukozyten) und einer 581 bp großen pseudogenspezifischen Hybridisierungssonde. Ein für *LRP5L* erwartetes spezifisches Expressionssignal bei 1,7 kb war nicht nachweisbar. **Rechts:** Eine Hybridisierung des gleichen Northernblots mit einer Aktin-Sonde zur Kontrolle der RNA-Gewebeproben ergab bei 2 kb ein für Aktin erwartetes Signal in nahezu allen 12 Gewebeproben.

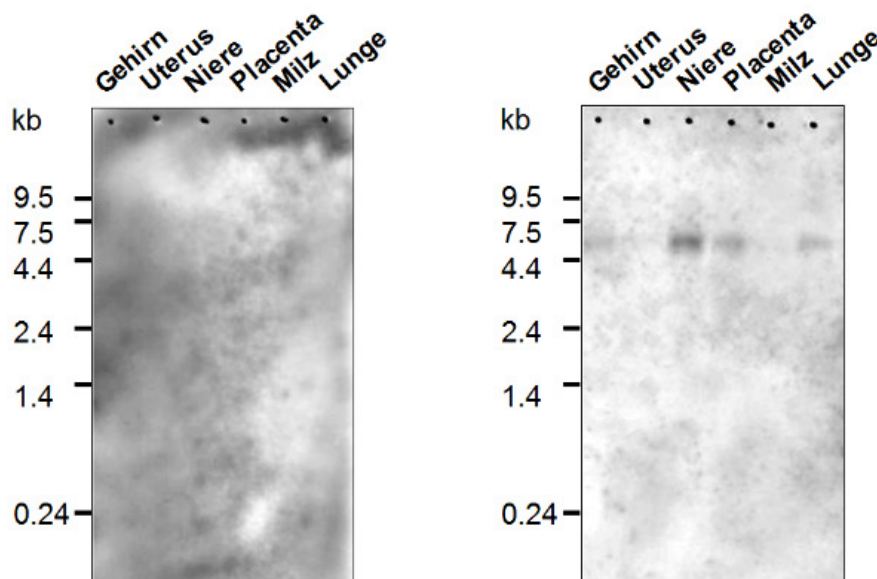


Abb. 3.36: Links: Northernblot-Analyse von *LRP5L* anhand des *mN3 RNA Blots* mit RNA aus Gehirn, Uterus, Niere, Placenta, Milz und Lunge und einer 581 bp großen pseudogenspezifischen Hybridisierungssonde. Ein für *LRP5L* erwartetes spezifisches Expressionssignal bei 1,7 kb war hier nicht detektierbar. **Rechts:** Eine Hybridisierung des gleichen Northernblots mit einer *LRP5*-Sonde zur Kontrolle der RNA-Gewebeproben ergab bei ca. 5,5 kb ein für Aktin erwartetes Signal in vier von sechs Gewebeproben. Das Expressionsmuster entsprach dem bereits in der Literatur beschriebenen [Kim *et al.*, 1998; Hey *et al.*, 1998].

3.4.3 Klonierung von *LRP5L* in einen Expressionsvektor

Nach Aufklärung der *LRP5L*-Pseudogen-Struktur sollte untersucht werden, ob *LRP5L* *in vitro* eine regulatorische Funktion auf *LRP5* ausüben kann. Diese könnte, je nach Orientierung des Transkriptes, *sense*- oder *antisense*-vermittelt sein. Es wurden drei *LRP5L*-Expressionskonstrukte generiert, die zur funktionellen Analyse des Pseudogens eingesetzt wurden. Die Klonierung der kompletten cDNA von *LRP5L* in *sense* und *antisense* sowie des größten *Open Reading Frames* erfolgte anhand der TA-Klonierung mittels des *pcDNA3.1 TOPO[®] TA Expression Kits* in den *pcDNA3.1/V5-His-TOPO*-Vektor.

Die Amplifikation der *Inserts* erfolgte mit den Primern *LRP5L-RACE-1F* und *LRP5L-KI-1R* für die komplette 1740 bp große *LRP5L*-cDNA (*Full-length*) bzw. *LRP5L-KI-5Fb* und *LRP5L-KI-5R* für den größten *Open Reading Frame (ORF)* von 756 bp (Abb. 3.31 und Abb. 3.37).

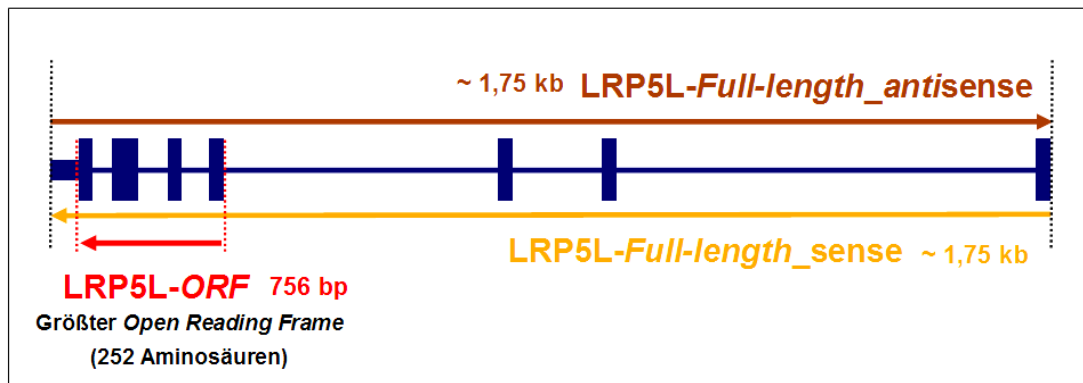


Abb. 3.37: Schematische Darstellung der amplifizierten *LRP5L*-Inserts zur Generierung von *LRP5L*-Expressionskonstrukten. Es wurde je ein Konstrukt mit der kompletten *LRP5L*-cDNA in *sense* und *antisense* (*Full-length*) sowie mit dem größten *Open Reading Frame (ORF)* generiert. Die Orientierung dieser Konstrukte ist jeweils durch einen Pfeil angegeben.

3.4.4 Geeignete Zelllinie für funktionelle Analysen

Zur Analyse einer möglichen regulatorischen Funktion des Pseudogens auf *LRP5* wurde nach einer geeigneten Zelllinie gesucht, die *LRP5* und folglich vermutlich auch *LRP5L* endogen stark exprimiert. Da *LRP5*-Mutationen unter anderem das Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndrom oder *High Bone Mass* verursachen, lag die Annahme nahe, dass *LRP5* stark in Knochenzellen exprimiert sei.

Anhand eines Westernblots mit einem *LRP5*-Antikörper wurde die Expression des endogenen *LRP5*-Proteins in zwei Osteosarkomzelllinien (SaOS und HOS) und Hek293T-Zellen analysiert.

In allen drei Zelllinien konnte endogenes *LRP5* nachgewiesen werden. Allerdings zeigte sich in den Hek293T-Zellen die stärkste Protein-Expression (Abb. 3.38). In Anbetracht dieser Erkenntnis und der Tatsache, dass in Testversuchen die Transfektionseffizienz der Osteosarkomzellen deutlich unter der von Hek293T-Zellen lag, wurde für alle weiteren Versuche letztere verwendet.

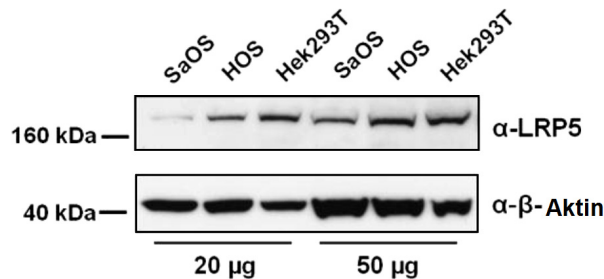


Abb. 3.38: Westernblot zur Analyse des endogenen *LRP5*-Proteins in den Osteosarkomzellen SaOs und HOS sowie in Hek293T-Zellen. Dazu wurden 20 µg bzw. 50 µg der jeweiligen Zell-Lysate eingesetzt. Die Immunodetektion erfolgte mit einem *LRP5*-Antikörper (Calbiochem).

3.4.5 Luciferase Reporter Assay zur Analyse des *LRP5L*-Pseudogens

Zur Untersuchung eines möglichen Effektes des *LRP5L*-Pseudogens auf den LRP5-Rezeptor in Form einer Veränderung der LRP5-Signaltransduktion über den *WNT/NDP-Pathway* wurde der *Luciferase-Reporter Assays* durchgeführt (Kapitel 2.29). Dies erfolgte in zwei Versuchsansätzen. Zur Analyse eines Effektes des Pseudogens auf den endogenen LRP5-Rezeptor wurden Hek293T-Zellen und die Expressionskonstrukte *LRP5L-full-length_sense*, *LRP5L-full-length_antisense* bzw. *LRP5L-ORF* mit Expressionsvektoren für *Norrin (NDP)*, *Frizzled-4 (FZD4)*, *Mesoderm development candidate 2 (MESDC2)*, die *Firefly*- und die *Renilla-Luciferase* co-transfiziert. Als Kontrolle dienten Versuchsansätze mit dem pcDNA3.1-Leervektor und *LRP5-WT_{9L}*-Expressionsvektor. Diese wurden jeweils mit und ohne *NDP*- und *FZD4*-Konstrukte (zur Aktivierung der Signaltransduktion) transfiziert. Durch den zweiten Versuchsansatz, bei dem die drei *LRP5L*-Konstrukte jeweils zusätzlich mit *LRP5-WT_{9L}* co-transfiziert wurden, sollte eine mögliche Regulation des überexprimierten LRP5-Rezeptors durch das jeweilige Pseudogen-Konstrukt untersucht werden. Die Luciferase-Aktivität der jeweiligen Proben wurden nach Zell-Lyse mittels des *Dual-Luciferase[®] Reporter Assay System Kits* (Promega) am Luminometer gemessen. Die gemessenen Werte wurden mit Hilfe von Excel ausgewertet und graphisch dargestellt. Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen aus fünf unabhängigen Experimenten wurde in Form der Diagramme in den Abbildungen 3.39 und 3.40 wiedergegeben. Hierbei wurde jedes *LRP5*- bzw. *LRP5L*- und Kontroll-Konstrukt sowie jede Kombination aus *LRP5*- und *LRP5L*-Konstrukt in drei Ansätzen transfiziert und gemessen. Eine Westernblot-Analyse

der Zell-Lysate zur Kontrolle der aufgetragenen Proteinmengen ist jeweils rechts von den Diagrammen abgebildet. Die beiden *LRP5L-full-length*-Konstrukte konnten im Immunoblot nicht detektiert werden, da diese kein Antikörper-Epitop exprimierten. Insgesamt war in beiden Versuchsansätzen kein Effekt des Pseudogens auf die Signaltransduktion von LRP5 zu beobachten. Im ersten Versuchsansatz (Abb. 3.39) zeigten die Luciferase-Aktivitäten der beiden *LRP5L-full-length*-Probenansätze keinen Unterschied zum Leervektor auf; weder eine erhöhte noch eine geringere Aktivität war zu messen. *LRP5L-ORF* wies eine minimale Aktivität auf. Auch im zweiten Versuchsansatz (Abb. 3.40) war keine Veränderung der Luciferase-Aktivität messbar. Die Pseudogenproben-Ansätze mit co-transfiziertem *LRP5-WT_{9L}*-Konstrukt wiesen zum Kontrollansatz des *LRP5-WT_{9L}*-Expressionsvektors ohne Pseudogen-Expressionsvektor keinen Unterschied auf.

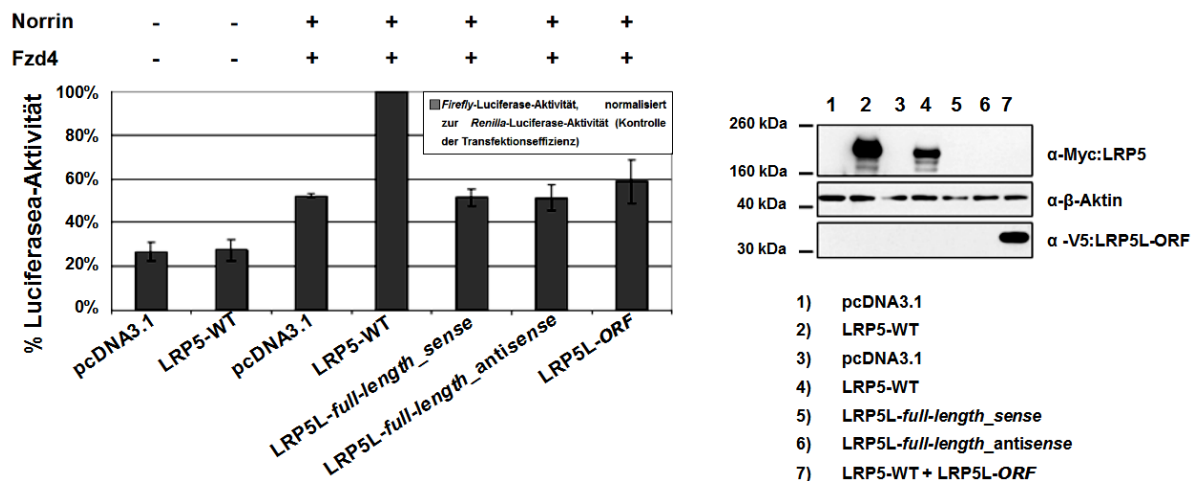


Abb. 3.39: Links: Diagramm der relativen Luciferase-Aktivität (Mittelwerte und Standardabweichung) der Versuchsansätze mit Leervektor und Expressionsvektoren *LRP5-WT_{9L}*, *LRP5L-Full-length_sense*, *LRP5L-Full-length_antisense* und *LRP5L-ORF* im *Luciferase Reporter Assay*. Die gemessenen Werte der *Firefly*-Luciferase-Aktivitäten wurden jeweils mit der entsprechenden *Renilla*-Luciferase-Aktivität normalisiert. Das Experiment erfolgte in fünf unabhängigen Experimenten, in denen jedes *LRP5*-, *LRP5L*- und Kontroll-Konstrukt in drei Ansätzen transfiziert und gemessen wurde. Die Versuchsansätze mit den Pseudogen-Expressionsvektoren zeigten keinen Unterschied zu denen des (mit den Expressionsvektoren *NDP* und *FZD4* co-transfizierten) Leervektors. Der *WT_{9L}*-Ansatz selbst wies erwartungsgemäß eine hohe Aktivität auf und diente als Positiv-Kontrolle für eine normale Signaltransduktion **Rechts:** Repräsentativer Westernblot der Zell-Lysate der transient transfizierten HEK293T-Zellen, welche im *Dual-Luciferase Reporter Assay* eingesetzt wurden. Der Blot bestätigt, dass sowohl *WT_{9L}* als auch *LRP5L-ORF* exprimiert wurden. Die beiden *LRP5L-full-length*-Konstrukte konnten im Immunoblot nicht detektiert werden, da diese kein Antikörper-Epitop exprimierten.

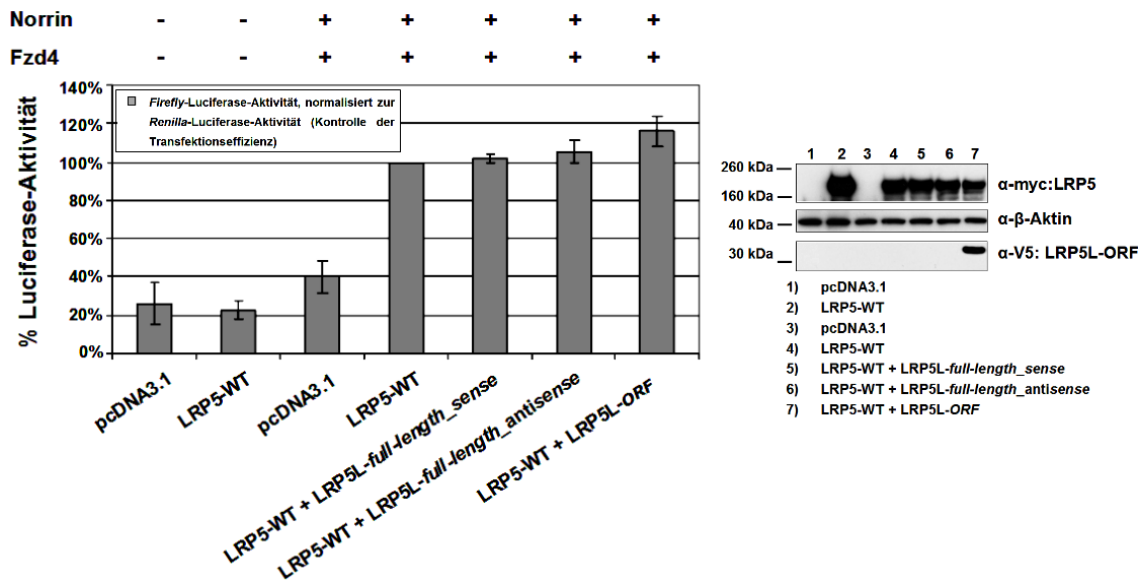


Abb. 3.40: Links: Diagramm der relativen Luciferase-Aktivität der Versuchsansätze mit dem Leervektor, dem *LRP5*-WT_{9L}-Expressionsvektor sowie den jeweils mit dem *LRP5*-WT_{9L}-Expressionsvektor co-transfizierten Pseudogen-Expressionskonstrukten *LRP5L*-Full-length_sense, *LRP5L*-Full-length_antisense und *LRP5L*-ORF im *Luciferase Reporter Assay*. Die gemessenen Werte wurden jeweils mit der entsprechenden *Renilla*-Luciferase-Aktivität normalisiert. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung aus fünf Experimenten in drei unabhängigen Transfektionen jedes Probenansatzes. Ansätze, die den mit dem *LRP5*-WT_{9L}-Expressionsvektor co-transfizierten Pseudogen-Expressionsvektor enthielten, zeigten keinen Unterschied der Luciferase-Aktivität zu den Ansätzen, in denen der *LRP5*-WT_{9L}-Expressionsvektor allein transfiziert worden war. Die Aktivität des Ansatzes mit *LRP5*-WT_{9L} war erwartungsgemäß hoch. Dieser Ansatz diente als Positiv-Kontrolle für eine normale Signaltransduktion **Rechts:** Repräsentativer Westernblot der Zell-Lysate der transient transfizierten HEK293T-Zellen, welche im *Dual-Luciferase Reporter Assay* eingesetzt wurden. Der Blot bestätigt, dass sowohl WT_{9L} als auch *LRP5L*-ORF exprimiert wurden. Die beiden *LRP5L*-full-length-Konstrukte konnten im Immunoblot nicht detektiert werden, da diese kein Antikörper-Epitop exprimierten.

3.4.6 RNA-Interferenz-Analysen zum *LRP5L*-Pseudogen

Der RNA-Interferenz-Mechanismus des posttranskriptionellen *Gene Silencing* wurde Ende der 90er-Jahre erstmalig für den Fadenwurm *C. elegans* beschrieben [Fire *et al.*, 1998]. RNA-Interferenz (RNAi) ist ein natürlicher und komplexer molekularbiologischer Mechanismus, durch den Gene durch gezieltes Abschalten reguliert werden. Mit Hilfe der RNAi-Methode lassen sich experimentell hochwirksam und schnell einzelne Gene zielgenau abschalten und die Auswirkung dessen analysieren. Das Prinzip beruht darauf, dass RNA, die künstlich in die Zelle eingebracht wird oder aus einem viralen Angriff stammt, von dem Enzymkomplex Dicer in siRNA zerlegt wird. Ein weiteres Enzym bildet mit einem Strang dieser zerlegten siRNA von 21 bis 23 Basenpaaren den sogenannten Risc-Komplex. Dieser bindet an den komplementären Abschnitt der Ziel-mRNA und baut diese ab.

3.4.6.1 RNAi-Analyse des *LRP5L*-Knock downs auf das endogene *LRP5*-Gen

Als weitere experimentelle Herangehensweise zur Analyse eines möglichen regulatorischen Effektes von *LRP5L* auf *LRP5* wurde Pseudogen-siRNA in eine endogen *LRP5* und *LRP5L* exprimierende Zelllinie (Kapitel 3.4.4) transfiziert und anschließend mittels quantitativer *Real-Time*-PCR die Auswirkung auf die endogene Expressionsstärke von *LRP5* analysiert.

Hier galt es insbesondere, genspezifische siRNA für das *LRP5L*-Pseudogen und genspezifische Primer für *LRP5* zu wählen. Die pseudogenspezifische siRNA bestand aus 21 Nukleotiden, die keinerlei Homologie zu *LRP5* hatten. Die für die RT-PCR verwendeten Primer-Sequenzen (*LRP5*-siRNA-F und *LRP5*-siRNA-R) befanden sich in Exon 12 von *LRP5*, zu denen das Pseudogen keinerlei Homologie aufweist. Die verwendeten siRNA-Sequenzen und Primer sind im Anhang in Tabelle 7.9 aufgeführt. Nach jedem quantitativen RT-PCR-Lauf wurde außerdem eine Schmelzkurven-Analyse durchgeführt (Kapitel 2.17; Abb. 7.3 im Anhang).

Hek293T-Zellen wurden mit *LRP5L*-siRNA transient transfiziert. Zur Kontrolle wurden Hek293T-Zellen ohne siRNA und mit *LRP5*-spezifischer siRNA behandelt. Nach einer Inkubation von 48 Stunden wurden die Zellen lysiert und die RNA aus den Zellen anhand des *RNeasy Mini* Kits isoliert. Die RNA-Konzentrationen der Proben wurden sehr akkurat mit Hilfe des Nanodrops ND-100 in Mehrfachbestimmungen ermittelt und jeweils 10 ng für die quantitative *Real-Time*-PCR eingesetzt (Kapitel 2.17). Die Ct-Werte wurden anhand eines Fluorimeters des *Real-Time PCR Systems 7500 (TaqMan)* gemessen und anschließend mit Hilfe von Excel ausgewertet. Das in Abbildungen 3.41 dargestellte Diagramm umfasst fünf unabhängige Experimente, in denen jede Probe in drei Ansätzen transfiziert und gemessen wurde. Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden schließlich prozentual auf die untransfizierte Kontrollprobe (ohne siRNA) bezogen.

Der *Knock down* des Pseudogens durch *LRP5L*-siRNA-Transfektion zeigte bezüglich der endogenen *LRP5*-Transkript-Expression keinen signifikanten Unterschied zum Kontrollansatz ohne siRNA. Durch die *LRP5*-siRNA-Transfektion selbst ließ sich eine erwartete deutliche Herunterregulation des endogenen *LRP5*-Transkriptes beobachten, womit bestätigt wurde, dass die hier verwendete *LRP5*-siRNA den gewünschten *Knock-down*-Effekt erfüllt.

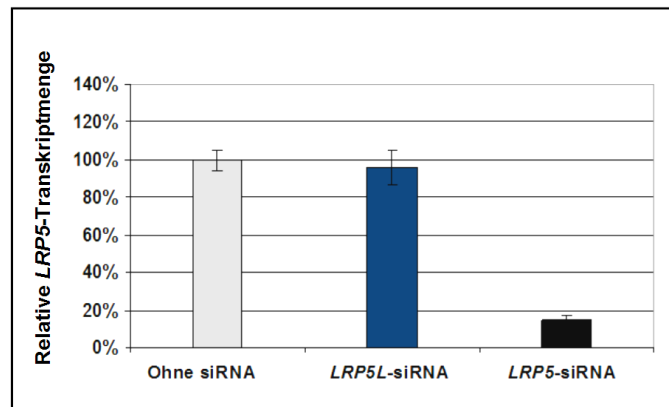


Abb. 3.41: Diagramm der relativen endogenen *LRP5*-Transkriptmenge nach Pseudogen-Herunterregulation und quantitativer *Real-Time*-PCR zur Ermittlung der endogenen Transkriptexpressionen von *LRP5*. Die quantitative RT-PCR erfolgte mit dem *Quantitect SYBR-Green Kit for One-step PCR* und den *LRP5*-spezifischen Primern *LRP5*-siRNA-F und *LRP5*-siRNA-R. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus insgesamt fünf unabhängigen Experimenten, in denen jede Probe in drei unabhängigen Ansätzen transfiziert und gemessen wurde. Als Kontrolle dienten untransfizierte Proben (ohne siRNA) und mit *LRP5*-siRNA transfizierte Proben. Es war keine signifikante Veränderung der endogenen Transkriptexpression von *LRP5* durch eine Herunterregulation des Pseudogens im Vergleich zur Kontrollprobe (ohne siRNA) nachweisbar. Die *LRP5*-siRNA-Transfektion regulierte *LRP5* selbst erwartungsgemäß stark herunter.

3.4.6.2 RNAi-Analyse des *LRP5*-Knock-downs auf das endogene Pseudogen

Mit der gleichen Strategie wie unter Kapitel 3.4.6.1 beschrieben wurde ein möglicher regulatorischer Effekt von *LRP5* auf das Pseudogen untersucht. Dazu wurden Hek293T-Zellen mit *LRP5*-siRNA transient transfiziert und anschließend mittels quantitativer *Real-Time*-PCR die Auswirkung auf die endogene Pseudogen-Expressionsstärke analysiert. Sowohl die *LRP5*-siRNA als auch die für die quantitative RT-PCR verwendeten *LRP5L*-Primer waren spezifisch. Für letztere erfolgte im Vorfeld eine Test-PCR mit den Primern *LRP5L*-siRNA-F und *LRP5L*-siRNA-R und *Universal human cDNA*. Die anschließende Sequenzierung des Amplifikates bestätigte, dass das PCR-Produkt pseudogenspezifisch war. Die *LRP5*-spezifische siRNA wurde so gewählt, dass diese in Exon 13 von *LRP5* lokalisiert war, wozu *LRP5L* keinerlei Homologie aufwies. Zur Kontrolle wurden Hek293T-Zellen ohne siRNA und mit *LRP5L*-siRNA behandelt.

Die relativen endogenen *LRP5L*-Transkriptionsmengen der mit *LRP5*-siRNA und Pseudogen-siRNA transfizierten Proben sowie der Kontrollprobe ohne siRNA sind in Abbildung 3.42 wiedergegeben. Das hier dargestellte Diagramm umfasst fünf unabhängige Experimente, in denen jede Probe in drei Ansätzen transfiziert und gemessen wurde. Die errechneten Mittelwerte und Standardabweichungen wurden schließlich prozentual auf die untransfizierte Kontrollprobe (ohne siRNA) bezogen.

Eine *LRP5*-Herunterregulation bewirkte keine signifikante Veränderung der Expression des endogenen Pseudogen-Transkriptes im Vergleich zur Kontrollprobe ohne siRNA. Endogenes *LRP5L* wurde durch die *LRP5L*-siRNA-Transfektion allenfalls geringfügig herunterreguliert.

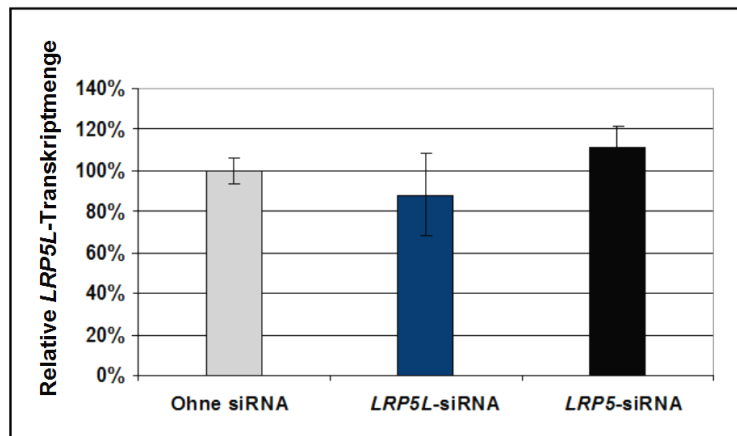


Abb. 3.42: Diagramm der relativen endogenen Pseudogen-Transkriptmenge nach *LRP5*-Herunterregulation und quantitativer *Real-Time*-PCR zur Ermittlung der endogenen Transkriptexpressionen des Pseudogens *LRP5L*. Die quantitative RT-PCR erfolgte mit dem *Quantitect SYBR-Green Kit for One-step PCR* und den pseudogenspezifischen Primern *LRP5L-siRNA-F* und *LRP5L-siRNA-R*. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichungen aus insgesamt fünf unabhängigen Experimenten, in denen jede Probe in drei unabhängigen Ansätzen transfiziert und gemessen wurde. Als Kontrollen dienten untransfizierte Proben (ohne siRNA) und Pseudogen-siRNA-transfizierte Proben. Es waren keine Veränderungen der endogenen Pseudogen-Transkriptexpression durch eine Herunterregulation von *LRP5* im Vergleich zur Kontrollprobe ohne siRNA nachweisbar. Die *LRP5L*-siRNA-Transfektion bewirkte eine geringfügige Herunterregulation des Pseudogens.

Zur Überprüfung, ob die verwendete *LRP5L*-siRNA prinzipiell in der Lage ist, *LRP5L*-RNA herunterzuregulieren, wurde ein experimenteller Ansatz gewählt, bei dem *LRP5L* durch Transfektion entsprechender Expressionskonstrukte überexprimiert wurde. Die Ergebnisse des in Abbildung 3.43 dargestellten Diagramms bestätigten, dass die *LRP5L*-Transkriptmenge durch die *LRP5L*-siRNA-Transfektion reduziert wurde. Dies galt allerdings nur für die exogen überexprimierte *Sense*-Pseudogen-cDNA (*LRP5L-Full-length_sense* und *LRP5L-ORF*). Eine Herunterregulierung der *antisense-LRP5L*-cDNA bewirkte die *LRP5L*-siRNA erwartungsgemäß nicht. Auch die Transkriptmenge des endogen exprimierten Pseudogens ließ sich wie bereits in Abbildung 3.42 wiedergegeben durch die *LRP5L*-siRNA nicht bzw. nur minimal herunterregulieren, was womöglich auf die geringe Expression des endogenen Pseudogens an sich zurückzuführen ist (Kapitel 3.4.6.3).

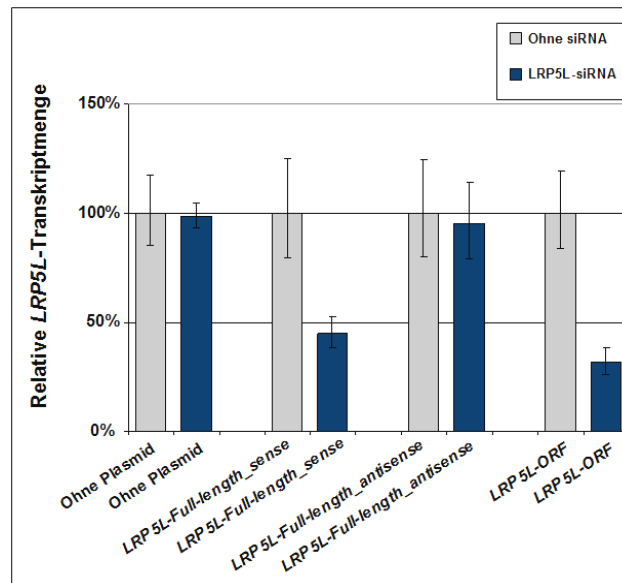


Abb. 3.43: Diagramm nach quantitativer RT-PCR zur Kontrolle des *LRP5L*-knock-downs durch die eingesetzte *LRP5L*-siRNA. Dargestellt ist ein Experiment, in dem jede Probe in drei Ansätzen transfiziert und gemessen wurde. Die Transkriptmenge von exogen überexprimiertem *LRP5L* in sense-Orientierung wird erwartungsgemäß durch ein *LRP5L*-Knock-down deutlich reduziert. Die eingesetzte *LRP5L*-siRNA bewirkte allerdings keine nachweisbare Herunterregulation des endogenen Pseudogens, aber erwartungsgemäß der *antisense-LRP5L*-cDNA. Nicht erkennbar ist bei der gewählten Darstellung, dass die absolute *LRP5L*-Transkriptmenge in den Ansätzen mit exogen zugeführtem *LRP5L* etwa um den Faktor 1000 erhöht ist.

3.4.6.3 Vergleich der endogenen Transkriptexpression von *LRP5L* und *LRP5*

Ein Vergleich der endogenen Pseudogen-Transkriptexpression mit der endogenen *LRP5*-Transkriptexpression aus den in Kapitel 3.4.6.1 und 3.4.6.2 durchgeführten Experimenten zeigte, dass *LRP5L* im Gegensatz zu *LRP5* sehr schwach exprimiert ist. Die endogene Transkriptmenge ohne jegliche Herunterregulierung durch siRNA wies eine um 80% geringere Expressionsstärke des Pseudogens im Vergleich zu *LRP5* auf (Abb 3.44).

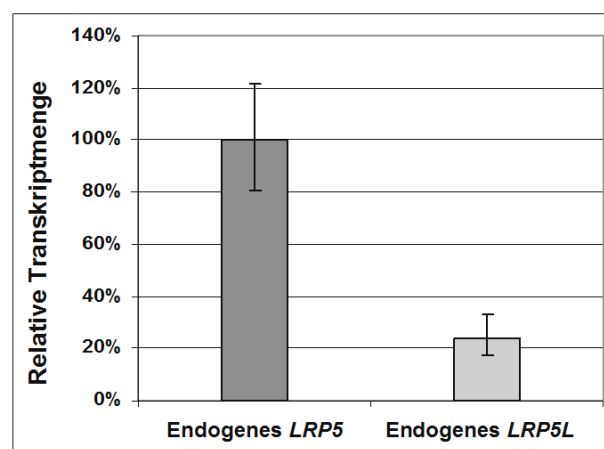


Abb. 3.44: Vergleich der endogenen Transkriptmengen von *LRP5* und *LRP5L*. *LRP5* wies eine 80% stärkere Expression auf als das *LRP5L*-Pseudogen.

4 DISKUSSION

4.1 Familie #1

4.1.1 Identifikation von zwei neuartigen Mutationstypen in *LRP5* bei einem uncharakteristischen Krankheitsbild

Ausgehend von einer genomweiten Kopplungsanalyse sollte das verantwortliche Gen für ein in einer türkischen Familie diagnostiziertes Fehlbildungssyndrom, welches durch Augenfehlbildungen, eine schwere Muskelhypotonie und eine milde mentale Retardierung gekennzeichnet war, identifiziert werden. Datenbank-Analysen der vier durch die Kopplungsanalyse identifizierten Loci ergaben, dass sich im gekoppelten Intervall auf Chromosom 11q12.1-13.5 mehrere funktionelle Kandidatengene befanden, die in den WNT/NDP-Signaltransduktionsweg involviert sind. Aufgrund der phänotypischen Überlappung des Fehlbildungssyndroms in der türkischen Familie - insbesondere der ophthalmologischen Befunde - mit dem Norrie-Syndrom (ND), dem Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndrom (OPPG) sowie der Familiären Exsudativen Vitreoretinopathie (FEVR), welche alle auf eine gestörte WNT/NDP-Signaltransduktion bei der Vaskularisierung des Auges zurückzuführen sind [Xu *et al.*, 2004], fokussierte sich die Analyse primär auf Kandidatengene aus dieser Signalkaskade.

Durch die bei den Betroffenen erst nach der Kopplungsanalyse diagnostizierte Osteoporose und unter Berücksichtigung der Augenfehlbildungen ließ sich der Phänotyp dieser Familie am ehesten dem erweiterten Spektrum des Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndroms zuordnen. Aus diesem Grunde war das in der gekoppelten Region auf Chromosom 11q12.1-13.5 lokalisierte *LRP5*-Gen ein besonders aussichtsreiches Kandidatengen, da Mutationen dieses WNT/NDP-Co-Rezeptors unter anderem für OPPG und FEVR verantwortlich sind. Durch direkte Sequenzierung aller 23 kodierenden Exons von *LRP5* wurden in dieser türkischen Familie zwei bislang in der Literatur noch nicht beschriebene und neuartige *LRP5*-Mutationen identifiziert. Es wurde zum einen erstmalig eine Deletion im Poly-Leucin-*Stretch* des *LRP5*-Signalpeptides detektiert, die möglicherweise pathophysiologisch bedeutend sein könnte (s.u.). Und zum anderen wurde erstmals eine größere genomische Deletion in *LRP5* nachgewiesen (s.u.). Für diese Veränderungen sind ausschließlich die drei betroffenen Familienmitglieder *compound*-heterozygot. Eine Mutation wurde jeweils paternal und die andere maternal an die betroffenen Kinder vererbt, so dass eine perfekte co-Segregation der Mutationen mit dem Phänotyp vorlag. Die initial in Betracht gezogene Hypothese einer homozygoten *Founder*-Mutation als Ursache des Fehlbildungssyndroms war demnach hinfällig und die Konsanguinität innerhalb der Familie ist somit nachträglich als unbedeutend für die Erkrankung einzuschätzen. Dies ist allerdings aufgrund der eher weitläufigen Verwandtschaft nicht erstaunlich, da rezessive Erkrankungen in konsanguinen Familien nicht

in jedem Fall durch homozygote Mutationen verursacht werden müssen [Bolz *et al.*, 2001; Shahin *et al.*, 2002]. Beispiele hierfür sind z. B. das Usher-Syndrom-Typ1 D (MIM # 601067), die Sichelzellanämie (MIM # 603903), das Tay-Sachs-Syndrom (MIM # 272800) oder die Phenylketonurie (MIM # 261600), in denen sich häufig *compound*-heterozygote Mutationen finden [Bolz *et al.*, 2001; Ohno und Suzuki, 1988; Anderson *et al.*, 1966; Witkowska *et al.*, 1991].

Eine der beiden neu identifizierten Mutationen ist eine 18 bp-Deletion (p.Leu15_Leu20del; Mut_{3L}) innerhalb eines CTG-*Repeats* im ersten kodierenden Exon von *LRP5*. Diese Veränderung war in 176 türkischen und 262 deutschen Kontroll-Individuen nicht nachweisbar. Der CTG-*Repeat* ist im Signalpeptid des Transmembranrezeptors lokalisiert und kodiert für 9 Leucine. Durch die Mutation wurden 6 dieser 9 Leucine deletiert, so dass lediglich 3 Leucine im Signalpeptid des mutierten Altes vorlagen. *In silico*-Analysen prädizierten für diese Mutation eine gestörte Funktion bzw. verminderte Effizienz des Signalpeptids, wodurch zunächst rein bioinformatisch ein Effekt auf den intrazellulären Transport der reifenden Polypeptid-Kette in das Endoplasmatische Reticulum postuliert werden konnte.

Die zweite Mutation ist eine intragenische Deletion zwischen Intron 13 und Intron 16, welche in 100 türkischen und 186 deutschen Kontroll-Individuen nicht nachweisbar war. Die Analyse der Bruchpunkte ergab eine *AluY*-vermittelte Rekombination zwischen Intron 13 und Intron 16, wodurch 8,2 kb der genomischen *LRP5*-Sequenz deletiert waren. Auf mRNA-Ebene führte dies zu einer Deletion von Exon 14 bis Exon 16 (Ex14_Ex16del) mit Verschiebung des Leserasters und einem daraus resultierenden präterminalen Stop in Exon 17. Dadurch war das Protein ab der vierten β -Propeller-YWTD-Domäne trunkiert, so dass die intrazelluläre Domäne komplett fehlte. RNA-Analysen ergaben, dass diese Mutation keinem *nonsense-mediated mRNA decay* unterlag. Tamai *et al.* zeigten, dass der LRP6-Rezeptor komplett inaktiv und funktionslos ist, wenn dessen intrazelluläre Domäne fehlt [Tamai *et al.*, 2000; He *et al.*, 2000]. LRP6 ist 70% homolog zu LRP5 und ebenfalls als Co-Rezeptor in der Signaltransduktion der WNT-Signalkaskade involviert (Kapitel 1.8). Somit wird auch für die hier identifizierte, trunkierende LRP5-Rezeptor-Mutation aufgrund der fehlenden intrazellulären und insbesondere der Transmembran- und Ligand-bindenden LDLR-Domänen ein kompletter Funktionsverlust postuliert.

4.1.2 Pathomechanismus der beiden neu identifizierten Mutationen

Anhand des *Luciferase Reporter Assays* für eine LRP5-abhängige Signaltransduktion entlang des WNT/NDP-Signaltransduktionsweges wurde *in vitro* ein Funktionsverlust beider mutierten LRP5-Rezeptoren nachgewiesen. Sowohl der LRP5-Rezeptor mit der Signalpeptid-Mutation (Mut_{3L}) als auch mit der Ex14_16-Deletion waren im Gegensatz zum

Wildtyp-Rezeptor nicht in der Lage, Signale der WNT/NDP-Signalkaskade zu transduzieren. Die Westernblot-Analysen der transfizierten Zell-Lysate zeigten allerdings, dass beide Mutationen zumindest *in vitro* ein stabiles Protein exprimierten. Eine naheliegende Hypothese zum Pathomechanismus beider mutierten LRP5-Transmembranrezeptoren war somit, dass diese mutierten Proteine zwar exprimiert wurden, jedoch einem aberranten intrazellulären Transport unterlagen und nicht in die Plasmamembran gelangen konnten, um als Co-Rezeptor Signale entlang der WNT/NDP-Signaltransduktionskaskade zu transduzieren. Diese Hypothese konnte für das Ex14_16del-Protein mit Hilfe des *Secretion Assays* verifiziert werden. Ursächlich für den Funktionsverlust war insofern offenbar die Tatsache, dass dem trunkierten Protein die Transmembran-Domäne als auch die Ligand-bindende LDLR-Domäne fehlte. Darüber hinaus lag vermutlich eine gestörte Proteinfaltung vor [Toomes *et al.*, 2004; Bieri *et al.*, 1995; Fass *et al.*, 1997]. Dem gegenüber lag dem Funktionsverlust des mutierten LRP5-Mut_{3L}-Proteins wahrscheinlich ein gestörtes Signalpeptid zugrunde. Es wurde anhand dreier unabhängiger *in vitro*-Analysen (N-Glykosylierung, subzelluläre Fraktionierung und *Secretion Assay*) experimentell nachgewiesen, dass das mutierte Signalpeptid (Mut_{3L}) offenbar nicht mehr vom *Signal Recognition Particle* (SRP) erkannt wurde. Dadurch konnte das Protein nicht in das Endoplasmatische Reticulum transportiert, posttranslational modifiziert und cotranslational in die ER- und Plasmamembran eingebaut werden. Stattdessen war das mutierte Protein in diesen Assays fehllokalisiert. Es verblieb ausschließlich im Cytoplasma, wodurch es keine Signale entlang des WNT/NDP-Signaltransduktionsweges weiterleiten konnte.

Anhand dieser Ergebnisse wurde erstmals demonstriert, dass deutliche Verkürzungen im Leucin-*Stretch* des LRP5-Signalpeptids eine pathophysiologische Relevanz aufweisen können. Signalpeptid-Mutationen, die zu einer gestörten Signalpeptid-Funktion oder Prozessierung führen und folglich mit einem Funktionsverlust oder einer Fehlfunktion des entsprechenden Proteins einhergehen sind bereits bei anderen humanen Erkrankungen beschrieben. Beispielweise sind Mutationen, die die Signalpeptid-Abspaltung des RANK-Rezeptors beeinträchtigen, für die Familiäre Expansile Osteolyse (MIM # 174810) verantwortlich. Diese Erkrankung ist durch schmerzhafte Knochenverformungen aufgrund einer erhöhten Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität gekennzeichnet. Hughes *et al.* identifizierten bei Betroffenen Insertionsmutationen im Signalpeptid des *RANK*-Gens und zeigten, dass diese Mutationen zu einer gestörten Abspaltung des Signalpeptides und einer Akkumulation des RANK-Proteins in der Zelle führten, und dies vermutlich eine gesteigerte Osteoklastenaktivierung auslöste [Hughes *et al.*, 2000]. Die autosomal-dominante Pankreatitis (MIM # 167800) ist mit Mutationen assoziiert, die den hydrophoben Kern des *SPINK1*-Signalpeptids unterbrechen und den Transport in das ER dieses sezernierten Trypsin-Inhibitors stört [Kiraly *et al.*, 2007]. Somit erschließt sich aus den genannten

Beispielen und den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen zur LRP5-Signalpeptid-Mutante, dass Mutationen innerhalb von Signalpeptiden zu einem Funktionsverlust des Signalpeptides und folglich auch des mutierten Proteins führen können. Insbesondere repetitive DNA-Sequenzen wie der im Rahmen dieser Arbeit untersuchte CTG-Repeat des LRP5-Signalpeptides sind relativ instabil und weisen dadurch eine erhöhte Mutationsrate auf [Toft *et al.*, 1998]. Dabei kommt es zu Triplet-Deletionen oder -Insertionen, die oftmals durch eine verschobene Fehlpaarung der DNA-Stränge (*Mismatch*) und einem daraus resultierenden ungleichen *Crossing-Over* entstehen. Die Entstehung der im Rahmen dieser Arbeit identifizierten Deletion von 6 CTG-Repeats (Mut_{3L}) sowie der darüber hinaus in Kontroll-Individuen detektierten Signalpeptid-Varianten mit 6, 7, 8, 10 und 11 CTG-Repeats im Vergleich zum Wildtyp mit 9 CTG-Repeats (Kapitel 3.1.4 und 4.2) ist wahrscheinlich durch diesen Mechanismus zu erklären.

4.1.3 *Alu-Repeat* vermittelte Rekombinationen führen zu intragenischen Deletionen

Die Exon-übergreifende *LRP5*-Ex14_16-Deletion war offenbar durch eine *Alu*-Sequenz-vermittelte Homologen-Fehlpaarung mit anschließendem ungleichen *Crossing-Over* in der Meiose eines „*Founder*“-Individuums entstanden [Pittman & Schimenti, 1998]. Insgesamt scheinen ~0.3% aller humangenetischen Erkrankungen aus pathogenen *Alu*-vermittelten Rekombinationen zu resultieren [Roy *et al.*, 1999; Deininger und Batzer, 1999]. *Alu*-Repeats treten besonders häufig in genreichen Abschnitten des Genoms auf, wofür unter anderem der *Low density lipoprotein* (LDL)-Rezeptor-Lokus auf Chromosom 19 bekannt ist. Zahlreiche *Alu*-vermittelte Rekombinationen des LDL-Rezeptor-Gens führen zu Deletionen, die für die Familiäre Hypercholesterinämie (MIM # 143890) verantwortlich sind [Amsellem *et al.*, 2002; Nissen *et al.*, 2006].

Mit Identifikation der in dieser Arbeit beschriebenen Ex14_16del-Mutation konnte die erste größere intragenische *LRP5*-Deletion nachgewiesen werden. Große exonübergreifende Deletionen wie diese waren für *LRP5* bislang nicht bekannt. Derartige heterozygote Mutationen können durch ein konventionelles PCR-basiertes Mutations-Screening mit genomischer DNA nur sehr schwer oder gar nicht erfasst werden. Aus diesem Grunde müssten andere diagnostische Strategien wie MLPA (*Multiplex ligation-dependent probe amplification*) oder RT (Reverse Transkription)-PCR berücksichtigt werden, bei denen beide Allele erfasst werden können. In Zusammenarbeit mit dem *Department of Genetics and Center for Human Genetics (Case School of Medicine and University Hospital of Cleveland, Ohio, USA)* wurde im Übrigen zusätzlich mittels eines MLPA-basierten Ansatzes die Deletion der Exons 14 bis 16 von *LRP5* in der türkischen Familie bestätigt. Mit Hilfe dieser Methode fand sich außerdem bei einem OPPG-Patienten (OP240; [Ai *et al.*, 2005]), für den bislang nur eine heterozygote *LRP5*-Mutation detektiert worden war, eine zusätzliche größere

Deletion der ersten beiden kodierenden Exons von LRP5. Diese Ergebnisse lassen darauf schließen, dass noch weitere, bisher nicht identifizierte, größere genomische Deletionen in *LRP5* existieren und somit den Phänotypen von OPPG- oder FEVR-Patienten, bei denen bislang lediglich eine heterozygote *LRP5*-Mutation detektiert wurde, erklären. Wenn auch bislang keine weiteren – bis auf die im Rahmen dieser Arbeit identifizierten – intragenischen großen Deletionen beschrieben sind, wird die Zahl der intragenischen *LRP5*-Mutationen unter Berücksichtigung der Seltenheit von OPPG und der bislang annotierten *LRP5*-Mutationen auf maximal 5% geschätzt. Dagegen lassen sich große intragenische Mutationen in einigen Erkrankungen besonders häufig vorfinden. Ein Beispiel hierfür stellt die Fanconi-Anämie (MIM # 227650) dar, bei der Morgan *et al.* in 40% der 26 untersuchten Patienten *Alu-Repeat* vermittelte große intragenische Deletionen detektieren konnten [Morgan *et al.*, 1999]. Auch bei Patienten mit Brustkrebs (MIM # 114480) finden sich häufig große Deletionen oder Duplikationen im *BRCA1*-Gen, die ebenfalls durch Fehlpaarungen von *Alu-Repeats* entstanden sind. In einer Studie fanden Hogervorst *et al.* in 27% der 121 untersuchten Familien große Deletionen bzw. Duplikationen [Hogervorst *et al.*, 2003]. Somit erscheinen *Alu-Repeat* vermittelte Deletionen und Duplikationen keine Seltenheit zu sein und treten in *Alu-Repeat*-reichen Genen besonders häufig auf. In Anbetracht der Bedeutung *Alu-Repeat*-vermittelter Deletionen sollte insbesondere bei Erkrankungen mit einer geringen Mutations-Detektionsrate das Vorkommen von *Alu-Repeats* überprüft werden, um entsprechende Strategien des Mutations-Screenings zu etablieren.

4.1.4 Genotyp-Phänotyp-Korrelation

Da die Betroffenen weder eine für das OPPG-Syndrom typische schwere und deformierende Osteoporose noch ein Pseudogliom der Augen aufzeigten, lag in dieser Familie ein untypischer OPPG-Phänotyp vor. Zudem gehören eine schwere Muskelhypotonie und eine mentale Retardierung nicht zu den klassischen Symptomen des OPPG-Syndroms. Die Patienten waren nicht aufgrund von multiplen und schlecht heilenden Frakturen, die zu schweren Skelettdeformationen und Immobilisierung führen, auf einen Rollstuhl angewiesen. Viel mehr war die schwere progressive Muskelatrophie der Grund, weshalb die Patienten nie laufen lernten. In der Literatur fand sich ein einziger Fallbericht über eine 36jährige Patientin mit OPPG-Syndrom und schwerer muskulärer Hypotonie, bei der eine homozygote *LRP5*-Mutation (R570W) identifiziert wurde [Somer *et al.*, 1988; Ai *et al.*, 2005]. Eine für das OPPG-Syndrom typische, in der Jugend auftretende, schwere Osteoporose, die zur Gehbehinderung führte, war auch bei dieser Patientin nicht festzustellen. Sie erlitt lediglich im Alter von 32 Jahren eine einzelne Fraktur. Auch bei ihr war die schwere progressive Muskelatrophie der Grund dafür, dass sie nie laufen lernte. Die bei dieser Patientin sowie bei

den Betroffenen der türkischen Familie auftretende schwere Muskelhypotonie ist folglich ein sehr seltenes, aber offenbar durchaus mögliches klinisches Merkmal des OPPG-Syndroms. Entsprechend dieses für das OPPG-Syndrom untypischen Phänotyps in der türkischen Familie wurden zwei bisher in der Literatur noch nicht beschriebene, neuartige *LRP5*-Mutationen identifiziert, deren Pathogenität im Rahmen dieser Arbeit nachgewiesen wurde. Möglicherweise geben gerade diese neuartigen *LRP5*-Mutationstypen eine Erklärung dafür, warum unter anderem eine muskuläre Atrophie sowie eine milde mentale Retardierung, aber keine schwere juvenile Osteoporose das Krankheitsbild in der türkischen Familie prägen. Allerdings liegt bei der oben erwähnten 36jährigen OPPG-Patientin, die einen ähnlichen Muskelphänotyp aufweist, ein anderer *LRP5*-Mutationstyp, eine homozygote *Missense*-Mutation, vor. Da in der Literatur bislang keine stark ausgeprägten Muskelsymptome aufgrund von *LRP5*-Mutationen beschrieben sind, lässt sich nur spekulieren, ob diese beiden neuartigen Mutationen die Muskelhypotonie verursachen oder ob in Anbetracht der oben erwähnten Patientin z. B. nicht eher genetische *Modifier* dafür verantwortlich sein könnten.

4.2 Poly-Leucin-*Stretch* im *LRP5*-Signapeptid in der Allgemeinbevölkerung

4.2.1 Quantitativer Effekt des polymorphen Leucin-*Stretches* im *LRP5*-Signalpeptid

Die Genotypisierung von gesunden Kontroll-Individuen zeigte und bestätigte, dass der Poly-Leucin-*Stretch* im Signalpeptid von *LRP5* polymorph ist. Neben den bereits in der Literatur beschriebenen *LRP5*-Signalpeptid-Varianten mit 6 und 10 Leucinen (anstelle der typischen 9 Leucine) fanden sich zusätzlich Allele mit 7, 8 und 11 Leucinen unter 438 Kontroll-Individuen. Interessanterweise zeigte die Analyse dieser Signalpeptid-Varianten mit Hilfe des *WNT/NDP-Signaling Luciferase Reporter Assays*, dass sowohl eine Verlängerung als auch eine Verkürzung des Leucin-*Stretches* zu einer quantitativ verminderten Signaltransduktion im Gegensatz zum mit Abstand häufigsten Allel mit 9 Leucinen (das somit als Wildtyp Allel gelten kann) führte. Insbesondere die am stärksten vom Wildtyp-Allel abweichenden Protein-Varianten mit 6 und 11 Leucinen im Signalpeptid waren mit einer signifikant verminderten Signaltransduktion hypomorph. Westernblot-Analysen ergaben, dass die quantitative Signaltransduktionsfähigkeit der verschiedenen *LRP5*-Signalpeptid-Rezeptoren mit ihrem Protein-Expressionslevel korrelierten. Die Analyse der subzellulären Lokalisation der *LRP5*-Protein-Varianten 6 Leu und 11 Leu bestätigte eine teilweise Retention des Proteins im Cytoplasma und eine verglichen mit dem Wildtyp geringere Protein-Expression in der Plasmamembran. Dies lässt daraus schließen, dass diese veränderten Signalpeptid-Varianten offenbar einer im Gegensatz zum Wildtyp weniger effizienten Signalpeptid-Erkennung und/oder Freisetzung der Polypeptidkette in das ER unterlagen. Dies führte zu einer verminderten Menge an posttranslational modifizierten *LRP5*-Proteinen im ER, die cotranslational in die ER-Membran eingebaut oder von dort schließlich in die

Plasmamembran transportiert wurden. Diejenigen LRP5-Rezeptoren, die die Plasmamembran erreichten, waren im Gegensatz zum mutierten Signalpeptid mit nur 3 Leucinen funktionell zwar noch intakt, lagen aber verglichen zum Wildtyp in geringeren Mengen vor. Dies erklärt die verminderte Signaltransduktion gemessen an der Luciferase-Aktivität und verdeutlicht somit einen quantitativen Effekt der verschiedenen LRP5-Signalpeptid-Varianten auf die Funktion des Signalpeptids. Interessanterweise ist diese auch bioinformatisch prädizierbar. So zeigt eine *in silico*-Analyse der verschiedenen LRP5-Signalpeptid-Varianten, dass für diese zwar im Gegensatz zur Signalpeptid-Mutante mit nur 3 Leucinen ein funktionelles Signalpeptid vorliegt, aber der sogenannte *S-Score*, welcher jede einzelne Aminosäure als Teil eines Signalpeptids einordnet, im Vergleich zum Wildtyp-Allel mit 9 Leucinen ebenfalls quantitativ vermindert ist und die Abschwächung des *S-Scores* mit den gemessenen Luciferase-Aktivitäten korreliert (siehe Anhang Abb. 7.2.1 und 7.2.2). Da bislang noch keine systematischen funktionellen Analysen zu Sequenzveränderungen in humanen Signalpeptiden existierten, konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmal eine Funktionsabschwächung und somit ein quantitativer Effekt eines Signalpeptid-Längenpolymorphismus in dieser Form aufgezeigt werden.

Aus evolutionärer Sicht erscheint es interessant, dass das häufigste Allel mit 9 Leucinen das maximal funktionstüchtige ist, während eine Verkürzung bzw. Verlängerung des Leucin-*Stretches* zu einer Funktionsabschwächung führt. Möglicherweise unterlagen diese vom Wildtyp abweichenden Signalpeptid-Varianten, die zwar aufgrund einer höheren Mutationsrate des CTG-*Repeats* relativ häufig entstehen, einer natürlichen Selektion und liegen aus diesem Grunde deutlich seltener als das 9 Leucin-Allel vor [Jeffreys und Neumann, 2009].

4.2.2 Assoziation von Signalpeptid-Längenpolymorphismen mit komplexen humanen Erkrankungen

Dass eventuelle quantitative Effekte von Signalpeptid-Längenvarianten klinisch relevant sein können, zeigen Studien, die eine Assoziation von Signalpeptid-Varianten mit komplexen humanen Erkrankungen belegen (s.u.). Allerdings ist die Häufigkeit von Signalpeptid-Längenpolymorphismen im humanen Genom bislang nicht systematisch untersucht worden. Aus diesem Grunde wurden diesbezüglich in Zusammenarbeit mit Dr. Jan Freudenberg (*Center for Genomics and Human Genetics, Feinstein Institute for Medical Research, New York, USA*) genomweite *in silico*-Analysen durchgeführt. Diese ergaben, dass etwa 400 Proteine mit mindestens fünf aufeinander folgenden Leucinen innerhalb des Signalpeptids im menschlichen Genom vorliegen, wovon sich einige Leucin-*Stretche*, die im Rahmen dieser Arbeit bei Kontroll-Individuen genotypisiert wurden, tatsächlich auch als polymorph erwiesen. Es existieren folglich neben LRP5 viele weitere Proteine, die

Signalpeptid-Längenvarianten aufweisen. Möglicherweise üben diese einen ähnlichen funktionell quantitativen Effekt, wie hier bei den LRP5-Signalpeptid-Varianten nachgewiesen, aus, der unter Umständen auch klinisch relevant sein könnte.

So besteht z.B. für den Poly-Leucin-*Stretch* des *PCSK9*-Gens, welcher auch im Rahmen der *in silico*-Analysen erfasst und experimentell als polymorph bestätigt wurde (Kapitel 3.2.3, Tab. 3.4), ein kausaler Zusammenhang mit Cholesterinstoffwechselstörungen. Studien belegen, dass eine Insertion von zwei Leucinen in den 9 Leucin-*Stretch* des PCSK9-Signalpeptides mit einer familiären Hyperlipidämie (MIM # 144250) bzw. einer familiären Hypobetalipoproteinämie (MIM # 605019) assoziiert ist [Abifadel *et al.*, 2008]. In einer weiteren Studie wurde dieser PCSK9-Leucin-*Stretch* bei 403 Individuen genotypisiert, welche ergab, dass heterozygote Träger des 10 Leucin-Allels einen 10 bis 15 mg/dl geringeren *Low-density lipoprotein* (LDL)-Cholesterinspiegel im Gegensatz zu Homozygoten mit 9 Leucinen aufwiesen [Yue *et al.*, 2006]. Der molekulare Mechanismus, durch den diese Signalpeptid-Varianten den Cholesterinstoffwechsel beeinträchtigen, ist bislang noch nicht geklärt. Ein weiteres Beispiel ist der Insertions- / Deletionspolymorphismus der Aminosäuren Leucin-Alanin-Leucin im Signalpeptid des sezernierten Apolipoprotein B (ApoB). Eine Hefestudie mit Hilfe eines Reporter-gen-Assays belegt, dass dieser Insertions- / Deletionspolymorphismus sowie eine seltene 2 Leucin-Verlängerung dieses Signalpeptides einen deutlichen Effekt auf die Sekretionseffizienz und Protein-Translokation ins ER ausüben [Sturley *et al.*, 1994]. Boekholdt *et al.* bestätigten in einer Metaanalyse, dass der Polymorphismus signifikant mit dem ApoB-Spiegel und einem erhöhten Risiko für koronare Herzerkrankungen assoziiert ist [Boekholdt *et al.*, 2003]. Für das TGF β 1-Protein (*transforming growth factor*) ist eine Variante beschrieben, die den 5 Leucin-*Stretch* des Signalpeptides unterbricht. Diese Leu10Pro-Variante ist mit einer 2,8-fach erhöhten Proteinsekretion und für homozygote Träger mit einem ~1,25-fach erhöhtem Risiko, an Brustkrebs zu erkranken, assoziiert. [Dunning *et al.*, 2003].

Die hier aufgeführten Beispiele und der Nachweis von weiteren Proteinen im humanen Genom mit Signalpeptid-Längenpolymorphismen sowie eine erhöhte Mutationsrate von repetitiven DNA-Sequenzen (Kapitel 4.1.2) lassen schlussfolgern, dass möglicherweise noch zahlreiche weitere und bislang nicht annotierte Proteine existieren, bei denen Signalpeptid-Längenvarianten funktionelle Auswirkungen haben.

Auch den in Kontroll-Individuen identifizierten LRP5-Signalpeptid-Varianten könnte demnach eine klinische Bedeutung zukommen. Da zahlreiche bekannte *LRP5*-Mutationen unter anderem für das OPPG-Syndrom oder eine monogene Erhöhung der Knochendichte verantwortlich sind und heterozygote OPPG-Mutationsträger oftmals eine verminderte Knochendichte aufweisen [Gong *et al.*, 2001], liegt eine wesentliche Bedeutung von *LRP5* für den Knochenstoffwechsel nahe und lässt vermuten, dass diese Signalpeptid-Varianten

möglicherweise mit einer verminderten Knochendichte assoziiert sind. Diese Vermutung wird durch die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführte Analyse der LRP5-Signalpeptidmutante A29T, welche vor einigen Jahren heterozygot und *de novo* bei einer 16jährigen Patientin mit juveniler Osteoporose [Hartikka *et al.*, 2005] identifiziert wurde, gestützt. Die Ergebnisse verweisen auf einen möglichen kausalen Zusammenhang einer Veränderung des Signalpeptides mit Osteoporose, da die Analyse dieses mutierten LRP5-A29T-Proteins beim durchgeführten *Luciferase Reporter Assay* eine ebenfalls signifikant verminderte Signaltransduktion der WNT/NDP-Signalkaskade aufwies (Kapitel 3.2.1). Die ermittelten Werte waren mit denen der hypomorphen 6 und 11 Leucin-Varianten vergleichbar und auf ein funktionell beeinträchtigt Signalpeptid und folglich auch eine (quantitativ) verminderte Signaltransduktionsfähigkeit des Rezeptors zurückzuführen. Daten zur Knochendichte der analysierten Kontroll-Individuen lagen allerdings nicht vor, so dass eine mögliche Assoziation der hypomorphen Signalpeptid-Varianten, insbesondere der 6 und 11 Leu-Allele, mit einer ebenfalls verminderten Knochendichte im Rahmen dieser Arbeit nicht nachweisbar war. Eine Assoziationsstudie könnte allerdings Aufschluss darüber geben (s.u.).

4.2.3 Assoziation von LRP5 mit Osteoporose bzw. einer verminderten Knochendichte

Die nicht-syndromale Osteoporose zählt zu den komplexgenetischen Erkrankungen und ist eine der häufigsten degenerativen Erkrankungen in der entwickelten Welt, von der beide Geschlechter und alle ethnischen Gruppen betroffen sind, wobei das Erkrankungsrisiko für postmenopausale Frauen am höchsten ist. Risikofaktoren für die nicht-syndromale Osteoporose sind unter anderem Alter, Geschlecht und eine positive Familienanamnese. Allerdings ist über die genetischen Grundlagen komplexgenetischer Erkrankungen wie Osteoporose bislang wenig bekannt. In diesem Zusammenhang werden zwei komplementäre Konzepte diskutiert, bei der sich die sogenannte *Common Variant-Common Disease* (CV-CD)-Hypothese und die *Rare Variant-Common Disease* (RV-CD)-Hypothese gegenüberstehen. Die CV-CD Hypothese postuliert, dass die Risikoallele für komplexe Erkrankungen unter häufigen Polymorphismen mit einer hohen Allelfrequenz (Frequenz deutlich >1%) in der Allgemeinbevölkerung zu finden sind. Dagegen geht die RV-CD-Hypothese davon aus, dass verschiedene Varianten mit einer geringen Allelfrequenz und höheren Penetranz in einzelnen Familien bzw. Patienten bei der Disposition einer komplexgenetischen Krankheit eine Rolle spielen [Lohmueller *et al.*, 2003; Hirschhorn *et al.*, 2005; Ji *et al.*, 2008]. Praktisch bedeutet dies, dass zur Testung der CV-CD-Hypothese *Case-Control*-Assoziationsstudien durchgeführt werden, bei denen die Allelfrequenzen von Polymorphismen der Betroffenen mit denen der Kontroll-Individuen verglichen werden. Der RV-CD-Hypothese kann dagegen nur durch direkte Sequenzierung von Kandidatengenen in

großen Patientenkollektiven nachgegangen werden, was bisher technisch und finanziell kaum systematisch durchführbar war.

Interessanterweise belegen große genomweite Assoziationsstudien mit mehreren tausend Individuen, dass häufige *LRP5*-Polymorphismen (d.h. in diesem Fall *single nucleotide polymorphisms*) mit einer verminderten Knochendichte assoziiert sind. Inwiefern die identifizierten Risikoallele tatsächlich die kausalen Varianten darstellen, ist jedoch noch nicht abschließend geklärt. [van Meurs *et al.*, 2008; Koay *et al.*, 2004; Kiel *et al.*, 2007; Richards *et al.*, 2008]. Demnach könnten auch der *Leu-Stretch* im Signalpeptid bzw. die *LRP5*-Signalpeptid-Varianten mit einer verminderten Knochendichte bzw. einer nicht-syndromalen Osteoporose assoziiert sein. Allerdings werden *DNA-Repeats* im Rahmen derzeitiger genomweiter Assoziationsstudien nicht direkt typisiert, sondern SNP-basiert durchgeführt, so dass mögliche Assoziationen von *Repeat*-Allelen mit humanen komplexgenetischen Erkrankungen – wie auch der *LRP5*-CTG-*Repeat* – bislang nur schlecht oder gar nicht erfasst werden können. Eventuelle Kopplungsungleichgewichte zwischen SNP-Allelen und *Repeat*-Allelen könnten allerdings wiederum Aufschluss darüber geben, ob eine mögliche Assoziation vorliegt. Somit könnte auch die Hypothese einer Assoziation der *LRP5*-Signalpeptid-Varianten mit Osteoporose durch Kopplungsungleichgewichtsdaten gestützt werden, indem zunächst der Genotyp des *LRP5*-CTG-*Repeats* in Exon 1 für ein Osteoporose-*Case-Control*-Kollektiv bestimmt wird. Sollten sich dabei signifikante Unterschiede in der Allelverteilung zwischen Patienten und Kontrollen zeigen, könnten weitere *haplotype-tagging* SNPs des Gens analysiert werden. Diese Haplotyp-basierte Analyse der Daten kann Aufschluss darüber geben, ob bestimmte Allele des CTG-*Repeats* im Kopplungsungleichgewicht mit einzelnen Haplotypen in dieser Region stehen und somit Hinweise auf eine mögliche Assoziation geben.

Für eine aussagekräftige Assoziationsstudie bedürfte es in Anbetracht der Seltenheit insbesondere der 6 *Leu* und 11 *Leu*-Allele (< 1%) allerdings sehr großer Patienten- und Kontrollkollektive, die genotypisiert werden müssten, um verlässliche Aussagen bezüglich einer potentiellen Assoziation zu bekommen. Dennoch erscheint eine solche Beteiligung der *LRP5*-Signalpeptid-Varianten an der Pathogenese der Osteoporose aufgrund der hier vorgestellten Ergebnisse und Hypothesen als durchaus möglich und würde gegebenenfalls die Bedeutung von *LRP5* im Knochenstoffwechsel als auch eine klinische Relevanz von polymorphen Signalpeptid-Varianten unterstreichen.

Familie #2

4.3.2 Identifikation einer pathogenen *Splice Site*-Mutation in *LRP5*

Auch in der Familie, in der zwei Betroffene ein klassisches OPPG-Syndrom aufwiesen, wurde durch direkte Sequenzierung aller 23 kodierenden Exons von *LRP5* eine pathogene *LRP5*-Mutation identifiziert. Bei den beiden Betroffenen fand sich unmittelbar nach der *Donor Splice Site* in Intron 7 an Position +4 ein nicht annotierter, homozygoter Basenaustausch. Die Genotypisierung aller Familienmitglieder zeigte, dass dieser innerhalb der Familie mit dem Phänotyp co-segregierte und die konsanguinen Eltern für diese Veränderung heterozygot waren. Diese Basenveränderung trat in 50 gesunden, türkischen Kontroll-Individuen nicht auf.

Sowohl bioinformatisch als auch experimentell wurde nachgewiesen, dass der Basenaustausch zu einer funktionell relevanten *Splice Site*-Veränderung führt. Statt der ursprünglichen *Splice Site* wird eine 63 bp *downstream* gelegene kryptische *Splice Site* verwendet. Auf Proteinebene hat dies eine *in frame*-Insertion von 21 zusätzlichen Aminosäuren und damit eine Unterbrechung der zweiten β -Propeller-YWTD-Domäne von *LRP5* zur Folge, womit dies als ursächlich und pathogen für das in dieser Familie zugrunde liegende OPPG-Syndrom gedeutet wurde.

Die funktionellen *in vitro*-Analysen dieses mutierten *LRP5*-Proteins (p.E528_V529ins21) bestätigten, dass der Rezeptor einem aberranten intrazellulärem Transport unterlag und nicht mehr in der Lage war, Signale entlang der WNT/NDP-Signalkaskade zu transduzieren. In Übereinstimmung mit *LRP5*-Mutationen innerhalb der zweiten β -Propeller-YWTD-Domäne wie z.B. W504C und R570W, die in der Literatur bei OPPG-Patienten beschrieben sind, ist der Funktionsverlust dieses mutierten *LRP5*-Rezeptors mit aller Wahrscheinlichkeit auf eine gestörte Proteinfaltung zurückzuführen [Cheung *et al.*, 2006].

Anhand dieser Analysen konnte somit erstmalig der Pathomechanismus einer *LRP5-Splice-site* Veränderung durch einen homozygoten Basenaustausch der vierten Base nach Exon 7 von *LRP5* (c.1584+4a>t) aufgeklärt und ein Funktionsverlust des *LRP5*-Rezeptors bei den Betroffenen dieser Familie mit einem klassischen OPPG-Phänotypen nachgewiesen werden. In der Literatur wurde bislang von drei heterozygoten *LRP5-Splice*-Mutationen an Position +2 berichtet, deren Pathomechanismus jedoch nicht weiter analysiert wurde [Ai *et al.*, 2005; Toomes *et al.*, 2004]. Diese befinden sich allerdings im *Splice Site*-Konsensus nach Exon 17 (c.3763+2t>c), nach Exon 21 (c.4488+2t>g) bzw. Exon 22 (c.4586+2t>c), welche vermutlich durch *Exon-Skipping* in einem funktionslosen, trunkierten Protein resultieren. Pathogene *Splice Site*-Mutationen an Position +4 sind äußerst selten beschrieben. Buratti *et al.* zeigten, dass insbesondere *Splice Site*-Mutationen an den Positionen +1G, +2T und +5G zu einer funktionell relevanten *Splice Site*-Veränderung führen, die oftmals mit Präferenz einer exonischen oder intronischen kryptischen *Splice Site* einhergehen. Darüber hinaus führten

Burge und Karlin in einer Studie auf, dass sich an Position +4 der *Donor Splice Site* in der Regel mit 71% ein A befindet, während die anderen Nukleotidfrequenzen für diese Position lediglich 7 bis 12% betragen [Burge und Karlin, 1997]. Eine Veränderung dieses Nukleotids könnte ein Indiz für eine pathogene *Splice Site*-Veränderung darstellen. Dies müsste jedoch wie im Rahmen dieser Arbeit experimentell verifiziert werden, indem z.B. unter anderem belegt wird, dass es sich um keinen Polymorphismus handelt.

4.4 Fazit des *LRP5*-Mutations-Screenings in den beiden türkischen Familien und der funktionellen Analysen der identifizierten *LRP5*-Veränderungen

Es konnte somit in beiden analysierten Familien gezeigt werden, dass die identifizierten *LRP5*-Mutationen zum Funktionsverlust des Rezeptors führen und folglich offensichtlich für die in diesen Familien zugrunde liegenden Phänotypen verantwortlich sind.

Die Ergebnisse der funktionellen Analysen der *LRP5*-Signalpeptid-Varianten sowie die nahe liegende Hypothese, dass eine Veränderung des Signalpeptides möglicherweise mit einer nicht-syndromalen Osteoporose assoziiert sein könnte, unterstreichen darüber hinaus die Bedeutung von *LRP5* insbesondere im Knochenstoffwechsel.

Allerdings ist bislang noch nicht abschließend geklärt, inwieweit *LRP5* den Knochen-Metabolismus konkret beeinflusst. Neben der bisher bekannten essentiellen Rolle von *LRP5* im kanonischen WNT/NDP-Signalweg zeigte eine aktuelle Arbeit von Yadav *et al.*, dass *LRP5* unter anderem die Serotonin-Synthese im Duodenum reguliert. Indem sie demonstrierten, dass im Darm synthetisiertes Serotonin auf die Knochenformation wirkt, legten sie eine bis dato unbekannte, indirekte Wirkungsweise von *LRP5* auf den Knochenstoffwechsel dar [Yadav *et al.*, 2008].

Dies verdeutlicht, dass noch weiterer Klärungsbedarf über die Regulation und Wirkungsweise von *LRP5* besteht, wenn auch *in vitro*-Analysen von pathogenen *LRP5*-Mutationen bei monogenen Erkrankungen wie OPG und FEVR belegen, dass *LRP5* innerhalb des kanonischen WNT/NDP-Signalweges eine essentielle Rolle einnimmt.

4.5 LRP5L-Pseudogen

4.5.1 Pseudogene

Das menschliche Genom enthält über drei Milliarden Nukleotide, von denen lediglich etwa 2% Protein-kodierend sind. Weiterhin besteht unter Berücksichtigung transkribierter Intron-Sequenzen ein Großteil des transkriptionellen „Outputs“ aus *non-coding* RNA (ncRNA), wovon einen Teil Pseudogene ausmachen [Mattick, 2001; Zheng *et al.*, 2007]. Diese wurden bislang häufig als „junk DNA“ oder „Protein-Fossilien“ bezeichnet, die durch fehlerhafte Genduplikation oder Retrotransposition von Protein-kodierenden Genen entstanden sind und zu denen sie demnach Homologien aufweisen. Allerdings fehlt den meisten Pseudogenen ein größerer „funktionierender“ offener Leserahmen mit einer Promotorsequenz, womit sie aller Wahrscheinlichkeit nach nicht Protein-kodierend sind und deshalb als nicht-funktional erachtet wurden.

Verschiedene Forschergruppen des ENCODE (*ENCyclopedia Of DNA Elements*)-Consortiums haben im menschlichen Genom allerdings nahezu 20.000 Pseudogene identifiziert, von denen schätzungsweise 10% transkribiert und prozessiert werden [Zhang *et al.*, 2004; Zheng *et al.*, 2007]. Allein die große Zahl der prozessierten Pseudogene lässt vermuten, dass diese keine reinen Relikte darstellen, sondern zumindestens in einigen Fällen eine biologische Funktion erfüllen können. Das dies prinzipiell möglich ist, zeigten z.B. Korneev *et al.* in Schnecken, in denen das zur Stickstoffmonoxidsynthase (NOS) verwandte und transkribierte Pseudogen die Translation von NOS beeinflusst [Korneev *et al.*, 1999]. Hirotsune *et al.* postulierten sogar vor einigen Jahren das sogenannte „Pseudogen-*trans*-Regulations-Modell“ und nahmen dabei an, dass es sich bei den entsprechenden Pseudogen-DNA-Abschnitten nicht um „junk-DNA“ handelt, sondern maßen diesen eine wichtige Funktion in der Regulation ihres Herkunftsgenes bei. Dieses Modell basiert auf der Beobachtung eines paternal vererbten (d. h. einem *Imprinting* unterliegenden) Nieren/Knochen-Phänotyp in heterozygoten transgenen Mäusen, welcher auf der Insertion eines Transgens beruht. Sie postulierten, dass diese Insertion die Transkription des benachbarten, epigenetisch geprägten *Makorin1-Pseudogens 1* (*Mkrn1-p1*) reduziert. Unter Annahme einer Stabilisierungsfunktion/*trans*-Regulation des *Mkrn1*-Pseudogens auf das *Mkrn1*-„Herkunftsgen“ erklärten sie daraus eine ebenfalls partielle Reduktion der *Mkrn1*-Expression, die letzten Endes zum beschriebenen Phänotyp führen sollte [Hirotsune *et al.*, 2003]. Allerdings konnte diese Hypothese von Gray *et al.* nicht bestätigt werden, indem diese sowohl bioinformatisch als auch experimentell demonstrieren konnten, dass *Mkrn1-p1* keinen regulatorischen Effekt auf *Mkrn1* ausüben kann. Zum einen wiesen sie nach, dass *Mkrn1-p1* auf beiden Allelen vollständig methyliert ist, womit es weder epigenetisch geprägt noch aktiv transkribiert ist. Dagegen ist *Mkrn1* selbst unmethyliert und unterliegt auch folglich keiner epigenetischen Prägung, wie von Hirotsune *et al.* angenommen. Darüber hinaus

deckten sie auf, dass es sich bei dem von Hirotsune *et al.* fälschlicherweise als *Mkrn1-p1* bezeichneten Transkript um eine Nager-spezifische *Mkrn1*-Isoform handelt. Schließlich untermauerten sie ihre Ergebnisse, indem sie *Mkrn1* bei Mäusen inaktivierten, diese allerdings keinerlei Parallelen zum Phänotyp des original einem *Imprinting* unterliegenden Transgens aufzeigten. Somit wurde mit verschiedenen Analysen belegt, dass *Mkrn1-p1* höchstwahrscheinlich keine *trans*-regulative Funktion auf sein *Mkrn1*-Herkunftsgen ausübt [Gray *et al.*, 2006]. Sie schlussfolgerten aus ihren Ergebnissen, dass das von Hirotsune *et al.* aufgestellte Pseudogen-*trans*-Regulations-Modell von Herkunftsgenen keine experimentelle Grundlage besitzt und vertraten nach wie vor die Theorie, dass Pseudogene am ehesten inaktive Genrelikte darstellen.

Dem widersprechend wurden in jüngster Zeit systematische Analysen von annotierten Pseudogenen durchgeführt, in denen unter anderem demonstriert wurde, dass eine große Zahl von Pseudogenen tatsächlich transkribiert wird und dass *upstream* der Pseudogene regulatorische Faktoren binden [The ENCODE Project Consortium, 2007; Zheng *et al.*, 2007]. Sechs aktuelle Studien (vier in der Fruchtfliege und zwei in der Maus) wiesen darüber hinaus sogar einen direkten funktionellen Wirkungsmechanismus von Pseudogenen nach [Czech *et al.*, 2008; Ghildiyal *et al.*, 2008; Kawamura *et al.*, 2008; Okamura *et al.*, 2008; Tam *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008]. Tam *et al.* und Watanabe *et al.* schrieben dabei Pseudogenen regulatorische Funktionen zu, indem sie zeigten, dass Pseudogen-Transkripte als natürliche siRNAs fungieren können. Sie entdeckten bei Mäusen, dass einige endogene siRNAs von Pseudogenen stammen und leiteten daraus eine *trans*-Regulation der verwandten Herkunftsgene über den Mechanismus der RNA-Interferenz ab [Tam *et al.*, 2008; Watanabe *et al.*, 2008]. Zusammenfassend scheinen diese neuen Studien somit zu bestätigen, dass transkribierte Pseudogene funktionell relevant sein können, wobei eine direkte Regulation des homologen „Herkunftsgens“ auf RNA-Ebene der wahrscheinlichste Wirkmechanismus zu sein scheint. Eine Bedeutung dieses Regulationsmechanismus *in vivo* ist beim Menschen jedoch bis jetzt nicht bewiesen.

4.5.2 Analysen des *LRP5L*-Pseudogens

Unter der Annahme, dass Pseudogene tatsächlich funktionell aktiv sein können, sollte im Rahmen dieser Arbeit für das transkribierte und bis jetzt nicht weiter analysierte *LRP5L*-Pseudogen untersucht werden, ob dieses *in vitro* eine *trans*-regulatorische Funktion auf *LRP5* ausüben kann. Hintergrund dieser Überlegung war, dass *LRP5L* in diesem Fall über die Regulation von *LRP5* ein ausgezeichnetes Kandidatengen für die komplex vererbte Osteoporose darstellen würde.

Es galt daher zunächst die bis dato experimentell noch nicht aufgeklärte *LRP5L*-Pseudogen-Struktur aufzudecken, um weitere funktionelle Analysen bezüglich der Expression und

möglichen Regulation durchzuführen. Anhand zahlreicher annotierter *ESTs* in Genomdatenbanken des *UCSC*, *NCBI* und *Ensembl* ließ sich ableiten, dass dieses Pseudogen stark exprimiert ist und prozessiert wird. Da die in den Datenbanken enthaltenen Daten widersprüchlich waren, war anzunehmen, dass die genaue Struktur ebenso wie die Größe und Orientierung des Transkriptes bislang unklar waren, so dass dies im Rahmen dieser Arbeit mit Hilfe der Datenbank-Sequenzen und RACE-PCR-Analysen aufgeklärt werden sollte. Abweichend von den *in silico* prädizierten Pseudogen-Strukturen des *UCSC*, *NCBI* und *Ensembl* konnten wir zeigen, dass das transkribierte *LRP5L*-Spleiß-Produkt eine Kombination aus verschiedenen prädizierten Exons und annotierten *spliced ESTs* darstellte. Das *LRP5L*-Pseudogen besteht demnach aus sieben Exons, die insgesamt 1740 bp umfassen. Der größte offene Leserahmen beträgt 756 bp, die 252 Aminosäuren kodieren, welche Homologien von etwa 83% zu den in der extrazellulären Domäne von *LRP5* lokalisierten YWTD-Motiven aufzeigen. Die nicht optimale Kozak Start-Codon-Sequenz sowie ein fehlendes Polyadenylierungssignal lassen allerdings vermuten, dass dieses hypothetische Protein nicht translatiert wird, wenngleich dies nicht experimentell analysiert und zweifelsfrei nachgewiesen wurde. Dies war jedoch nicht notwendige Voraussetzung bezüglich einer möglichen Funktion, da auch die bislang als genetisch aktiv nachgewiesenen Pseudogene nicht Protein-kodierend waren und ein funktionelles Pseudogen demnach nicht zwingend Protein-kodierend sein muss [Sasidharan und Gerstein, 2008; Zhang et al., 2004; Mattick, 2006]. Darüber hinaus zielten die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Analysen primär auf die Fragestellung, ob ein auf RNA-Interferenz basierender trans-Regulations-Mechanismus existieren könnte (Kapitel 3.4 und Kapitel 3.4.6).

4.5.2.1 Luciferase Reporter Assay und RNA-Interferenz-Analysen zum *LRP5L*-Pseudogen

Die Analyse einer möglichen Regulation von *LRP5* durch *LRP5L* und *vice versa* wurde im Rahmen dieser Arbeit zum einen mit Hilfe des *Luciferase Reporter Assays* (mittels Co-Transfektion von Expressionskonstrukten für *LRP5L* und *LRP5*) und zum anderen mit RNAi-Analysen (anhand von Zelllinien mit endogener *LRP5L*- und *LRP5*- Expression) untersucht. Dabei konnte die Hypothese der *trans*-Regulation von *LRP5* durch sein Pseudogen mit diesen beiden Analyse-Systemen nicht bestätigt werden. Weder die Ergebnisse des *Luciferase Reporter Assays* noch die RNAi-Analysen gaben Hinweise auf eine erhöhte bzw. erniedrigte Aktivität oder Expression des *LRP5*-Proteins bzw. Transkriptes durch *LRP5L* - und *vice versa*.

Die mit Hilfe der quantitativen RT-PCR durchgeführten RNAi-Analysen zeigten allerdings, dass nur eine relativ schwache endogene *LRP5L*-Expression im Vergleich zu der von *LRP5* nachgewiesen wurde. Zudem zeigten die *LRP5L-Knock down*-Versuchsansätze keine oder

allenfalls eine sehr geringfügige Herunterregulierung des endogenen Pseudogens, obwohl die verwendete siRNA mit Hilfe eines anderen Versuchsaufbaus (Transfektion von siRNA in Zellen, die LRP5L transient überexprimieren) als prinzipiell funktionstüchtig verifiziert wurde. Demnach könnte die schwache endogene *LRP5L*-Expression der Grund dafür sein, dass das hier verwendete RNAi-Analyse-System in diesem Falle keine abschließende Aussage erlaubte.

Obwohl die trans-Regulations-Hypothese des Pseudogens im Rahmen dieser Arbeit nicht bestätigt werden konnte, belegten sowohl die Aufklärung der Gen-Struktur über RACE-PCR als auch die Expressionsanalysen, dass das *LRP5L*-Pseudogen in verschiedenen humanen Geweben unterschiedlich stark exprimiert wird. Die Expressionsanalyse mit Hilfe des *Multiple-Tissue-cDNA Panels* zeigte, dass das Pseudogen in 9 von 12 analysierten humanen Geweben nachweisbar war. Jedoch konnte kein *LRP5L*-Transkript in der Northernblot-Analyse in 12 unterschiedlichen humanen RNA-Proben detektiert werden. Kohärent mit den Ergebnissen der RNAi-Experimente ist das Pseudogen demnach transkribiert, allerdings ist die endogene Expression z. B. im Vergleich zur Aktin-Expression oder *LRP5*-Expression sehr schwach. Inwiefern dieses relativ schwach exprimierte Pseudogen eine funktionelle Rolle erfüllt, ist derzeit ungeklärt und bedarf weiterer Analysen. Ein regulatorischer Mechanismus von *LRP5* durch *LRP5L* konnte somit im Rahmen dieser Arbeit *in vitro* nicht aufgezeigt werden. Die Expressionsanalysen ergaben, dass das Pseudogen in 7 gleichen Geweben (Herz, Lunge, Niere, Dünndarm, Colon, Milz und Thymus) wie *LRP5* exprimiert ist, was wiederum auf einen möglichen regulatorischen oder funktionellen Zusammenhang hindeuten könnte.

Möglicherweise könnte sich die aufgestellte Hypothese anhand anderer Analyse-Methoden bestätigen. In Anbetracht der zentralen Rolle von *LRP5* im Knochenstoffwechsel würde die Bestätigung *LRP5L* zu einem ausgezeichneten Kandidatengen für Osteoporose bzw. die Regulation der Knochendichte machen. Allerdings zeigen die bisherigen Assoziationsstudien zu Osteoporose keine Verbindung zum *LRP5L*-Lokus auf Chromosom 22. Die hohe Homologie von *LRP5L* zu *LRP5* ließe jedoch andererseits wiederum spekulieren, ob es sich bei den mit Osteoporose assoziierten häufigen *LRP5*-SNPs nicht vielleicht um einzelne *LRP5L*-spezifische DNA-Abschnitte bzw. Nukleotide handelt. Ein genauer Abgleich der mit Osteoporose assoziierten *LRP5*-SNPs mit der Pseudogen-Sequenz auf Chromosom 22 könnte darüber Aufschluss geben.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Durch positionelle Klonierung sollte das verantwortliche Gen für das in einer türkischen Familie vorliegende Fehlbildungssyndrom, welches durch Augenfehlbildungen, eine progressive Muskelatrophie und milde mentale Retardierung gekennzeichnet war, identifiziert werden. Auf diese Weise konnte eine *Compound*-Heterozygotie für zwei neuartige Mutationen im Transmembranrezeptor LRP5 identifiziert werden, der als Co-Rezeptor in der WNT/NDP-Signalkaskade fungiert und auch beim autosomal-rezessiv erblichen Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndrom (OPPG-Syndrom) mutiert ist. Die erste Mutation war eine heterozygote *in-frame* 18 bp-Deletion innerhalb eines für das LRP5-Signalpeptid kodierenden CTG-*Repeats*, wodurch lediglich 3 anstatt 9 Leucine im Signalpeptid des mutierten Allels (Mut_{3L}) vorlagen. Die zweite Mutation war eine intragenische Deletion mit einer Größe von ca. 8,2 kb. Diese führte auf mRNA-Ebene zu einer *out-of-frame* Deletion der Exons 14 bis 16 (Ex14_16del) mit einem präterminalen Stop und folglich zu einem trunkeierten Protein. Anhand von unabhängigen funktionellen *in vitro*-Analysen wurde der zelluläre Pathomechanismus beider mutierter LRP5-Proteine aufgeklärt. Es zeigte sich, dass beide mutierten LRP5-Rezeptoren stabil exprimiert wurden, aber einem aberranten intrazellulären Transport unterlagen und nicht in die Plasmamembran gelangen konnten, um Signale entlang des WNT/NDP-Signalweges zu transduzieren. Die Signalpeptid-Mutation verhinderte vollständig den cotranslationalen Transport in das Endoplasmatische Retikulum, so dass der Rezeptor ausschließlich im Cytoplasma lokalisiert war. Das für das OPPG-Syndrom untypische klinische Erscheinungsbild der untersuchten Familie, d.h. das Vorliegen einer muskulären Atrophie bei Abwesenheit einer stark ausgeprägten Osteoporose, lässt sich möglicherweise zumindest zum Teil auf die neuartigen LRP5-Mutationstypen zurückführen.

Im Rahmen der Genotypisierung von gesunden Kontroll-Individuen bestätigte sich, dass der Leucin-*Stretch* des LRP5-Signalpeptides polymorph war, wobei ca. 90% aller Allele 9 Leucine im Signalpeptid aufwiesen. Funktionellen Analysen der bei Kontroll-Individuen detektierten seltenen Signalpeptid-Varianten mit 6 bis 11 Leucinen ergaben, dass sowohl eine Verlängerung als auch eine Verkürzung des Signalpeptids dazu führten, dass weniger funktionsfähige Rezeptormoleküle gebildet wurden. Ursache hierfür war, dass jeweils ein steigender Anteil der Proteinsynthese nicht mehr im endoplasmatischen Retikulum, sondern im Cytoplasma erfolgte. Ein Teil der LRP5-Moleküle konnte somit nicht in die Zellmembran gelangen. Damit konnte erstmals ein quantitativer Effekt eines hochvariablen Sequenzelementes im Signalpeptid eines Proteins auf die Effektivität der Proteintranslation experimentell demonstriert werden. Da genomweit durch eine bioinformatische Analyse fast 400 weitere humane Proteine identifiziert werden konnten, die Bereiche mit mindestens 5 Leucinen im Signalpeptid aufwiesen, könnte dieser Mechanismus eine nicht unbedeutende

Ursache für die interindividuelle Variabilität der Proteintranslation und -expression darstellen und somit auch für die Genese komplexgenetischer Erkrankungen relevant sein.

Ein weiterer Teil dieser Doktorarbeit bestand darin, den molekulargenetischen und zellulären Pathomechanismus bei einer zweiten konsanguinen türkischen Familie aufzuklären, in der zwei Betroffene ein typisches Osteoporosis-Pseudoglioma-Syndrom aufwiesen. Es konnte in dieser Familie eine pathogene homozygote *LRP5*-Mutation identifiziert werden, die innerhalb der Familie mit dem Phänotyp co-segregierte. In Kontroll-Individuen war diese nicht nachweisbar. Es handelte sich hierbei um einen homozygoten Basenaustausch an Position +4 der *Donor Splice Site* in Intron 7. Durch Analysen an Patienten-RNA wurde nachgewiesen, dass infolge dieses Basenaustausches statt der ursprünglichen *Splice Site* eine 63 bp 3'-gelegene kryptische *Splice Site* verwendet wurde. Auf Proteinebene hatte dies eine *in frame*-Insertion von 21 zusätzlichen Aminosäuren zur Folge. Funktionelle *in vitro*-Analysen dieses mutierten *LRP5*-Proteins ergaben, dass es einem aberranten intrazellulärem Transport unterlag und folglich ebenfalls nicht mehr in der Lage war, Signale entlang der WNT/NDP-Signalkaskade zu transduzieren.

Da im humanen Genom ein exprimiertes und prozessiertes Pseudogen für *LRP5* annotiert ist, wurde des Weiteren experimentell überprüft, ob *LRP5* durch einen auf RNA-Interferenz beruhenden Mechanismus vom seinem Pseudogen *LRP5L* reguliert wird. Die bis dato unbekannte Struktur, Größe und Orientierung des *LRP5L*-Transkriptes wurde zunächst mit Hilfe von Datenbank-Analysen und RACE-PCR-Experimenten aufgeklärt. Demnach besteht das *LRP5L*-Pseudogen aus sieben Exons, die insgesamt 1740 bp umfassen. Der größte offene Leserahmen beträgt 756 bp. Mittels Expressionsanalysen wurde gezeigt, dass *LRP5L* in den Geweben Herz, Lunge, Niere, Dünndarm, Colon, Milz, Thymus, Leukozyten und Pankreas unterschiedlich relativ stark exprimiert wird. Die Hypothese einer *trans*-Regulation von *LRP5* durch sein Pseudogen konnte weder mit Hilfe eines *Luciferase Reporter Assays* (mittels Co-Transfektion von Expressionskonstrukten für *LRP5L* und *LRP5*) noch durch RNAi-Analysen (anhand von Zelllinien mit endogener *LRP5L*- und *LRP5*- Expression) *in vitro* bestätigt werden.

5 ABSTRACT

For identification of the gene responsible for the combination of blindness, progressive muscle atrophy and mild mental retardation observed in a Turkish family, a positional cloning approach was carried out. Compound heterozygosity for two novel types of mutation were detected in the transmembrane receptor LRP5, a co-receptor of the WNT/NDP signaling cascade. Mutations in *LRP5* underlie autosomal recessive osteoporosis pseudoglioma syndrome (OPPG). One mutation was an in-frame deletion of 18 bp within the signal peptide coding for a CTG-repeat, which removed 6 out of 9 consecutive leucine residues of the LRP5 signal peptide (Mut_{3L}). The second mutation due to nonhomologous recombination between Alu repeat sequences resulted in the deletion of exons 14 to 16. This presumably leads to the production of a nonfunctional, truncated, and frameshifted polypeptide, if expressed. Different independent functional in vitro assays resulted in the elucidation of the underlying pathomechanisms for both mutations. The mutant proteins were stably expressed but underwent aberrant intracellular transport. This impaired the ability of WNT/NDP signal transduction for both mutant receptors due to not reaching the plasmamembrane. The signal peptide mutation abolished the entry of the polypeptide into the endoplasmic reticulum (ER), therefore retaining the mutant protein in the cytoplasm. The uncharacteristic features for OPPG, notably muscular atrophy without severe osteoporosis, may be attributable to the novel types of mutation.

Genotyping of control individuals confirmed that the length of the LRP5 signal peptide poly-leucine repeat is polymorphic in the general population and 90% of the detected alleles contained 9 leucines. Importantly, independent in vitro assays demonstrated that enlargement or reduction of the 9 leucine stretch quantitatively affected receptor processing and signal transduction. This was due to partial retention of the proteins in the cytoplasm and resulted in a decreased amount of functional receptor in the plasma membrane. Therefore, it could be for the first time experimentally demonstrated that variability of a signal peptide element has a quantitative effect on protein translation efficiency. Due to identification through a genome-wide search of nearly 400 human proteins that contain at least five consecutive leucine repeats within their signal peptide, this polymorphism may be physiologically relevant in vivo. It possibly constitutes a source of interindividual variability of protein translation and expression which might be relevant for complex diseases.

A further part of this PhD thesis included the clarification of the molecular and cellular pathomechanism of a second Turkish family affected by typical OPPG syndrome. One new pathogenic homozygous mutation in LRP5 was identified that co-segregated perfectly with the phenotype among the family and was absent in control individuals. This mutation was a single base substitution at position +4 of the donor splice site in intron 7. Analysis of patient's

RNA showed that this change leads to a preference of a 63 bp 3'-located cryptic splice site instead of the original splice site resulting in a in frame insertion of 21 amino acids. Functional in vitro analysis of this mutant receptor demonstrated an impaired intracellular transport of the protein which abolished signal transduction through the WNT/NDP signaling pathway.

Due to the occurrence of an expressed and processed pseudogene (*LRP5L*) of *LRP5* annotated in the human genome, RNA interference (RNAi)-experiments were performed to investigate a presumable regulatory effect of *LRP5L* on *LRP5*. Based on in silico and RACE analysis the yet unknown pseudogene structure, size and transcript orientation were elucidated. *LRP5L* consists of 7 exons with 1740 bp in size and a biggest open reading frame of 756 bp. Expression analysis showed different expression levels of *LRP5L* in 9 out of 12 examined human cDNAs, namely heart, lung, kidney, small intestine, colon, spleen, thymus, leucocytes and pancreas. Neither a luciferase reporter assay (with co-transfection of vectors coding for *LRP5L* and *LRP5* cDNA) nor RNAi analysis (in cell lines with endogenous *LRP5L* and *LRP5* expression) confirmed the hypothesis of trans-regulation of *LRP5* by its pseudogene *LRP5L*.

6 LITERATURVERZEICHNIS

Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. (2001) GRR: graphical representation of relationship errors. *Bioinformatics*. 17(8):742-3.

Abecasis GR, Cherny SS, Cookson WO, Cardon LR. (2002) Merlin--rapid analysis of dense genetic maps using sparse gene flow trees. *Nat Genet*. 30(1):97-101.

Aberle H, Bauer A, Stappert J, Kispert A, Kemler R. (1997) Beta-catenin is a target for the ubiquitinproteasome pathway. *EMBO*. 16:3797-3804.

Abifadel M, Bernier L, Dubuc G, Nuel G, Rabe`s JP, Bonneau J, Marques A, Marduel M, Devillers M, Erlich D, Varret M, Roy M, Davignon J, Boileau C. (2008) A PCSK9 variant and familial combined hyperlipidemia. *J. Med. Genet*. 45(12):780-6.

Abifadel M, Varret M, Rabe`s JP, Allard D, Ouguerram K, Devillers M, Cruaud C, Benjannet S, Wickham L, Erlich D, Derré A, Ville´ger L, Farnier M, Beucler I, Bruckert E, Chambaz J, Chanu B, Lecerf JM, Luc G, Moulin P, Weissenbach J, Prat A, Krempf M, Junien C, Seidah NG, Boileau C. (2003) Mutations in PCSK9 cause autosomal dominant hypercholesterolemia. *Nat. Genet*. 34:154-156.

Achiron R, Kreiser D, Achiron A. (2000) Axial growth of the fetal eye and evaluation of the hyaloid artery: in utero ultrasonographic study. *Prenat Diagn*. 20(11):894-9.

Ai M, Heeger S, Bartels CF, Schelling DK. (2005) Clinical and molecular findings in osteoporosis-pseudoglioma syndrome. *Am. J. Hum. Genet*. 77:741-753.

Ai M, Holmen SL, Van Hul W, Williams BO, Warman ML. (2005) Reduced affinity to and inhibition by DKK1 form a common mechanism by which high bone mass-associated missense mutations in LRP5 affect canonical Wnt signaling. *Mol. Cell Biol*. 25:4946-55.

Alwine JC, Kemp DJ, Stark GR. (1977) Method for detection of specific RNAs in agarose gels by transfer to diazobenzyloxymethyl-paper and hybridization with DNA probes. *Proc. Natl. Acad. Sci*. 74 (12):5350-4.

Amsellem S, Briffaut D, Carrié A, Rabès JP, Girardet JP, Fredenrich A, Moulin P, Krempf M, Reznik Y, Vialettes B, de Gennes JL, Bruckert E, Benlian P. (2002) Intronic mutations outside of Alu-repeat-rich domains of the LDL receptor gene are a cause of familial hypercholesterolemia. *Hum. Genet*. 111(6):501-10.

Anderson JA, Fisch R, Miller E, Doeden D. (1966) Atypical phenylketonuric heterozygote. Deficiency in phenylalanine hydroxylase and transaminase activity. *J. Pediatr*. 68(3):351-360.

Antonarakis SE and the Nomenclature Working Group. (1998) Recommendations for a Nomenclature System for Human Gene Mutations. *Hum. Mutat*. 11:1-3.

Avery OT, Dubos R. (1930) The specific action of a bacterial enzyme on pneumococci of Type III. *Science*. 72:151-152.

Avery OT. (1944) Studies on the chemical nature of the substance inducing transformation of pneumococcal types. *J. experim. Med*. 79:137-158.

- Avigad S, Kleiman S, Weinstein M, Cohen BE, Schwartz G, Woo SL, and Shiloh Y. (1991) Compound heterozygosity in nonphenylketonuria hyperphenylalanemia: The contribution of mutations for classical phenylketonuria". *Am. J. Hum. Genet.* 49 (2):393-399.
- Balakirev ES, Ayala FJ. (2003) Pseudogenes: Are they »junk« or functional DNA? *Annual Rev.Genet.* 37:123-151.
- Barreiro LB, Laval G, Quach H, Patin E, Quintana-Murci L. (2008) Natural selection has driven population differentiation in modern humans. *Nat Genet* 40:340-345.
- Behrens J, von Kries JP, Kühl M, Bruhn L, Wedlich D, Grosschedl R, Birchmeier W. (1996) Functional interaction of beta-catenin with the transcription factor LEF-1. *Nature.* 382:638-42.
- Beltran-Valero De Bernabe D, Currier S, Steinbrecher A, Celli J, Van Beusekom E, Van Der Zwaag B, Kayserili H, Merlini L, Chitayat D, Dobyns WB, Cormand B, Lehesjoki AE, Cruces J, Voit T, Walsh CA, Van Bokhoven H, Brunner HG. (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.
- Bendtsen JD, Nielsen H, von Heijne G, Brunak S. (2004) Improved prediction of signal peptides: SignalP 3.0. *J Mol Biol* 340:783-795.
- Benson G. (1999) Tandem repeats finder: a program to analyze DNA sequences. *Nucleic Acids Res.* 27:573-580.
- Bergman LM, Blaydes JP. (2006) C-terminal binding proteins: emerging roles in cell survival and tumorigenesis. *Apoptosis.* 11(6):879-88.
- Bhanot P, Brink M, Samos CH, Hsieh JC, Wang Y, Macke JP, Andrew D, Nathans J, Nusse R. (1996) A new member of the frizzled family from *Drosophila* functions as a Wingless receptor. *Nature.* 382:225-230.
- Bieri S, Djordjevic JT, Daly NL, Smith R, Kroon PA. (1995) Disulfide bridges of a cysteine-rich repeat of the LDL receptor ligand-binding domain. *Biochemistry.* 34(40):13059-65.
- Birnboim HC, Doly J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* 7:1513-23.
- Boehnke M. (1994) Limits of resolution of genetic linkage studies: implications for the positional cloning of human disease genes. *Am. J. Hum. Genet.* 55:379-90.
- Boekholdt SM, Peters RJ, Fountoulaki K, Kastelein JJ, Sijbrands EJ. (2003) Molecular variation at the apolipoprotein B gene locus in relation to lipids and cardiovascular disease: a systematic meta-analysis. *Hum. Genet.* 113:417-425.
- Bollerslev J, Wilson SG, Dick IM, Islam FM, Ueland T, Palmer L, Devine A, Prince RL. (2005) LRP5 gene polymorphisms predict bone mass and incident fractures in elderly Australian women. *Bone.* 36:599-606.
- Bolz H, von Brederlow B, Ramírez A, Bryda EC, Kutsche K, Nothwang HG, Seeliger M, del C-Salcedó Cabrera M, Vila MC, Molina OP, Gal A, Kubisch C. (2001) Mutation of CDH23, encoding a new member of the cadherin gene family, causes Usher syndrome type 1D. *Nat Genet.* 27(1):108-12.
- Boutros M, Mlodzik M. (1999) Dishevelled: at the crossroads of divergent intracellular signaling pathways. *Mech. Dev.* 83:27-37.

- Boyden LM, Mao J, Belsky J, Mitzner L, Farhi A, Mitnick MA, Wu D, Insogna K, Lifton RP. (2002) High bone density due to a mutation in LDL-receptor-related protein 5. *N. Engl. J. Med.* 346:1513-21.
- Brannon M, Gomperts M, Sumoy L, Moon RT, Kimelman D. (1997) A beta-catenin/XTcf-3 complex binds to the siamois promoter to regulate dorsal axis specification in *Xenopus*. *Genes and development.* 11:2359-2370.
- Buratti E, Chivers M, Královiová J, Romano M, Baralle M, Krainer AR, Voechovsk I. (2007) Aberrant 5' Splice Sites in human disease genes: mutation pattern, nucleotide structure and comparison of computational tools that predict their utilization. *Nucleic Acids Res.* 35(13):4250-4263.
- Burge C, Samuel Karlin S. (1997) Prediction of Complete Gene Structures in Human Genomic DNA *J. Mol. Biol.* 268:78-94.
- Cadigan KM and Liu YI. (2006) Wnt signaling: complexity at the surface. *J. Cell Sci.* 119:395-402.
- Cawthon RM, O'Connell P, Buchberg AM, Viskochil D, Weiss RB, Culver M, Stevens J, Jenkins NA, Copeland NG, White R. (1990) Identification and characterization of transcripts from the neurofibromatosis 1 region: the sequence and genomic structure of EVI2 and mapping of other transcripts. *Genomics.* 7(4):555-65.
- Cawthon RM, Weiss R, Xu GF, Viskochil D, Culver M, Stevens J, Robertson M, Dunn D, Gesteland R, O'Connell P. (1990) A major segment of the neurofibromatosis type 1 gene: cDNA sequence, genomic structure, and point mutations. *Cell.* 62(1):193-201.
- Chan-Ling T, McLeod DS, Hughes S, Baxter L, Chu Y, Hasegawa T, Luttly GA. (2004) Astrocyte-endothelial cell relationships during human retinal vascular development. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 45(6):2020-32.
- Chen W, ten Berge D, Brown J. (2003) Dishevelled 2 recruits beta-arrestin 2 to mediate Wnt5A-stimulated endocytosis of Frizzled 4. *Science.* 301:1391-1394.
- Chen ZY, Battinelli EM, Fielder A, Bunday S, Sims K, Breakefield XO, Craig IW. (1993) A mutation in the Norrie disease gene (NDP) associated with X-linked familial exudative vitreoretinopathy. *Nat. Genet.* 5:180-183.
- Cheung WM, Jin LY, Smith DK, Cheung PT, Kwan EY, Low L, Kung AW. (2006) A family with osteoporosis pseudoglioma syndrome due to compound heterozygosity of two novel mutations in the LRP5 gene. *Bone.* 39(3):470-6.
- Clevers H. (2004) Wnt Signalling: Ig-Norrin the Dogma. *Current Biol.* 14:436-437.
- Cormand B, Pihko H, Bayes M, Valanne L, Santavuori P, Talim B, Gershoni-Baruch R, Ahmad A, van Bokhoven H, Brunner HG, Voit T, Topaloglu H, Dobyns WB, Lehesjoki AE. (2001) Clinical and genetic distinction between Walker-Warburg syndrome and muscle-eye-brain disease. *Neurology.* 56:1059-1069.
- Costa FF. (2007) Non-coding RNAs: lost in translation? *Gene.* 386:1-10.
- Coutinho G, Xie J, Du L, Brusco A, Krainer AR, Gatti RA. (2005) Functional significance of a deep intronic mutation in the ATM gene and evidence for an alternative exon 28a. *Hum. Mutat.* 25:118-124.

- Crabbe P, Balemans W, Willaert A, van Pottelbergh I, Cleiren E, Coucke PJ, Ai M, Goemaere S, van Hul W, de Paepe A, Kaufman JM. (2005) Missense mutations in LRP5 are not a common cause of idiopathic osteoporosis in adult men. *J Bone Miner Res.* 20(11):1951-9.
- Crisponi L, Crisponi G, Meloni A, Toliat MR, Nurnberg G, Usala G, Uda M, Masala M, Hohne W, Becker C, Marongiu M, Chiappe F, Kleta R, Rauch A, Wollnik B, Strasser F, Reese T, Jakobs C, Kurlemann G, Cao A, Nürnberg P, Rutsch F. (2007) Crisponi syndrome is caused by mutations in the CRLF1 gene and is allelic to cold-induced sweating syndrome type 1. *Am. J. Hum. Genet.* 80:971-981.
- Czech B, Malone CD, Zhou R, Stark A, Schlingeheyde C, Dus M, Perrimon N, Kellis M, Wohlschlegel JA, Sachidanandam R, Hannon GJ, Brennecke J. (2008) An endogenous small interfering RNA pathway in Drosophila. *Nature.* 453(7196):798-802.
- Deininger PL, Batzer MA. (1999) Alu repeats and human disease. *Mol. Genet. Metab.* 67(3):183-93.
- Den Dunnen JT, Antonarakis SE. (2000) Mutation Nomenclature Extensions and Suggestions to Describe Complex Mutations: A Discussion, *Hum. Mutat.* 15:7-12.
- Dobyns WB, Pagon RA, Armstrong D, Curry CJ, Greenberg F, Grix A, Holmes LB, Laxova R, Michels VV, Robinow M. (1989) Diagnostic criteria for Walker-Warburg syndrome. *Am. J. Med. Genet.* 32:195-210.
- Downey LM, Keen TJ, Roberts E, Mansfield DC, Bamashmus M, Inglehearn CF. (2001) A new for autosomal dominant familial exudative vitreoretinopathy maps to chromosome 11p12-13. *Am. J. Hum. Genet.* 68:778-781.
- Dunning AM, Ellis PD, McBride S, Kirschenlohr HL, Healey CS, Kemp PR, Luben RN, Chang-Claude J, Mannermaa A, Kataja V, Pharoah PD, Easton DF, Ponder BA, Metcalfe JC. (2003) A transforming growth factorbeta1 signal peptide variant increases secretion in vitro and is associated with increased incidence of invasive breast cancer. *Cancer Res.* 63:2610-2615.
- Emanuelsson O, Brunak S, von Heijne G, Nielsen H. (2007) Locating proteins in the cell using TargetP, SignalP and related tools. *Nat. Protoc.* 2:953-971.
- ENCODE Project Consortium. (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. 447(7146):799-816.
- Fang M, Li J, Blauwkamp T, Bhambhani C, Campbell N, Cadigan KM. (2006) C-terminal binding protein directly activates and represses Wnt transcriptional targets in Drosophila. *EMBO J.* 25(12):2735-45.
- Farr GH, Ferkey DM, Yost C, Pierce SB, Weaver C, Kimelman D. (2000) Interaction among GSK-3, GBP, axin, and APC in Xenopus axis specification. *J. Cell Biol.* 148:691-702.
- Fass D, Blacklow S, Kim PS, Berger JM. (1997) Molecular basis of familial hypercholesterolaemia from structure of LDL receptor module. *Nature.* 388(6643):691-3.
- Felgner PL, Gadek TR, Holm M, Roman R, Chan HW, Wenz M, Northrop JP, Ringold GM and Danielsen M. (1987) Lipofection: a highly efficient, lipid-mediated DNA-transfection procedure. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:7413-7.
- Ferrari SL, Deutsch S, Baudoin C, Cohen-Solal M, Ostertag A, Antonarakis SE, Rizzoli R, de Vernejoul MC. (2005) LRP5 gene polymorphisms and idiopathic osteoporosis in men. *Bone.* 37:770-5.

Ferrari SL, Deutsch S, Choudhury U, Chevalley T, Bonjour JP, Dermitzakis ET, Rizzoli R, Antonarakis SE. (2004) Polymorphisms in the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with variation in vertebral bone mass, vertebral bone size, and stature in whites. *Am. J. Hum. Genet.* 74:866-75.

Figuroa DJ, Hess JF, Ky B, Brown SD, Sandig V, Hermanowski-Vosatka A, Twells RCJ, Todd JA, Austin CP. (2000) Expression of the Type I Diabetes-associated Gene LRP5 in Macrophages, Vitamin A System Cells, and the Islets of Langerhans Suggests Multiple Potential Roles in Diabetes. *J. Histochem. Cytochem.* 48:1357-1368.

Fire A, Xu S, Montgomery MK, Kostas SA, Driver SE, Mello CC. (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature.* 391: 806-811.

Folkman J, Klagsbrun M (1987) Angiogenetic factors. *Science.* 235: 442-447.

Fountain JW, Wallace MR, Bruce MA, Seizinger BR, Menon AG, Gusella JF, Michels VV, Schmidt MA, Dewald GW, Collins FS. (1989) Physical mapping of a translocation breakpoint in neurofibromatosis. *Science.* 244(4908):1085-7.

Frost H, Schönau E (2000) The „muscle-bone-unit“ in children and adolescents: A 2000 overview. *J Ped Endocrinol Metab* 13: 571-580.

Fujino T, Asaba H, Kang MJ, Ikeda Y, Sone H, Takada S, Kim DH, Ioka RX, Ono M, Tomoyori H, Okubo M, Murase T, Kamataki A, Yamamoto J, Magoori K, Takahashi S, Miyamoto Y, Oishi H, Nose M, Okazaki M, Usui S, Imaizumi K, Yanagisawa M, Sakai J, Yamamoto TT. (2003) Low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) is essential for normal cholesterol metabolism and glucose-induced insulin secretion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100(1):229-234.

Ghildiyal M, Seitz H, Horwich MD, Li C, Du T, Lee S, Xu J, Kittler EL, Zapp ML, Weng Z, Zamore PD. (2008) Endogenous siRNAs derived from transposons and mRNAs in *Drosophila* somatic cells. *Science.* 320(5879):1077-81.

Gille JJ, Hogervorst FB, Pals G, Wijnen JT, van Schooten RJ, Dommering CJ, Meijer GA, Craanen ME, Nederlof PM, de Jong D, McElgunn CJ, Schouten JP, Menko FH (2002) Genomic deletions of MSH2 and MLH1 in colorectal cancer families detected by a novel mutation detection approach. *Br J Cancer.* 87(8):892-7.

Gong Y, Slee RB, Fukai N, Rawadi G, Roman-Roman S, Reginato AM, Wang H, Cundy T, Glorieux FH, Lev D, Zacharin M, Oexle K, Marcelino J, Suwairi W, Heeger S, Sabatakos G, Apte S, Adkins WN, Allgrove J, Arslan-Kirchner M, Batch JA, Beighton P, Black GC, Boles RG, Boon LM, Borrone C, Brunner HG, Carle GF, Dallapiccola B, De Paepe A, Floege B, Halfhide ML, Hall B, Hennekam RC, Hirose T, Jans A, Juppner H, Kim CA, Keppler-Noreuil K, Kohlschuetter A, LaCombe D, Lambert M, Lemyre E, Letteboer T, Peltonen L, Ramesar RS, Romanengo M, Somer H, Steichen-Gersdorf E, Steinmann B, Sullivan B, Superti-Furga A, Swoboda W, van den Boogaard MJ, Van Hul W, Vikkula M, Votruba M, Zabel B, Garcia T, Baron R, Olsen BR, Warman ML. (2001) LDL receptor-related protein 5 (LRP5) affects bone accrual and eye development. *Cell.* 107:513-523.

Gong Y, Vikkula M, Boon L, Liu J, Beighton P, Ramesar R, Peltonen L, Somer H, Hirose T, Dallapiccola B, De Paepe A, Swoboda W, Zabel B, Superti-Furga A, Steinmann B, Brunner HG, Jans A, Boles RG, Adkins W, van den Boogaard MJ, Olsen BR, Warman ML. (1996) Osteoporosis-pseudoglioma syndrome, a disorder affecting skeletal strength and vision, is assigned to chromosome region 11q12-13. *Am. J. Hum. Genet.* 59(1):146-51.

- Gonzalez-Redondo JM, Stoming TA, Lanclos KD (1988) Clinical and genetic heterogeneity in black patients with homozygous beta-thalassemia from the southeastern United States. *Blood*. 72(3):1007-1014.
- Gray TA, Wilson A, Fortin PJ, Nicholls RD. (2006) The putatively functional Mkrn1-p1 pseudogene is neither expressed nor imprinted, nor does it regulate its source gene in trans. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 103(32):12039-44.
- Habas R, Dawid IB. (2005) Dishevelled and Wnt signaling: is the nucleus the final frontier? *J. Biol.* 4(1):2.
- Harland M, Mistry S, Bishop DT, Bishop JA. (2001) A deep intronic mutation in CDKN2A is associated with disease in a subset of melanoma pedigrees. *Hum. Mol. Genet.* 10:2679-86.
- Hartikka H, Makitie O, Mannikko M, Doria AS, Daneman A, Cole WG, Ala-Kokko L, Sochett EB. (2005) Heterozygous mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene are associated with primary osteoporosis in children. *J. Bone Miner. Res.* 20:783-789.
- He X, Semenov M, Tamai K, Zeng X. (2004) LDL receptor-related proteins 5 and 6 in Wnt/beta-catenin signaling: arrows point the way. *Development* 131:1663-1677.
- Hey PJ, Twells RC, Phillips MS, Yusuke Nakagawa, Brown SD, Kawaguchi Y, Cox R, Guochun Xie, Dugan V, Hammond H, Metzker ML, Todd JA, Hess JF. (1998) Cloning of a novel member of the low-density lipoprotein receptor family. *Gene*. 216(1):103-11.
- Herz J, Bock H. (2002) Lipoprotein Receptors in the Nervous System. *Annu. Rev. Biochem.* 71:405-34.
- Higuchi R, Dollinger G, Walsh, PS, and Griffith R. (1992) Simultaneous amplification and detection of specific DNA sequences. *Biotechnology*. 10:413-417.
- Higuchi R, Fockler C, Dollinger G, and Watson R. (1993) Kinetic PCR: Real time monitoring of DNA amplification reactions. *Biotechnology*. 11:1026-1030.
- Hirotsune, S., Yoshida, N., Chen, A., Garrett, L., Sugiyama, F., Takahashi, S., Yagami, K., Wynshaw-Boris, A. and Yoshiki, A. (2003) An expressed pseudogene regulates the messenger-RNA stability of its homologous coding gene. *Nature* 423:91-6.
- Hirschhorn JN. (2005) Genetic approaches to studying common diseases and complex traits. *Pediatr. Res*, 57:74R-77R.
- Hobbs HH, Russel DW, Brown MS, Golding JL. (1990) The LDL receptor locus in familial hypercholesterolaemia: mutational analysis of a membrane protein. *Annu. Rev. Genet.* 24:133-170.
- Hogervorst FB, Nederlof PM, Gille JJ, McElgunn CJ, Grippeling M, Pruntel R, Regnerus R, van Welsem T, van Spaendonk R, Menko FH, Kluijdt I, Dommering C, Verhoef S, Schouten JP, van't Veer LJ, Pals G. (2003) Large genomic deletions and duplications in the BRCA1 gene identified by a novel quantitative method. *Cancer Res.* 63(7):1449-53.
- Hsieh JC, Lee L, Zhang L, Wefer S, Brown K, DeRossi C, Wines ME, Rosenquist T, Holdener BC. (2003) Mesd encodes an LRP5/6 chaperone essential for specification of mouse embryonic polarity. *Cell* 112:355-367.
- Huang HC, Klein PS. (2004) The Frizzled family: receptors for multiple signal transduction pathways. *Genome Biol.* 5:234.

- Hughes AE, Ralston SH, Marken J, Bell C, MacPherson H, Wallace RG, van Hul W, Whyte MP, Nakatsuka K, Hovy L, Anderson DM. (2000) Mutations in TNFRSF11A, affecting the signal peptide of RANK, cause familial expansile osteolysis. *Nat. Genet.* 24:45-48.
- Hughes S, Yang H, Chan-Ling T. (2000) Vascularization of the human fetal retina: roles of vasculogenesis and angiogenesis. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 41(5):1217-28.
- Hutchison CA, Phillips S, Edge MH. (1978) Mutagenesis at a specific position in a DNA sequence. In: *J. Biol. Chem. Bd.* 253, S. 6551-6560.
- Jeffreys AJ, Neumann R. (2009) The rise and fall of a human recombination hot spot. *Nat. Genet.* Apr 6. [Epub ahead of print]
- Ji W, Foo JN, O'Roak BJ, Zhao H, Larson MG, Simon DB, Newton-Cheh C, State MW, Levy D, Lifton RP. (2008) Rare independent mutations in renal salt handling genes contribute to blood pressure variation. *Nat. Genet.* 40(5):495-6.
- Jiao X, Ventruto V, Trese MT, Shastry BS, Hejtmancik JF. (2004) Autosomal recessive familial exudative vitreoretinopathy is associated with mutations in LRP5. *Am. J. Hum. Genet.* 75:878-884.
- Johnson ML, Harnish K, Nusse R, Van Hul W. (2004) LRP5 and Wnt signaling: a union made for bone. *J. Bone Miner. Res.* 19:1749-1757.
- Kadmas JL, Beckerle MC. (2004) The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5:920-931.
- Kawamura Y, Saito K, Kin T, Ono Y, Asai K, Sunohara T, Okada TN, Siomi MC, Siomi H. (2008) Drosophila endogenous small RNAs bind to Argonaute 2 in somatic cells. *Nature.* 453(7196):793-7.
- Keller R. (2002) Shaping the vertebrate body plan by polarized embryonic cell movements. *Science.* 298:1950-1954.
- Kelly OG, Pinson KI, Skarnes WC. (2004) The Wnt co-receptors Lrp5 and Lrp6 are essential for gastrulation in mice. *Dev.* 131:2803-2815.
- Kerem B, Rommens JM, Buchanan JA, Markiewicz D, Cox TK, Chakravarti A. (1989) Identification of the cystic fibrosis gene: genetic analysis. *Science* 245:1073-80.
- Kiel DP, Demissie S, Dupuis J, Lunetta KL, Murabito JM, Karasik D. (2007) Genome-wide association with bone mass and geometry in the Framingham Heart Study. *BMC Med. Genet.* 19:8 Suppl 1:S14.
- Kiel DP, Ferrari SL, Cupples LA, Karasik D, Manen D, Imamovic A, Herbert AG, Dupuis J. (2007) Genetic variation at the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 (LRP5) locus modulates Wnt signaling and the relationship of physical activity with bone mineral density in men. *Bone.* 40(3):587-96.
- Kim DH, Inagaki Y, Suzuki T, Ioka RX, Yoshioka SZ, Magoori K, Kang MJ, Cho Y, Nakano AZ, Liu Q, Fujino T, Suzuki H, Sasano H, Yamamoto TT. (1998) A new low density lipoprotein receptor related protein, LRP5, is expressed in hepatocytes and adrenal cortex, and recognizes apolipoprotein E *J Biochem.* 124(6):1072-6.
- King K, Flinter FA, Nihalani V, Green PM. (2002) Unusual deep intronic mutations in the COL4A5 gene cause X linked Alport syndrome. *Hum. Genet.* 111:548-554.

Kiraly O, Boulling A, Witt H, Le Marechal C, Chen JM, Rosendahl J, Battaggia C, Wartmann T, Sahin-Toth M, Ferec C. (2007) Signal peptide variants that impair secretion of pancreatic secretory trypsin inhibitor (SPINK1) cause autosomal dominant hereditary pancreatitis. *Hum. Mutat.* 28:469-476.

Kley N, Whaley J, Seizinger BR. (1995) Neurofibromatosis type 2 and von Hippel-Lindau disease: from gene cloning to function. *Glia.* 15:297-307.

Koay MA, Brown MA. (2005) Genetic disorders of the LRP5-Wnt signalling pathway affecting the skeleton. *Trends Mol. Med.* 11:29-37.

Koay MA, Woon PY, Zhang Y, Miles LJ, Duncan EL, Ralston SH, Compston JE, Cooper C, Keen R, Langdahl BL. (2004) Influence of LRP5 polymorphisms on normal variation in BMD. *J. Bone Miner. Res.* 19:1619-27.

Kobayashi K, Nakahori Y, Miyake M, Matsumura K, Kondo-lida 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.* 394:388-392.

Kondo-lida E, Kobayashi K, Watanabe M, Sasaki J, Kumagai T, Koide H, Saito K, Osawa M, Nakamura Y, Toda T. (1999) Novel mutations and genotype-phenotype relationships in 107 families with Fukuyama-type congenital muscular dystrophy (FCMD) *Hum. Mol. Genet.* 8: 2303-2309.

Korinek V, Barker N, Morin PJ, van Wichen D, de Weger R, Kinzler KW, Vogelstein B, Clevers H. (1997) Constitutive transcriptional activation by a beta-catenin-Tcf complex in APC-/- colon carcinoma. *Science* 275:1784-1787.

Korneev SA, Park JH, O'Shea M. (1999) Neuronal expression of neural nitric oxide synthase (nNOS) protein is suppressed by an antisense RNA transcribed from an NOS pseudogene. *J Neurosci.* 19(18):7711-20.

Kozak M. (1986) Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell.* 44(2):283-92.

Kozak M. (1987) An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs. *Nucleic Acids Res.* 15(20):8125-8148.

Kruglyak L, Daly MJ, Reeve-Daly MP, Lander ES. (1996) Parametric and nonparametric linkage analysis: a unified multipoint approach. *Am. J. Hum. Genet.* 58(6):1347-63.

Kühl M, Geis K, Sheldahl LC, Pukrop T, Moon RT, Wedlich D. (2001) Antagonistic regulation of convergent extension movements in *Xenopus* by Wnt/ β -catenin and Wnt/Ca²⁺ signaling. *Mech. Dev.* 106:61-76.

Kuhl M, Sheldahl LC, Malbon CC, Moon RT. (2000) Ca²⁺/calmodulin-independent protein kinase II is stimulated by Wnt and Frizzled homologs and promotes ventral cell fates in *Xenopus*. *J. Biol. Chem.* 275:12701-12711.

Laemmli UK. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-5.

Lehrman MA, Schneider WJ, Sudhof TC, Brown MS, Goldstein JL, Russell DW. (1985) Mutation in LDL receptor: Alu-Alu recombination deletes exons encoding transmembrane and cytoplasmic domains. *Science.* 4683:140-146.

- Logan CY, Nusse R. (2004) The Wnt signaling pathway in development and disease. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 20:781-810.
- Lohmueller KE, Pearce CL, Pike M, Lander ES, Hirschhorn JN. (2003) Meta-analysis of genetic association studies supports a contribution of common variants to susceptibility to common disease. *Nat. Genet.* 33:177-82.
- Malbon CC, Wang HY. (2006) Dishevelled: a mobile scaffold catalyzing development. *Curr. Top. Dev. Biol.* 72:153-66.
- Mao J, Wang J, Liu B. (2001) Low-density lipoprotein receptor-related protein-5 binds to Axin and regulates the canonical Wnt signaling pathway. *Mol. Cell.* 7:801-809.
- Marsh M, Schmid S, Kern H, Harms E, Male P, Mellman I, Helenius A. (1987) Rapid analytical and preparative isolation of functional endosomes by free flow electrophoresis. *J. Cell Biol.* 104:875-886.
- Mattick JS. (2001) Non-coding RNAs: the architects of eukaryotic complexity. *EMBO Rep.* 2:986-91.
- Mattick JS. (2004) RNA regulation: a new genetics? *Nat. Rev. Genet.* 5:316-23.
- Mattick JS, Makunin IV. (2006) Non-coding RNA. *Hum. Mol. Genet.* 15:R17-R29.
- Maxam A, Gilbert W. (1977) A new method of sequencing DNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.* Bd. 74, S. 560-564.
- Maxam AM, Gilbert W. (1980) Sequencing end-labeled DNA with base-specific chemical cleavages. *Methods Enzymol.* 65:499-560.
- Meindl A, Berger W, Meitinger T, van de Pol D, Achatz H, Dorner C, Haasemann M, Hellebrand H, Gal A, Cremers F. (1992) Norrie disease is caused by mutations in an extracellular protein resembling C-terminal globular domain of mucins. *Nat. Genet.* 2:139-143.
- Meitinger T, Meindl A, Bork P, Rost B, Sander C, Haasemann M, Murken J. (1993) Molecular modelling of the Norrie disease protein predicts a cystine knot growth factor tertiary structure. *Nat. Genet.* 5:376-380.
- van Meurs JB, Rivadeneira F, Jhamai M, Hagens W, Hofman A, van Leeuwen JP, Pols HA, Uitterlinden AG. (2006) Common genetic variation of the low-density lipoprotein receptor-related protein 5 and 6 genes determines fracture risk in elderly white men. *J. Bone Miner. Res.* 21:141-50.
- van Meurs JB, Trikalinos TA, Ralston SH, Balcells S, Brandi ML, Brixen K, Kiel DP, Langdahl BL, Lips P, Ljunggren O, Lorenc R, Obermayer-Pietsch B, Ohlsson C, Pettersson U, Reid DM, Rousseau F, Scollen S, Van Hul W, Agueda L, Akesson K, Benevolenskaya LI, Ferrari SL, Hallmans G, Hofman A, Husted LB, Kruk M, Kaptoge S, Karasik D, Karlsson MK, Lorentzon M, Masi L, McGuigan FE, Mellstrom D, Mosekilde L, Nogues X, Pols HA, Reeve J, Renner W, Rivadeneira F, van Schoor NM, Weber K, Ioannidis JP, Uitterlinden AG; GENOMOS Study. (2008) Large-scale analysis of association between LRP5 and LRP6 variants and osteoporosis. *JAMA* 299:1277-1290.

- Michele DE, Barresi R, Kanagawa M, Saito F, Cohn RD, Satz JS, Dollar J, Nishino I, Kelley RI, Somer H, Straub V, Mathews KD, Moore SA, Campbell KP. (2002) Post translational disruption of dystroglycan-ligand interactions in congenital muscular dystrophies. *Nature*. 418:417-422.
- Miller S, Dykes D, Polesky H. (1988) A simple salting out procedure for extracting DNA from human nucleated cells. *Nucl. Acid. Res.* 1216:1215.
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. (2004) Wnt an β -catenin signalling: Diseases and therapies. *Nat. Genet.* 5: 689-699.
- Moon RT, Kohn AD, De Ferrari GV, Kaykas A. (2004) WNT and beta-catenin signalling: diseases and therapies. *Nat. Rev. Genet.* 5:691-701.
- Moore SA, Saito F, Chen J, Michele DE, Henry MD, Messing A, Cohn RD, Ross-Barta SE, Westra S, Williamson RA, Hoshi T, Campbell KP. (2002) Deletion of brain dystroglycan recapitulates aspects of congenital muscular dystrophy. *Nature*. 418:422-425.
- Morgan NV, Tipping AJ, Joenje H, Mathew CG. (1999) High Frequency of Large Intragenic Deletions in the Fanconi Anemia Group A Gene *Am. J. Hum. Genet.* 65:1330-1341.
- Mullis KB, Faloona FA. (1987) Specific synthesis of DNA in vitro via a polymerase-catalyzed chain reaction. *Methods Enzymol.* 155:335-50.
- Nathans D, Smith HO. (1975) Restriction endonucleases in the analysis and restructuring of DNA molecules. *Annu. Rev. Biochem.* 44:273-93.
- Nathans J, Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K. (2004) Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell*. 116:883-895.
- Nelson WJ, Nusse R. (2004) Convergence of Wnt, β -Catenin, and Cadherin Pathways. *Science*. 303:1483-1487.
- Neu C, Manz F, Rauch F, Merkel A, Schoenau E (2001) Bone densities and bone size at the distal radius in healthy children and adolescents: A study using peripheral quantitative computed tomography. *Bone*; 28(2): 227-232.
- Nissen PH, Damgaard D, Stenderup A, Nielsen GG, Larsen ML, Færgeman O. (2006) Genomic characterization of five deletions in the LDL receptor gene in Danish Familial Hypercholesterolemic subjects. *BMC Med. Genet.* 7:55.
- Numata K, Kanai A, Saito R, Kondo S, Adachi J, Wilming LG, Hume DA, Hayashizaki Y, Tomita M. (2003) Identification of putative noncoding RNAs among the RIKEN mouse full-length cDNA collection. *Genome Res.* 13:1301-6.
- Nusse R, Theunissen H, Wagenaar E, Rijsewijk F, Gennissen A, Otte A, Schuurin E, van Ooyen A. (1990) The Wnt-1 (int-1) oncogene promoter and its mechanism of activation by insertion of proviral DNA of the mouse mammary tumor virus. *Mol. Cell Biol.* 10(8):4170-9.
- Nusse R. (1999) WNT targets. Repression and activation. *Trends Genet.* 15:1-3.
- Nusse R. (2001) An ancient cluster of Wnt paralogues. *Trends Genet.* 17:443.
- Nusse R. (2005) Wnt signaling in disease and in development. *Cell research.* 15:28-32.

- O'Connell JR, Weeks DE. (1998) PedCheck: a program for identification of genotype incompatibilities in linkage analysis. *Am. J. Hum. Genet.* 63(1):259-66.
- Ohno K, Suzuki K. (1988) Multiple Abnormal beta-Hexosaminidase alpha-Chain mRNAs in a Compound-Heterozygous Ashkenazi Jewish Patient with Tay-Sachs Disease. *J. Biol. Chem.* 263(34):18563-7.
- Okamura K, Chung WJ, Ruby JG, Guo H, Bartel DP, Lai EC. (2008) The Drosophila hairpin RNA pathway generates endogenous short interfering RNAs. *Nature.* 453(7196):803-6.
- Olmeda D, Castel S, Vilaro S, Cano A. (2003) β -Catenin Regulation during the Cell Cycle: Implications in G2/M and Apoptosis. *Mol. Biol. Cell.* 14:2844-2860.
- Ornitz DM, Itoh N. (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol.* 2: 1-12.
- Payseur BA, Place M, Weber JL. (2008) Linkage disequilibrium between STRPs and SNPs across the human genome. *Am. J. Hum. Genet.* 82:1039-1050.
- Pittman DL, Schimenti JC. (1998) Recombination in the mammalian germ line. *Curr Top Dev Biol.* 37:1-35.
- Pritchard JK. (2001) Are rare variants responsible for susceptibility to complex diseases? *Am J Hum. Genet.* 69:124-37.
- Qin M, Hayashi H, Oshima K, Tahira T, Hayashi K, Kondo H. (2005) Complexity of the genotype-phenotype correlation in familial exudative vitreoretinopathy with mutations in the LRP5 and/or FZD4 genes. *Hum. Mutat.* 26(2):104-112.
- Rich SS. (1995) Positional cloning works! Identification of genes that cause IDDM. *Diabetes* 44:139-40.
- Richards JB, Rivadeneira F, Inouye M, Pastinen TM, Soranzo N, Wilson SG, Andrew T, Falchi M, Gwilliam R, Ahmadi KR, Valdes AM, Arp P, Whittaker P, Verlaan DJ, Jhamai M, Kumanduri V, Moorhouse M, van Meurs JB, Hofman A, Pols HA, Hart D, Zhai G, Kato BS, Mullin BH, Zhang F, Deloukas P, Uitterlinden AG, Spector TD. (2008) Bone mineral density, osteoporosis, and osteoporotic fractures: a genome-wide association study. *Lancet.* 371(9623):1505-12.
- Rieger-Wettengl G, Schönau E. (2003) Bisphosphonate und ihre Anwendung bei Störungen des Knochenstoffwechsels in der Pädiatrie. *Pädiatr. Prax.* 64:129-136.
- Rijsewijk F, Schuermann M, Wagenaar E, Parren P, Weigel D, Nusse R. (1987) The Drosophila homolog of the mouse mammary oncogene int-1 is identical to the segment polarity gene wingless. *Cell.* 50:649-657.
- Robitaille J, MacDonald ML, Kaykas A, Sheldahl LC, Zeisler J, Dube MP, Zhang LH, Singaraja RR, Guernsey DL, Zheng B, Siebert LF, Hoskin-Mott A, Trese MT, Pimstone SN, Shastry BS, Moon RT, Hayden MR, Goldberg YP, Samuels ME. (2002) Mutant frizzled-4 disrupts retinal angiogenesis in familial exudative vitreoretinopathy. *Nat. Genet.* 32:326-330.
- Rommens JM, Zengerling-Lentes S, Kerem B, Melmer G, Buchwald M, Tsui LC. (1989) Physical localization of two DNA markers closely linked to the cystic fibrosis locus by pulsed-field gel electrophoresis. *Am. J. Hum. Genet.* 45:932-41.

- Roy AM, Carroll ML, Kass DH, Nguyen SV, Salem AH, Batzer MA, Deininger PL. (1999) Recently integrated human Alu repeats: finding needles in the haystack. *Genetica*. 107(1-3):149-61.
- Royer-Pokora B, Kunkel LM, Monaco AP, Goff SC, Newburger PE, Baehner RL, Cole FS, Curnutte JT, Orkin SH. (1986) Cloning the gene for an inherited human disorder - chronic granulomatous disease - on the basis of its chromosomal location. *Nature*. 322:32-38.
- Rüschendorf F, Nürnberg P. (2005) ALOHOMORA: a tool for linkage analysis using 10K SNP array data. *Bioinformatics*. 21(9):2123-5.
- Saiki RK, Gelfand DH, Stoffel S, Scharf SJ, Higuchi R, Horn GT, Mullis KB, Erlich HA. (1988) Primer-Directed Enzymatic Amplification of DNA with a Thermostable DNA Polymerase. *Science*. 239:487-491.
- Salic A, Lee E, Mayer L, Kirschner MW. (2000) Control of beta-catenin stability: reconstitution of the cytoplasmic steps of the wnt pathway in *Xenopus* egg extracts. *Molecular Cell*. 5:523-532.
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. (1989) *Molecular cloning: A laboratory manual*, 2nd Edition. Cold Spring Harbour Laboratory Press, NY.
- Sanger E, Nicklen S, Coulson AR. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 74:5464-5467.
- Santavuori P, Somer H, Sainio K, Rapola J, Kruus S, Nikitin T, Ketonen L, Leisti J. (1989) Muscle-eye-brain disease (MEB) *Brain Dev.* 11:147-153.
- Sasidharan R, Gerstein M. (2008) Genomics: protein fossils live on as RNA. *Nature*. 453(7196):729-31.
- Schuback DE, Chen ZY, Craig IW, Breakefield XO, Sims KB. (1995) Mutations in the Norrie disease gene. *Hum. Mutat.* 5:285-292.
- Schumacher J, Nöthen M, Propping P. (2002) Methoden der Genidentifizierung bei genetisch komplexen Krankheiten. *Neurogenetik*, 2. Auflage, Verlag W. Kohlhammer, Stuttgart, 41-54.
- Semenov MV, Habas R, Macdonald BT, He X. (2007) SnapShot: Noncanonical Wnt Signaling Pathways. *Cell*. 131, 1378.
- Semler O, Land C, Schönau E. (2007) Bisphosphonat-Therapie bei Kindern und Jugendlichen mit primären und sekundären osteoporotischen Erkrankungen. *Orth.* 36:146-151.
- Shahin H, Walsh T, Sobe T, Lynch E, King MC, Avraham KB, Kanaan M. (2002) Genetics of congenital deafness in the Palestinian population: multiple connexin 26 alleles with shared origins in the Middle East. *Hum. Genet.* 110 :284-289.
- Sharma RP and Chopra VL. (1976) Effect of wingless (wg1) mutation on wing and haltere development in *Drosophila melanogaster*. *Dev. Biol.* 48:461-465.
- Sheldahl LC, Park M, Malbon CC, Moon RT. (1999) Protein kinase C is differentially stimulated by Wnt and Frizzled homologs in a G-protein-dependent manner. *Curr. Biol.* 9:695-698.

- Sobrado P, Jedlicki A, Bustos VH, Allende CC, Allende JE. (2005) Basic region of residues 228-231 of protein kinase CK1alpha is involved in its interaction with axin: binding to axin does not affect the kinase activity. *J. Cell. Biochem.* 94:217-224.
- Somer H, Palotie A, Somer M, Hoikka V, Peltonen L. (1988) Osteoporosis-pseudoglioma syndrome: clinical, morphological, and biochemical studies. *J. Med. Genet.* 25:543-549.
- Stegmann TJ. (1998) A human growth factor in the induction of neoangiogenesis. *Exp. Opin. Invest. Drugs* 7: 2011-2015.
- Strachan T, Read A. (1996) Die genetische Kartierung. *Molekulare Humangenetik*, 1. Auflage Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 367-381.
- Strachan T, Read A. (1996) Die Identifizierung von menschlichen Krankheitsgenen. *Molekulare Humangenetik*, 1. Auflage Spektrum Akademischer Verlag Heidelberg, Berlin, Oxford, 433-440.
- Strachan T, Read A. (2003) *Human Molecular Genetics*, 3rd Edition, Chapter 11: Instability of the human genome: mutation and DNA repair. Page 341.
- Strauch K, Fimmers R, Kurz T, Deichmann KA, Wienker TF, Baur MP. (2000) Parametric and nonparametric multipoint linkage analysis with imprinting and two-locus-trait models: application to mite sensitization. *Am J Hum Genet.* 66(6):1945-57.
- Sturley SL, Talmud PJ, Brasseur R, Culbertson MR, Humphries SE, Attie AD. (1994) Human apolipoprotein B signal sequence variants confer a secretion-defective phenotype when expressed in yeast. *J. Biol. Chem.* 269:21670-5.
- Tam OH, Aravin AA, Stein P, Girard A, Murchison EP, Cheloufi S, Hodges E, Anger M, Sachidanandam R, Schultz RM, Hannon GJ. (2008) Pseudogene-derived small interfering RNAs regulate gene expression in mouse oocytes. *Nature.* 453(7194):534-8.
- Tamai K, Semenov M, Kato Y, Spokony R, Liu C, Katsuyama Y, Hess F, Saint-Jeannet JP, He X. (2000) LDL-receptor-related proteins in Wnt signal transduction. *Nature* 407:530-535.
- Tamai K, Zeng X, Liu C, Zhang X, Harada Y, Chang Z, He X. (2004) A Mechanism for Wnt Coreceptor Activation. *Mol. Cell.* 13:149-156.
- Taniguchi K, Kobayashi K, Saito K, Yamanouchi H, Ohnuma A, Hayashi YK, Manya H, Jin DK, Lee M, Parano E, Falsaperla R, Pavone P, Van Coster R, Talim B, Steinbrecher A, Straub V, Nishino I, Topaloglu H, Voit T, Endo T, Toda T. (2003) Worldwide distribution and broader clinical spectrum of muscle-eye-brain disease. *Hum. Mol. Genet.* 12:527-534.
- The ENCODE Project Consortium. (2007) Identification and analysis of functional elements in 1% of the human genome by the ENCODE pilot project. *Nature.* 447(7146):799-816.
- Thiele H, Nürnberg P. (2005) HaploPainter: a tool for drawing pedigrees with complex haplotypes. *Bioinformatics.* 21(8):1730-2.
- Toft NJ, Arends MJ. (1998) DNA mismatch repair and colorectal cancer. *J Pathol.* 185(2):123-9.
- Tolwinski NS, Wieschaus E. (2004) A nuclear function for armadillo/beta-catenin. *PLoS biology* 2:E95.

- Toomes C, Bottomley HM, Jackson RM, Towns KV, Scott S, Mackey DA, Craig JE, Jiang L, Yang Z, Trembath R, Woodruff G, Gregory-Evans CY, Gregory-Evans K, Parker MJ, Black GC, Downey LM, Zhang K, Inglehearn CF. (2004) Mutations in LRP5 or FZD4 underlie the common familial exudative vitreoretinopathy locus on chromosome 11q. *Am. J. Hum. Genet.* 74:721-730.
- Torres MA, Yang-Snyder JA, Purcell SM, DeMarais AA, McGrew LL, Moon RT. (1996) Activities of the Wnt-1 class of secreted signaling factors are antagonized by the Wnt-5A class and by a dominant negative cadherin in early *Xenopus* development. *J. Cell Biol.* 133:1123-1137.
- Tufarelli C, Stanley JA, Garrick D, Sharpe JA, Ayyub H, Wood WG, Higgs DR (2003) Transcription of antisense RNA leading to gene silencing and methylation as a novel cause of human genetic disease. *Nat. Genet.* 34:157-65.
- Vogelstein B, Gillespie D. (1979) Preparative and analytical purification of DNA from agarose. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 76:615-9.
- Walker AP, Muscatelli F, Monaco AP. (1993) Isolation of the human Xp21 glycerol kinase gene by positional cloning. *Hum. Mol. Genet.* 2:107-14.
- Wallingford JB, Fraser SE, Harland RM. (2002) Convergent extension: the molecular control of polarized cell movement during embryonic development. *Dev. Cell.* 2:695-706.
- Wallingford JB, Habas R (2005) The developmental biology of Dishevelled: an enigmatic protein governing cell fate and cell polarity. *Development (Cambridge, England)* 132, 4421-4436.
- Watanabe T, Totoki Y, Toyoda A, Kaneda M, Kuramochi-Miyagawa S, Obata Y, Chiba H, Kohara Y, Kono T, Nakano T, Surani MA, Sakaki Y, Sasaki H. (2008) Endogenous siRNAs from naturally formed dsRNAs regulate transcripts in mouse oocytes. *Nature.* 453(7194):539-43.
- van Wesenbeeck L, Cleiren E, Gram J, Beals RK, Benichou O, Scopelliti D, Key L, Renton T, Bartels C, Gong Y, Warman ML, De Vernejoul MC, Bollerslev J, Van Hul W. (2003) Six novel missense mutations in the LDL receptor-related protein 5 (LRP5) gene in different conditions with an increased bone density. *Am. J. Hum. Genet.* 72:763-771.
- Witkowska HE, Lubin BH, Beuzard Y, Baruchel S, Esseltine DW, Vichinsky EP, Kleman KM, Bardakjian-Michau J, Pinkoski L, Cahn S. (1991) Sickle cell disease in a patient with sickle cell trait and compound heterozygosity for hemoglobin S and hemoglobin Quebec-Chori. *N. Engl. J. Med.* 325(16):1150-4.
- Wodarz A, Nusse R. (1998) Mechanisms of Wnt signaling in development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 14:59-88.
- Xu Q, Wang Y, Dabdoub A, Smallwood PM, Williams J, Woods C, Kelley MW, Jiang L, Tasman W, Zhang K, Nathans J. (2004) Vascular development in the retina and inner ear: control by Norrin and Frizzled-4, a high-affinity ligand-receptor pair. *Cell* 116:883-895.
- Yadav VK, Ryu JH, Suda N, Tanaka KF, Gingrich JA, Schütz G, Glorieux FH, Chiang CY, Zajac JD, Insogna KL, Mann JJ, Hen R, Ducy P, Karsenty G. (2008) Lrp5 controls bone formation by inhibiting serotonin synthesis in the duodenum. *Cell.* 135(5):825-37.
- Yano Y, Saito R, Yoshida N, Yoshiki A, Wynshaw-Boris A, Tomita M, Hirotsune S. (2004) A new role for expressed pseudogenes as ncRNA: regulation of mRNA stability of its homologous coding gene. *J. Mol. Med.,* 82:414-22.

Yue P, Aversa M, Lin X, Schonfeld G. (2006) The c.43_44insCTG variation in PCSK9 is associated with low plasma LDL-cholesterol in a Caucasian population. *Hum Mutat* 27:460-466.

Zhang Z, Carriero N, Gerstein M. (2004) Comparative analysis of processed pseudogenes in the mouse and human genomes. *Trends Genet.* 20(2):62-7.

Zhang Z, Gerstein M. (2004) Large-scale analysis of pseudogenes in the human genome. *Curr. Opin. Genet. Devel.* 14:328-335.

Zheng D, Frankish A, Baertsch R, Kapranov P, Reymond A, Choo SW, Lu Y, Denoeud F, Antonarakis SE, Snyder M, Ruan Y, Wei CL, Gingeras TR, Guigó R, Harrow J, Gerstein MB. (2007) Pseudogenes in the ENCODE regions: consensus annotation, analysis of transcription, and evolution. *Genome Res.* 17(6):839-51.

Zuliani G, Hobbs HH. (1990) A high frequency of length polymorphisms in repeated sequences adjacent to Alu sequences. *Am J Hum Genet.* 46(5): 963-969.

7 ANHANG

Karyogramm einer gesunden Translokationsträgerin aus der türkischen Familie #1

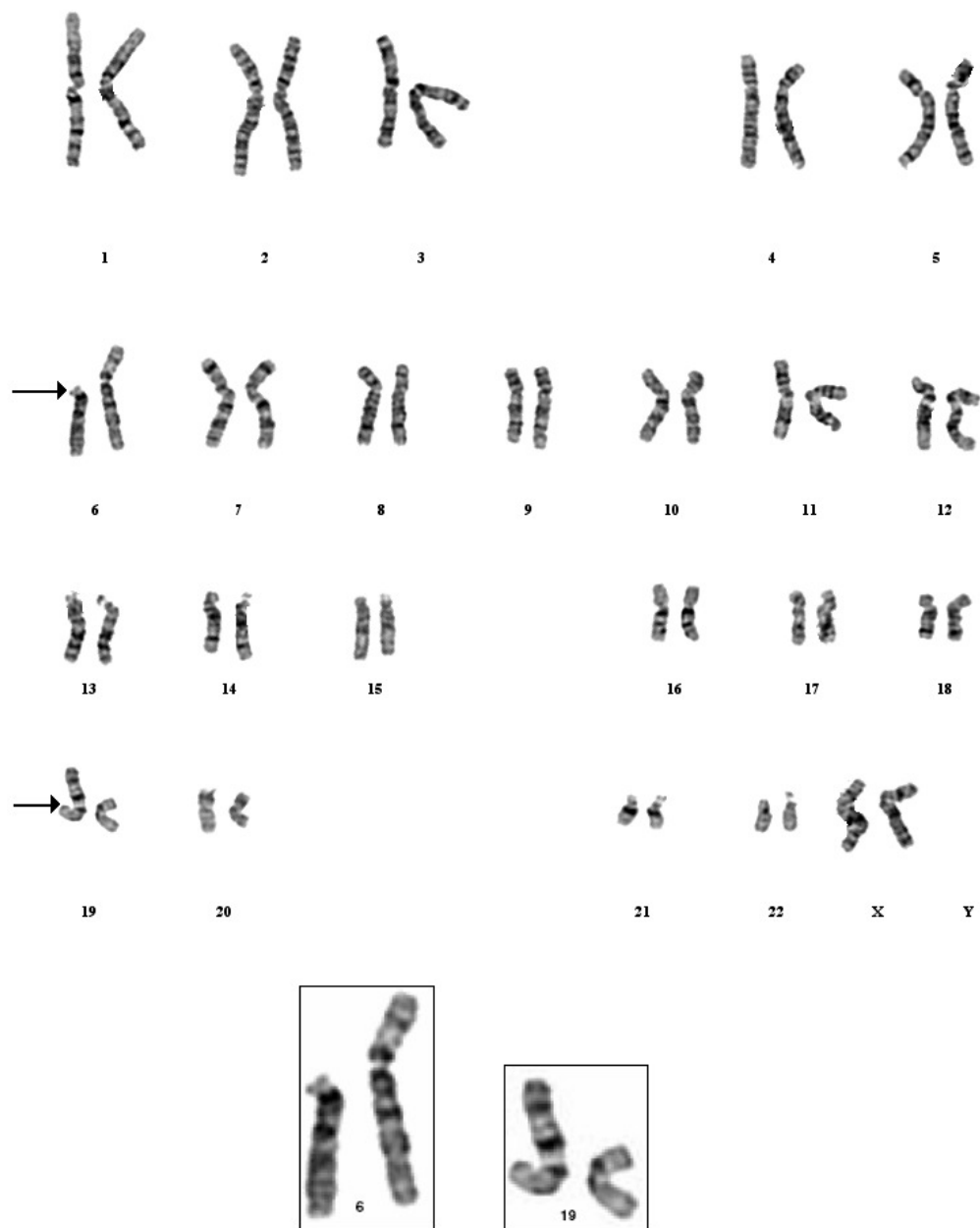


Abb. 7.1: Karyogramm einer gesunden Translokationsträgerin (VI:10) aus der türkischen Familie #1 mit dem Karyotyp: 46,XX, t(6;19)(p11;p13). Die Chromosomen 6 und 19 sind zusätzlich vergrößert dargestellt. Links ist jeweils das Translokationschromosom, rechts das normale homologe Chromosom dargestellt. GTG-Bänderung.

Tab. 7.1: Tabellarische Übersicht aller verwendeten Primer zur genomischen PCR-Amplifikation und Sequenzierung der Kandidatengene *WNT*, *FGF3*, *FGF4*, *FGF19*, *DRAP1*, *FZD4* und *HTATIP*. Angegeben ist die jeweilige *Forward*- und *Reverse*-Primer-Sequenz in 5'→3'-Richtung. Die Primer wurden von der Firma Metabion bezogen. Die Amplifikation dieser Exons erfolgte mit der *ReadyMixTM REDTaq[®]-Polymerase* in einer *Touchdown-PCR* (Kapitel 2.14.2 und 2.14.3).

Gen-Exon	Forward-Primer-Sequenz 5'-3'-Richtung	Reverse-Primer-Sequenz 5'-3'-Richtung
<i>WNT11</i> -Ex1	TGCAGGCGGAGGACTTCGG	GCGCTTCCATTGTGGTCCAC
<i>WNT11</i> -Ex2	AGTCCATTGAGGGAAAGGC	ATGCCTGAATTCCTCACCC
<i>WNT11</i> -Ex3	GAAGGTGGAGGACCTCTGAC	TGCGAGGCACATCAGGTGTG
<i>WNT11</i> -Ex4	TGAGAGCACCCAGCCATGG	TGTGCGTGACCCTGAGCTG
<i>WNT11</i> -Ex5	TGGGAGTCATGGGGTGTG	GCAGAGCTCCATGGAGTGTG
<i>FGF3</i> -Ex1	AAGCCGGAGTCAGCATCTC	GGAGGCAGACGGTCTTTTC
<i>FGF3</i> -Ex2	CCTGAACTTCCACTACTCC	GCATTCTACTGCCACATC
<i>FGF3</i> -Ex3	TGGACCGAACAGCCTCACAG	AGAGTCAAGAGGCTGCCAC
<i>FGF4</i> -Ex1	CGCACTGCTCCTCAGAGTC	GGTCTCAGAGTGTGACTGAG
<i>FGF4</i> -Ex2	GGCAAGCTAATCTGAGCTAG	AGAAGCCACGAGCCTGCTAG
<i>FGF4</i> -Ex3	CCTGTGTGGGTCTTGACAC	TTCTCCACTGTTGCACCAG
<i>FGF19</i> -Ex1	ATCTAGGGCCACGACCATC	ATCCTAACGTCCAGGTGCC
<i>FGF19</i> -Ex2	AGAAGCACAGGCTTGTGGAC	AACCCTGGATTCGAACCCAG
<i>FGF19</i> -Ex3	AACGTCCATGTGGACCCGTG	CACGCTGCAGGTACCACAG
<i>DRAP1</i> -Ex1	TCTTAACCGGCGGCGCTAG	GCATGATCTTCTTGATCCGC
<i>DRAP1</i> -Ex2	ATGCCCTTCCCTCCCCCAG	GAGCGTCAAGGAGAACTCCG
<i>DRAP1</i> -Ex3	CATCATCTGTATCCTGCCGG	TCTGTGGCCTTGCTGGTGTG
<i>DRAP1</i> -Ex4	GGCTCCAGCCTGACATCTG	AAGGTACAGTCCATCTGCCC
<i>DRAP1</i> -Ex5	CAGGGCCTGGCATAACAGTG	ATGAGAGCTGGCCTCCTGC
<i>DRAP1</i> -Ex6	GGGTCTACTGCTGTCCATGA	CTGCCACAATCAACAAGACC
<i>DRAP1</i> -Ex7	CATGGATCTGGAGGGTGGTG	CAGCTCTACCTTCTCTCCTC
<i>FZD4</i> -Ex1	TCGTCGCCGCATCACACTCC	TTGGCATGGGCTCTGCAAAG
<i>FZD4</i> -Ex2.a	AACTCAGCTTTGTGGGAGC	ATGGCCAGGCTGCAATGTG
<i>FZD4</i> -Ex2.B	CCTGTTCTCATCCAAGAAGG	TGACGGGGGTCACTTAATTG
<i>HTATIP</i> -Ex1	CGCGGTGTCTCTCAAAGGTC	TCTCGGAGCAGCTAAGAGCC
<i>HTATIP</i> -Ex2	AGTGCTGGAGCTTAGGGATC	TTTAGGTCCAGCCGCTCATG
<i>HTATIP</i> -Ex3	AGCGTGAAGGACATCAGTGG	GATGAAGTCAGGGTGAGAGG
<i>HTATIP</i> -Ex4	GCTAGTCCTGTGTCCTTCAG	ACCTCCACCTTCCGTTTCTG
<i>HTATIP</i> -Ex5	GCAATTCCAGGGACCTTG	GGGATGGCTGTGAAATGAGC
<i>HTATIP</i> -Ex6	GGTGAGTTCCCCAAACCATC	ACACTAGCTCTGCCACCAC
<i>HTATIP</i> -Ex7	GTGTCCTGCTGAGCTGTCTC	GTCGTAGGTCACACTTGGTG
<i>HTATIP</i> -Ex8	TACGGCCGTAGTCTCAAGTG	TGGACTGATCTGCTGGCTTG
<i>HTATIP</i> -Ex9	CAGTGAAGCTCCTGGTTGAC	GGATGCAGGCCACATTGTAG
<i>HTATIP</i> -Ex10	TCGTGGGCTACTTCTCCAAG	GCCAGGGTTGAGAATCACAG
<i>HTATIP</i> -Ex11	TGCTCAGCGCACGGAAAGAG	CACAGGTCAGGTTCCCTGAG
<i>HTATIP</i> -Ex12	GGTACATGGCATGGCTTGTC	TGGGTTCCAGCAGGTGGTCAG
<i>HTATIP</i> -Ex13	ACTACAAGGTAGGGAGGCAG	GCTTTGTGGGAGCTGCAGTG

Tab. 7.2.1: Tabellarische Übersicht aller verwendeten Primer zur genomischen PCR-Amplifikation und Sequenzierung von *LRP5*. Angegeben ist die jeweilige Primer-Sequenz in 5'→3'-Richtung, Primerlänge in bp, der prozentuale GC-Anteil, die Schmelztemperatur nach dem Hersteller (Metabion) und Annealingtemperatur und die Größe des PCR-Produktes. Abweichungen vom Standard-Protokoll sind gekennzeichnet und in der Fußnote erläutert.

Exon	Primer-Name	Primer-Sequenz 5'-3'-Richtung	Primerlänge	GC-Gehalt	Schmelztemp.*	Annealingtemp.	Größe des PCR-Produktes
1	<i>LRP5</i> -ex1-F	ATG GAG CCC GAG TGA GCG C	19	68 %	63,8 °C	TD 74-59 °C <i>AccuTaq</i> ¹	251 bp
	<i>LRP5</i> -ex1-R	CGC TCC CAA CTC GCC AAG TC	20	65 %	63,4 °C		
2	<i>LRP5</i> -ex2-F	GCA TAG TGC TCC ATC CCA GG	20	60 %	61,4 °C	TD 68-59 °C <i>AccuTaq</i> ¹	617 bp
	<i>LRP5</i> -ex2-R2	CCC CAC GGG TTC ATT TTC AG	20	55 %	59,4 °C		
3	<i>LRP5</i> -ex3-F	TAG GGC AAG TTC ACT GTC TG	20	50 %	57,3 °C	62 °C	337 bp
	<i>LRP5</i> -ex3-R2	CAG AGA AGA GTC TGT AGG CC	20	55 %	59,4 °C		
4	<i>LRP5</i> -Pub-Ex4-F	GAT GGC TCC TCC ACC CCG CT	20	70 %	66,6 °C	70 °C <i>AccuTaq</i> ¹	280 bp
	<i>LRP5</i> -Pub-Ex4-R	GCG CCC CAG CCG GCA CT	17	82 %	64,4 °C		
5	<i>LRP5</i> -ex5-F3	TGA GGC CGA TGT TTG GGC AG	20	60 %	62,5 °C	TD 68-59 °C <i>AccuTaq</i> ¹	420 bp
	<i>LRP5</i> -ex5-R4	GTT TGC CGA GGT TCC TTC TG	20	55 %	60,5 °C		441 bp
	<i>LRP5</i> -ex5-R2	CCA AGT GGA TCA TTT CGA ACG	21	50 %	57,9 °C		
6	<i>LRP5</i> -ex6-F	TGG CTG AGT ATT TCC CTT GC	20	50 %	57,3 °C	64-55 °C	856 bp
	<i>LRP5</i> -ex6-Seq	ATG GCA TCG CGG TCG ACT G	19	60 %	61,0 °C		
	<i>LRP5</i> -ex6-NEU-R	GCC TGG CCT GTA CTG TGG TC	20	65 %	64,6 °C		
7	<i>LRP5</i> -ex7-F	GCC AGC ATC TAC TGA CAC TG	20	60 %	59,4 °C	TD 68-59 °C <i>AccuTaq</i> ¹	454 bp
	<i>LRP5</i> -ex7-R2	ATA GCA GAG CAC AGG CAC CC	20	60 %	61,4 °C		
8	<i>LRP5</i> -ex8-F	TGG GCA TTG AAC CCG TCT TG	20	55 %	59,4 °C	62 °C	415 bp
	<i>LRP5</i> -ex8-R2	ACA CTT ATG CCC AGG CAT GG	20	55 %	59,4 °C		
9	<i>LRP5</i> -ex9-F	GCA TTC ATT GTG TGG CTT GG	20	50 %	57,3 °C	TD 68-59 °C <i>AccuTaq</i> ¹	451 bp
	<i>LRP5</i> -ex9-R2	GTC TGA AGC CTT TGA GGC AG	20	55 %	59,4 °C		
10	<i>LRP5</i> -ex10-F	TGC CAG TGG CCA AGC ATC TC	20	60 %	61,4 °C	64-55 °C	715 bp
	<i>LRP5</i> -ex10-R2	ACG GAC AGC CTG CCA CCT TG	20	65 %	63,4 °C		
11	<i>LRP5</i> -ex11-F	AGC TGA AGA GGT GGG GAC AG	20	60 %	61,4 °C	64-55 °C	386 bp
	<i>LRP5</i> -ex11-R2b	GTT GGG GAA CTT GCA GGC CAC A	22	59 %	60,3 °C		
12	<i>LRP5</i> -ex12-F	GCT AGG CTG CAG GGT TGA AC	20	60 %	61,4 °C	62 °C	522 bp
	<i>LRP5</i> -ex12-R2	CAG GAA CCC CAG ATG AGA AG	20	55 %	59,4 °C		

¹ Abweichend vom Standard-PCR-Protokoll wurde hier die *accuTaq*[®] von Sigma anstelle der *ReadyMix*[™]*REDTaq*[®]-Polymerase (Sigma) verwendet

Tab. 7.2.2: Tabellarische Übersicht aller verwendeten Primer zur genomischen PCR-Amplifikation und Sequenzierung von LRP5. Angegeben ist die jeweilige Primer-Sequenz in 5'→3'-Richtung, Primerlänge in bp, der prozentuale GC-Anteil, die Schmelz- und Annealingtemperatur und die Größe des PCR-Produktes. Abweichungen vom Standard-Protokoll sind gekennzeichnet und in der Fußnote erläutert.

Exon	Primer-Name	Primer-Sequenz 5'-3'-Richtung	Primerlänge	GC-Gehalt	Schmelztemp. *	Annealingtemp.	Größe des PCR-Produktes in bp
13	<i>LRP5-ex13-F b</i>	ATA GCG CAC CCC CAA GAG AC	20	60 %	61,4 °C	62 °C	523 bp
	<i>LRP5-ex13-R</i>	GGG TCA TAC CCT GTG ACT AC	20	55 %	59,4 °C		
14	<i>LRP5-ex14-NEU-F</i>	GGC ACG TAG TTA GGA GCT GA	20	55 %	60,5 °C	2 Step 64+62 °C <i>AccuTaq</i> ¹	700 bp
	<i>LRP5-ex14-NEU-R</i>	CAG CGC TGC CTT GTA ACC TC	20	60 %	62,5 °C		
15	<i>LRP5-ex15-F-NEW</i>	GCT CAC ATT CTG AGG TTC TGG G	22	54,5 %	64,0 °C	TD 68-59 °C	590 bp
	<i>LRP5-ex15-R-NEW</i>	CCT ACA GCT GTC AGT GTG AG	20	55 %	60,5 °C		
16	<i>LRP5-ex16F</i>	TGC TTC CAG GGA CTC TGC TG	20	60 %	61,4 °C	62 °C	580 bp
	<i>LRP5-ex16R</i>	TGA GGC CAC ACA GGA TCT TG	20	55 %	59,4 °C		
17	<i>LRP5-ex17F</i>	TCC AGG CTG TGG TTC TGA GG	20	60 %	61,4 °C	62 °C	375 bp
	<i>LRP5-ex17R</i>	TGG AAA CTG GAT GCC ACA GG	20	55 %	54,9 °C		
18	<i>LRP5-ex18F2</i>	TAC AGC AGG GAT GCC AAA CCC	21	57 %	56,5 °C	62 °C	485 bp
	<i>LRP5ex-18R</i>	TTG GCA ATC TCC CTG CAA GC	20	55 %	59,4 °C		
19	<i>LRP5-ex19F</i>	TTG CTG TGC CCT GCA TGG TG	20	60 %	61,4 °C	62 °C	365 bp
	<i>LRP5-ex19R</i>	GCC TGA GTC TCC CAC ACA G	19	63 %	61,0 °C		
20	<i>LRP5-ex20F</i>	CCA CGT TAC CCT GAG GTT GG	20	60 %	61,4 °C	62 °C	580 bp
	<i>LRP5-ex20R</i>	TGC TCC ACT CCC CAA AGC TG	20	60 %	61,4 °C		
21	<i>LRP5-ex21-NEU-F</i>	AGG AGG TAC CAT GTG TCT CC	20	55 %	60,5 °C	TD 68-59 °C <i>AccuTaq</i> ¹	680 bp
	<i>LRP5-ex21-NEU-R</i>	GGT GCA GGC GGC TAT CGA TG	20	65 %	64,6 °C		
22	<i>LRP5-ex22-NEU-F</i>	GGT CAC AAG GCA GGT ACT TG	20	55 %	60,5 °C	2 Step 64+62 °C <i>AccuTaq</i> ¹	680 bp
	<i>LRP5-ex22-NEU-R</i>	ACA CAG TCA GAC TCT GGA GC	20	55 %	60,5 °C		
23	<i>LRP5-ex23-NEU-F</i>	TTA GAG GCA GCC TTG CCA GG	20	60 %	62,5 °C	TD 68-59 °C <i>AccuTaq</i> ¹	900 bp
	<i>LRP5-ex23-NEU-R</i>	AGC TCA GGG ATG CAT CCC AG	20	60 %	62,5 °C		

¹ Abweichend vom Standard-PCR-Protokoll wurde hier die *accuTaq*[®] von Sigma anstelle der *ReadyMix*[™]*REDTaq*[®]-Polymerase (Sigma) verwendet

Tab. 7.3: Tabellarische Übersicht der verwendeten *LRP5*-Primer **a)** zur Genotypisierung des CTG-*Repeats* in Exon 1 der türkischen Familie #1 sowie von Kontroll-Individuen (Kapitel 2.21 und 3.1.3; Tab.3.2); **b)** der Analyse des nicht annotierten Basenaustausches in Intron 13 bei Kontroll-Individuen (Kapitel 3.1.3); **c)** der Bruchpunktbestimmung der genomischen Deletion (Kapitel 3.1.5); **d)** zur Amplifikation des *Junction Fragmentes* der genomischen Deletion (Kapitel 3.1.5) und **e)** zur RT-PCR der Ex14_16del mit Patienten-RNA (RNA-Analysen; Kapitel 3.1.6). Angegeben ist die jeweilige Primer-Sequenz in 5'→3'-Richtung. Die Primer wurden von der Firma Metabion bezogen. Die Amplifikationen erfolgten mit der *ReadyMix™ REDTaq®*-Polymerase in einer *Touchdown-PCR* bei **a)** 74-65°C; **b)** 64-55°C; **c)** 68-59°C, **d)** 64-55°C und **e)** 65-56°C (Kapitel 2.14.2, 2.14.3 und 2.16).

Zweck	Primer-Name	Primer-Sequenz 5'-3'-Richtung
a) Analyse des CTG- <i>Repeats</i> in Exon 1	<i>LRP5</i> -Ex1F-FAM	ATGGAGCCCGAGTGAGCGC
	<i>LRP5</i> -Ex1R-Polym.	CGCTCCCAACTCGCCAAGTC
b) Analyse des nicht annotierten Basenaustausches in Intron 13	<i>LRP5</i> -ex13-SNP-F	CCATCGACTATGACCCACTG
	<i>LRP5</i> -ex13-SNP-F2	CCAAGGCGCTCCTCTTGCTGGTTTCCAGGCTACTG
	<i>LRP5</i> -ex13-SNP-R2	TCACAGTCTCGGGGTTCCAC
c) Bruchpunktbestimmung der genomischen Deletion	<i>LRP5</i> -ex13-Fb	ATAGCGCACCCCAAGAGAC
	<i>LRP5</i> -17R	TGGAAACTGGATGCCACAGG
d) Amplifikation des <i>Junction Fragmentes</i> der genomischen Deletion	<i>LRP5</i> -IVT13-7-Neu1	GTGAGGAAAAGGCGTGTTTGTGGTG
	<i>LRP5</i> -cDNA-17R	CCCTTGGCAATACAGATGTG
e) RT-PCR der Ex14_16del mit Patienten-RNA	MUT-EX14-16-F3	TCTGCCATCAGTCGGATGATCCCGG
	MUT-EX14-16-R2-R3	TGTGACGTGGTTCCGGTTCGTAGAGG

Tab. 7.4: Tabellarische Übersicht der verwendeten *LRP5*-Primer zur PCR-Mutagenese und Generierung von *LRP5*-Expressionskonstrukten (Kapitel 2.25, Tab.2.17). Angegeben ist die jeweilige Primer-Sequenz in 5'→3'-Richtung. Die Primer wurden von der Firma Metabion bezogen. Die Amplifikation erfolgte mit der *accuTaq®*-Polymerase in einer Standard-PCR bei einer *Annealing*temperatur von 68°C (Kapitel 2.14.2 und 2.14.3).

Konstrukname	Primername	Primer-Sequenz 5'-3'-Richtung
	<i>LRP5</i> -D13-F1	CAAATGGGCGGTAGGCGTGTAC
	<i>LRP5</i> -D13-R1	GTCCTGCCAGAAGAGCACCTTC
	Del-Mut2-F	GCGCTGTGCGGCTGCCCGGCC
A29T	Pkt-Mut1-F	GCCCGGCCCCACCGCGGCCTCGCCGCTCC
	Pkt-Mut1-R	GAGGCCGCGGTGGGGGCCGGGCAGCCGC
Mut _{3L}	3-er-Allel-R	GGGGCCGGGCAGCCGCACAGCGC CAGCAGCAGCGGCCACGGCGCC
6 Leu	6-er-Allel-R	GGGCCGGGCAGCCGCACAGCGCCAG CAGCAGCAGCAGCAGCGGCCACGG CGG
7 Leu	7-er-Allel-R	GGGCCGGGCAGCCGCACAGCGCCAGCAG CAGCAGCAGCAGCAGCGGCCACGGCGG
8 Leu	8-er-Allel-R	GGGCCGGGCAGCCGCACAGCGCCAGCAG CAGCAGCAGCAGCAGCAGCGGCCACGGCGG
10 Leu	10-er-Allel-R	GGGCCGGGCAGCCGCACAGCGCCAGCAGCAG CAGCAGCAGCAGCAGCAGCGGCCACGGCGG
11 Leu	11-er-Allel-R	GGGCCGGGCAGCCGCACAGCGCCAGCAGCAG CAGCAGCAGCAGCAGCAGCAGCGGCCACGGCGG
Ex14-16del	MUT-EX14-16-F3	TCTGCCATCAGTCGGATGATCCCGG
	MUT-EX14-16-R2-R3	TGTGACGTGGTTCCGGTTCGTAGAGG
p.E528_V529ins21	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex5-F	GTGTGCAGCTGCAGGACAAC
	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex10-R1	GGTAGTCAAGCCAAACTCC

Tab. 7.5: Tabellarische Übersicht der verwendeten cDNA-Primer zur Sequenzierung der *LRP5*-Expressionskonstrukte (Kapitel 2.20). Angegeben ist die jeweilige Primer-Sequenz in 5'→3'-Richtung. Die Primer wurden von der Firma Metabion bezogen.

Primername	Primer-Sequenz 5'-3'-Richtung	Primername	Primer-Sequenz 5'-3'-Richtung
T7	TAATACGACTCACTATAGGG	<i>LRP5</i> -cDNA-R2-c	AAGGATGGTCAGGCCAGAG
BGH	TAGAAGGCACAGTCGAGG	<i>LRP5</i> -cDNA-F3	ATCAACGTCCACAGGCTGAG
<i>LRP5</i> -cDNA-F1	ATGGAGCCCGAGTGAGCGCG	<i>LRP5</i> -cDNA-R3	CAAAGTTCTCCAGCCCTGC
<i>LRP5</i> -cDNA-R1	TGGTCTCGAGGGAGATCCTG	<i>LRP5</i> -cDNA-F3-b	TCTACAGCCGGACACTGTTC
<i>LRP5</i> -cDNA-F1-c	AGCCCGAGTGAGCGCGGCGC	<i>LRP5</i> -cDNA-R3-b	CCCACCCCATCACAGTTCAC
<i>LRP5</i> -cDNA-R1-c	AAGTCCAGGGCTGAGGCCTC	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex2-F	CAGAGACCAACCGCATCGAG
<i>LRP5</i> -cDNA-F2	TACTGGGAGACGCCAAGAC	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex4-F	ACACTCTGTACTGGACAGAC
<i>LRP5</i> -cDNA-R2	GCTTGCCAAGGATGGTCAGG	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex5-F	GTGTGCAGCTGCAGGACAAC
<i>LRP5</i> -cDNA-F2-b	GGAGTTTGGCCTTGACTACC	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex8-R	CAGTCCAGTAGATGAAGTCC
<i>LRP5</i> -cDNA-R2-b	GGGTCCAGGGTGTAGTGTGA	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex18-R	GTGGCACATGCAAAGTGGTC
<i>LRP5</i> -cDNA-F2-a	CGCCAAGACAGACAAGATCG	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex18-F	GTCAGTGTGTGGACCTGCG
<i>LRP5</i> -cDNA-R2-a	GTAGAGTTCTTGCCCATCC	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex19-R	TCGGAGCCGTCGATACAGTC
<i>LRP5</i> -cDNA-F2-c	CTGTATGCACAACAACGGGC	<i>LRP5</i> -cDNA-Ex21-F	GTCCATGATGAGCTCCGTGA

Tab. 7.6: Tabellarische Übersicht der verwendeten Primer zur Genotypisierung von Signalpeptid-CTG-*Repeats* 18 verschiedener Gene (Kapitel 2.21, 2.34 und 3.2.3). Angegeben ist die jeweilige Primer-Sequenz in 5'→3'-Richtung. Die Forward-Primer waren FAM fluoreszenz-markiert. Die Primer wurden von der Firma Metabion bezogen. Die Amplifikationen erfolgten mit der *accuTaq*[®]-Polymerase in einer *Touchdown*-PCR bei 65-56°C.

Gen	Forward-Primer-Sequenz in 5'-3'-Richtung	Reverse-Primer-Sequenz in 5'-3'-Richtung
<i>PPGB</i>	AGTCAACAGCCCCTCTGCT	TGAGGTAGCCGGAGTACTGG
<i>SHBG</i>	CAGTGCCCCTGTTTCCTTTA	GTGGGAGAACAGGTCTCAG
<i>ADAM33</i>	AGCTCTGAGCAGAACCCATC	TCACAGCTATGGGCTGGAG
<i>FUCA2</i>	ACACTCCCCAGTGGATGAAG	AGCCTGCAGAGAGGACAGC
<i>TIP39</i>	GATCTTCCGTCCCCTTTCTC	CCCTTTCTGGTTCTCCACAG
<i>PCSK9</i>	TGAACCTCAGCTCCTGCACA	AGCACCAGCTCCTCGTAGTC
<i>CELSR2</i>	GGGAGCTGGGAGAGATGC	GGTGTAGAGCCAGAGGTTTCG
<i>DCHS1</i>	CTGATGTGCGCAATCAGTGT	TTGTCATGCAGAAGGAGCTG
<i>NOTCH4</i>	TGGGTCTGACCACTGAGACA	CAGGAAACAGCTCAGACGTG
<i>TNCR5</i>	AACGCCCCAACTAATTCAT	CGCTGTCCGGTGTCTGAAG
<i>CD93</i>	TTCTGGTTGCAGTGGTTCTG	CCTCAGCCTTTGTGTCCTTC
<i>STRC</i>	CATCCCCAGTTCTGCTCACT	GTGTCAGTGGAGCCTCAGGT
<i>SLC27A5</i>	GTGCTGGCAGGAGGGTTAGT	TGAGCCTGAACACTCCACAG
<i>EIF2AK3(R/F1)</i>	CAGCGTCTCCACAGTCAC	TAGCACGTCTTGCCCTTCTT
<i>NMU</i>	AGCCAAGTGAAGTCCAGAA	AGATGCTGCGAACAGAGAGC
<i>SEMA7A</i>	CTTTCCAGACGGCGAAGAT	CTCAGTCTCGGCTGATTGC
<i>GDF10</i>	CCGCTGGAGATCCCTGTC	CCTTCTCCTCCTGGACTTC
<i>LHCGR</i>	AGGAGTAGGGAGGGAAGGTG	ATGAAGCAGCGGTTCTCG

Tab. 7.7: Tabellarische Übersicht der verwendeten *LRP5L*-Pseudogen-Primer **a)** zur RACE-PCR (Kapitel 2.15 und 3.4.1.2), **b)** Amplifikation und Klonierung in den pcDNA3.1-V5/His-Expressionsvektor (Kapitel 2.23 und 3.4.3) und **c)** zur Sequenzierung der RACE-PCR- und Klonierungsprodukte (Kapitel 2.20). Angegeben ist die jeweilige Primer-Sequenz in 5'→3'-Richtung. Die Primer wurden von der Firma Metabion bezogen. Die RACE-PCRs erfolgten mit der *accuTaq*[®]-*Polymerase* in einer *Touchdown*-PCR bei 74-59°C bzw. einer Two-Step-PCR bei 68°C und 66°C. Die Amplifikationen zur Klonierung erfolgten mit der *ReadyMix*TM*REDTaq*[®]-*Polymerase* in einer Standard-PCR bei 62°C.

Zweck	Primer-Name	Primer-Sequenz 5'-3'-Richtung
a) RACE-PCR Bestimmung des 3'cDNA-Endes	<i>LRP5L</i> -GSP-F1	TGTCGATGAGACGAAGAGGCAGACC
	<i>LRP5L</i> -GSP-F2	GCACCACAGCATCAAGCGGGTACAC
	<i>LRP5L</i> -GSP-F3	CAAAGCTGTGAACGTGGACAAGGTCTG
	<i>LRP5L</i> -GSP-F4	TGCAGCCACCTGTGCTTCTTCACGC
a) RACE-PCR Bestimmung des 5'cDNA-Endes	<i>LRP5L</i> -GSP-R1	CCAGCGGCCGGACGGGCTG
	<i>LRP5L</i> -GSP-R2	TGGGTGCTGTCTCCATCCCCA
	<i>LRP5L</i> -GSP-R3	CCAGTAGAGCTTCTTCTCCC
	<i>LRP5L</i> -GSP-R4	GCACGTCAGCCAGTCCATCCAGTG
b) Amplifikation der <i>LRP5L</i> -full-length-cDNA zur Klonierung	<i>LRP5L</i> -RACE-1F	GTGGAGCCCGAGTGAGCGCGGCCCA
	<i>LRP5L</i> -KI-1R	GAAATAGGCTTGCTCATATTTAATTAGC
b) Amplifikation der <i>LRP5L</i> -ORF-cDNA zur Klonierung	<i>LRP5L</i> -KI-5Fb	ATGGAGGGCCACGTCTACTGGAC
	<i>LRP5L</i> -KI-5R	GCAGTTCAGGCCCTAGATG
c) Sequenzierung von <i>LRP5L</i>	CN264451-1F	GAAGATGCAGGGACACGCGCGAGG
	CN264451-1R	CCAGCGGCCGGACGGGCTG
	BE396696-1F	GAGGAGCCCGCCGAGCCCGCCCGCCGCGCTG
	BE396696-6R	ATTGGTCCGTCTACCGGCCAGCAGCAGG
	CN274774-5F	AGAGGGGGTTTTGAGACTAGAAT
	CN274774-5R	GCAGGTGGATGAGGGGAGAGCCTA
	BC139736-3F	TACATGTACTGGGCAGATTGGGGTG
	BC139736-3Fb	TACATGTACTGGGCAGAT
	BC139736-3Fc	TGGGGATGGACGACAGCACCCA
	BC139736-3R	CTGCGTTTTCGCTATTTGGT
	BC139736-4F	GCAGAAGGTGGTGAAGGGCAGCCTG
	BC139736-4R	GCACGTCAGCCAGTCCATCCAGTG
	BC139736-6F	GAGCCAAGGAGTCTGCTGCTGGCCCGGTA
	BC139736-6R	GCATGCTGGATGTCTGTCAG
	BC139736-7F	CCTCACGTAAGGATAGACTGG
	BC139736-7R	ACGCGCAGCTCCTGCCTGTCCAG
	BC139736-8F	GATGAGACGAAGAGGCAGACCCTCCTGA
	BC139736-8R	TGATGCTGTGGTGTCTGCCAGGCG
BC139736-9R	TGACGCCGAGAGCAGGATGGCCACA	

Tab. 7.8: Tabellarische Übersicht der verwendeten Primer zur Expressionsanalyse von *LRP5L* mit Hilfe des *Multi Tissue cDNA-Panels* (Kapitel 2.22.1 und 3.4.2.1) und zur Amplifikation der Northernblot-Sonden für *LRP5L*, β -Aktin sowie *LRP5* (Kapitel 2.22.2 und 3.4.2.2). Angegeben ist die jeweilige Primer-Sequenz in 5'→3'-Richtung. Die Primer wurden von der Firma Metabion bezogen. Die Amplifikationen erfolgten mit der *ReadyMix*TM*REDTaq*[®]-*Polymerase* in einer Standard-PCR bei 62°C.

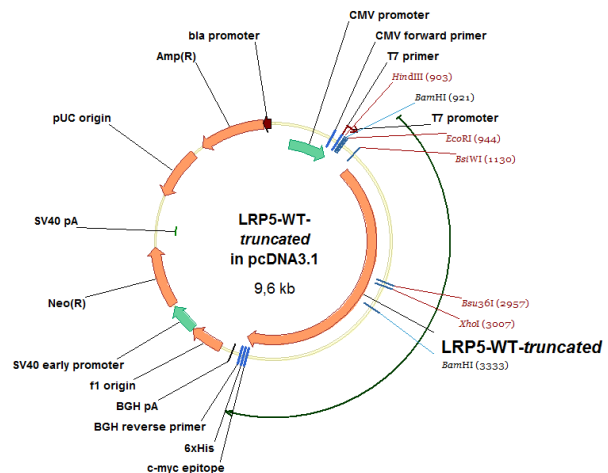
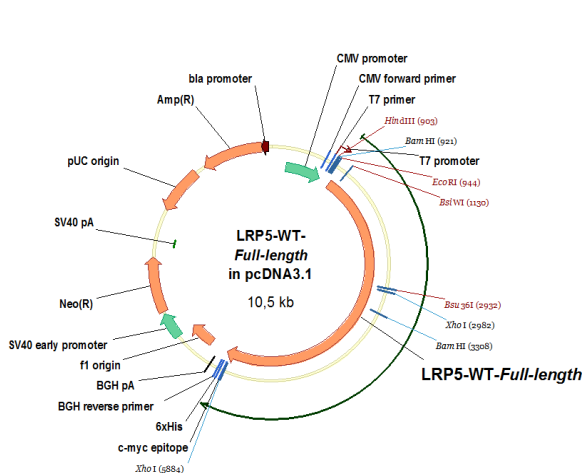
Primernamen	Forward-Primer-Sequenz	Reverse-Primer-Sequenz
<i>LRP5L</i> -MTN-1F u. R*	tGGACAACATGGAGGcTGCaCt	TGcTGGATGTCGTCCAAGCTG
β -AKTIN-F u. R	AACGGCTCCGGCATGTGCAA	CTCAAACATGATCTGGGTCACTT
<i>LRP5</i> -NB-Sonde-F u. R	ATCAACGTCCACAGGCTGAG	TGGAAACTGGATGCCACAGG

* Kleinbuchstaben in der Primersequenz unterscheiden sich von Basenpaaren von *LRP5*

Vektorkarten

Konstrukte LRP5-WT-Full length-mycHis
Vektor pcDNA3.1-myc/His (5.5 kb) (Invitrogen)
Insert human LRP5-WT-Full-length (5 kb)
Klonierungsstelle EcoRI / EcoRV
Resistenz Ampicillin

LRP5ΔC-WT-myc-His
 pcDNA3.1-myc/His (5.5 kb)
 human LRP5ΔC-WT(4.1 kb)
 EcoRI / ApaI
 Ampicillin



TOPflash (TCF Reporter Plasmid)
 (TK-luciferase reporter)
 5.5kb
 Catalog # 21-170
 Lot # 27752

Product Description: Transfection grade T-cell factor (TCF) reporter plasmid containing two sets (with the second set in the reverse orientation) of three copies of the TCF binding site (wild type) upstream of the Thymidine Kinase (TK) minimal promoter and Luciferase open reading frame. FOPflash (Catalog # 21-169) containing mutated TCF binding sites is also available as a negative control.

Formulation: 5µg affinity purified DNA eluted and packaged aseptically in 50µl of 10mM Tris-HCl, pH 8.0, 1mM EDTA. Frozen solution.

Storage and Stability: Stable for 2 years at -20°C from date of shipment.

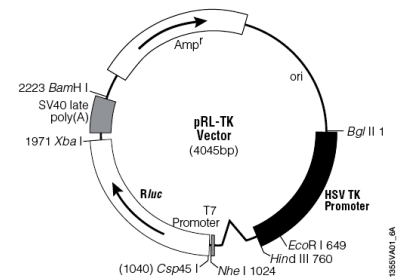
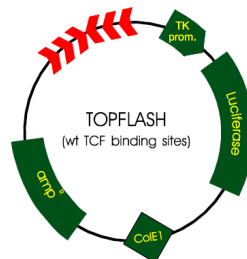
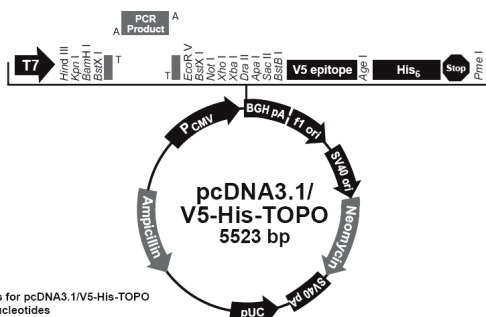


Figure 1. The pRL-TK Vector circle map and sequence reference points.

Sequence reference points:

HSV-TK promoter	7-759
Chimeric intron	826-962
T7 RNA polymerase promoter (-17 to +2)	1006-1024
T7 RNA polymerase transcription initiation site	1023
Rluc reporter gene	1034-1969
SV40 late polyadenylation signal	2011-2212
β-lactamase (Amp ^r) coding region	2359-3219

Note: -^-, position of intron; Rluc, cDNA encoding the *Renilla* luciferase enzyme; Amp^r, gene conferring ampicillin resistance in *E. coli*; ori, origin of plasmid replication in *E. coli*. Arrows within the Rluc and Amp^r gene indicate the direction of transcription.

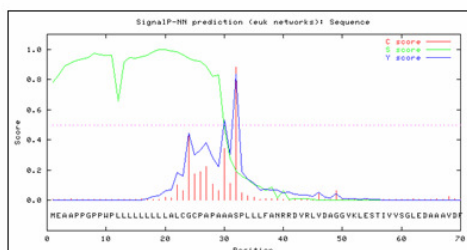


Comments for pcDNA3.1/V5-His-TOPO
 5523 nucleotides

CMV promoter: bases 209-863
 T7 promoter/priming site: bases 863-882
 Multiple cloning site: bases 902-1019
 TOPO® Cloning site: 953-954
 V5 epitope: bases 1020-1061
 Polyhistidine tag: bases 1071-1088
 BGH reverse priming site: bases 1111-1128
 BGH polyadenylation signal: bases 1110-1324
 f1 origin of replication: bases 1387-1800
 SV40 promoter and origin: bases 1865-2190
 Neomycin resistance gene: bases 2226-3020
 SV40 polyadenylation signal: bases 3039-3277
 pUC origin: bases 3709-4382
 Ampicillin resistance gene: bases 4527-5387

WT-9er-Allel

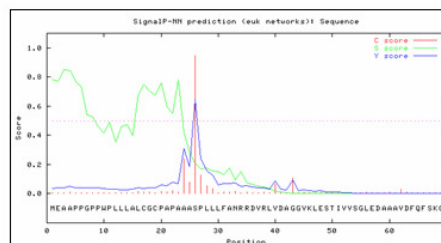
SignalP-NN result:



Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	32	0.885	0.32	YES
max. Y	32	0.835	0.33	YES
max. S	20	0.998	0.87	YES
mean S	1-31	0.886	0.48	YES
D	1-31	0.860	0.43	YES

3er-Allel

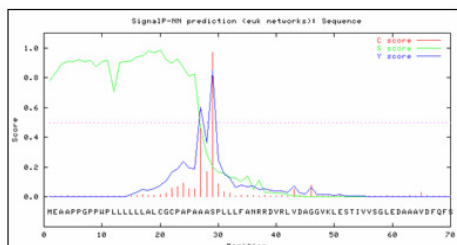
SignalP-NN result:



Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	26	0.948	0.32	YES
max. Y	26	0.647	0.33	YES
max. S	3	0.849	0.87	NO
mean S	1-25	0.603	0.48	YES
D	1-25	0.625	0.43	YES

6er-Allel

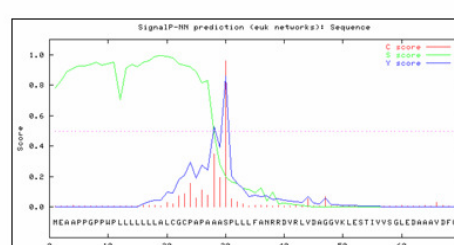
SignalP-NN result:



Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	29	0.971	0.32	YES
max. Y	29	0.849	0.33	YES
max. S	20	0.986	0.87	YES
mean S	1-28	0.858	0.48	YES
D	1-28	0.854	0.43	YES

7er-Allel

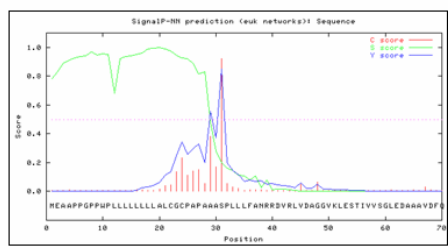
SignalP-NN result:



Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	30	0.961	0.32	YES
max. Y	30	0.858	0.33	YES
max. S	19	0.994	0.87	YES
mean S	1-29	0.876	0.48	YES
D	1-29	0.867	0.43	YES

8er-Allel

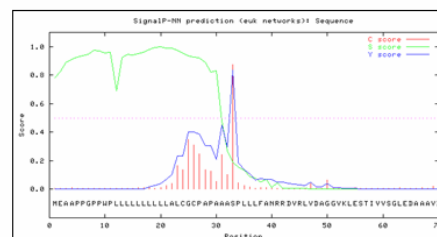
SignalP-NN result:



Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	31	0.923	0.32	YES
max. Y	31	0.848	0.33	YES
max. S	20	0.997	0.87	YES
mean S	1-30	0.882	0.48	YES
D	1-30	0.865	0.43	YES

10er-Allel

SignalP-NN result:

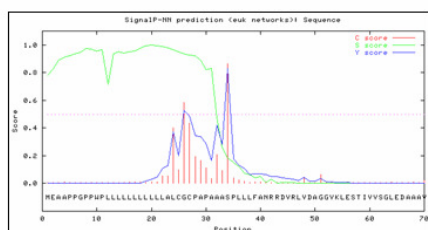


Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	33	0.874	0.32	YES
max. Y	33	0.833	0.33	YES
max. S	20	0.999	0.87	YES
mean S	1-32	0.889	0.48	YES
D	1-32	0.861	0.43	YES

Abb. 7.2.1: *In silico* Analyse der LRP5-Signalpeptid-Varianten mit 9, 3, 6, 7, 8, und 10 Leucinen im Signalpeptid. Der N-Terminus mit den ersten 40 Aminosäuren des LRP5-Wildtyp-Allels (WT_{9L}) bzw. der anderen Allel-Varianten wurde anhand der Datenbank *SignalP_3.0 Server* www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ *in silico* analysiert. Der angegebene *S-Score*, der jede einzelne Aminosäure als Teil eines Signalpeptids einordnet, fällt bei der mutierten Signalpeptid-Sequenz (Mut_{3L}) unter den Schwellenwert von 0,5. Sowohl der *C-Score* als auch der *Y-Score* geben die Position zur Signalpeptid-Abspaltung an. Bei den anderen Varianten zeigt sich eine quantitative Abschwächung des *S-Scores*.

11er-Allel

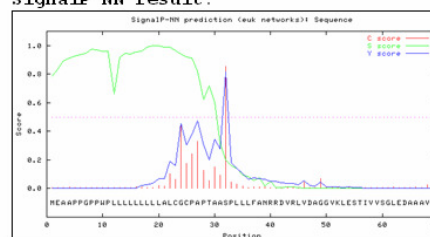
SignalP-MN result:



Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	34	0.862	0.32	YES
max. Y	34	0.830	0.33	YES
max. S	20	0.999	0.87	YES
mean S	1-33	0.892	0.48	YES
D	1-33	0.861	0.43	YES

Punkt-Mutation - A29T

SignalP-MN result:



Measure	Position	Value	Cutoff	signal peptide?
max. C	32	0.855	0.32	YES
max. Y	32	0.814	0.33	YES
max. S	20	0.998	0.87	YES
mean S	1-31	0.880	0.48	YES
D	1-31	0.847	0.43	YES

Abb. 7.2.2: *In silico* Analyse des LRP5-Signalpeptid-Varianten mit 11 Leucinen im Signalpeptid sowie der A29T-Mutante. Der N-Terminus mit den ersten 40 Aminosäuren LRP5-Signalpeptid-Varianten wurde anhand der Datenbank *SignalP_3.0 Server* www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/ *in silico* analysiert. Der angegebene S-Score, der jede einzelne Aminosäure als Teil eines Signalpeptids einordnet, ist im Vergleich zum Wildtyp (Abb. 7.2.1) etwas geringer. Sowohl der C-Score als auch der Y-Score geben die Position zur Signalpeptid-Abspaltung an.

Tab. 7.9: Tabellarische Zusammenfassung der von der Firma Qiagen validierten (*LRP5*) bzw. selbst designten (*LRP5L*) siRNAs und der dazugehörigen verwendeten Primer zur quantitativen RT-PCR (Kapitel 2.17 und 3.4.6).

LRP5	siRNA-Sequenz	
<i>LRP5</i> -siRNA (Ex13)	TCGGATGATCCCGGACGACCA	
Primer	Primer-Sequenz	RT-PCR-Produkt
<i>LRP5</i> -siRNA-F	5'-ACAAGACTAGCGGCCGGAAC-3'	120 bp (Ex12)
<i>LRP5</i> -siRNA-R	5'-CTGTATGCACAACAACGGGC-3'	
LRP5L	siRNA-Sequenz	
<i>LRP5L</i> -siRNA	CGATCAGTGTGATGAGACGA	
Primer	Primer-Sequenz*	RT-PCR-Produkt
<i>LRP5L</i> -siRNA-F	5'-ACAAGATCGAGGcgatcagtgtc-3'	132 bp
<i>LRP5L</i> -siRNA-R	5'-tGATGCTGtGgTgCTGCCAGgCg-3'	

* Basen in Kleinbuchstaben in der Primersequenz unterscheiden sich an der Position von *LRP5*

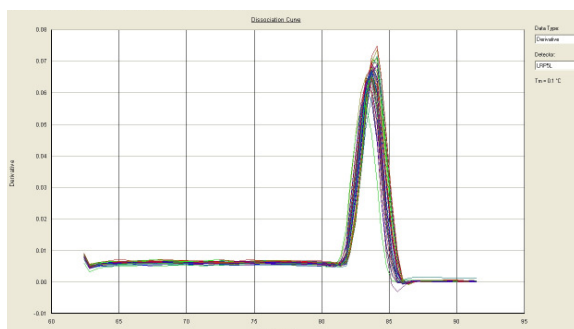
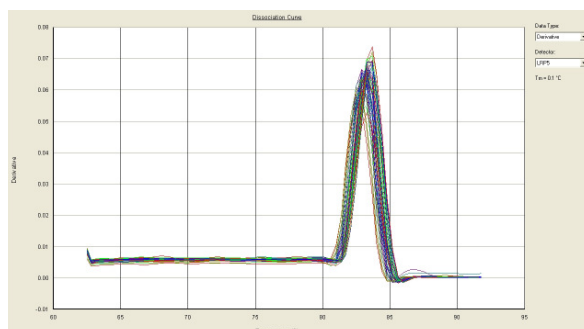


Abb. 7.3: Schmelzkurvenanalysen der quantitativen RT-PCR für *LRP5* und *LRP5L* (Kapitel 2.17).

TEILPUBLIKATIONEN

Chung BD, Kayserili H, Ai M, Freudenberg J, Uzümcü A, Uyguner O, Bartels CF, Höning S, Ramirez A, Hanisch FG, Nürnberg G, Nürnberg P, Warman ML, Wollnik B, Kubisch C, Netzer C. (2009) A mutation in the signal sequence of LRP5 in a family with an osteoporosis-pseudoglioma syndrome (OPPG)-like phenotype indicates a novel disease mechanism for trinucleotide repeats. Hum. Mutat. 30(4):641-8.

Kuhn J, Brümmendorf TH, Brassat U, Lehnhardt FG, **Chung BD**, Harnier S, Bewermeyer H, Harzheim A, Assheuer J, Netzer C. (2009) Novel KRIT1 mutation and no molecular evidence of anticipation in a family with cerebral and spinal cavernous malformations. Eur Neurol. 61(3):154-8.

KONGRESSBEITRÄGE

Chung BD, Chen Y, Kubisch C, Ramirez A, Netzer C. (2006) Molecular cloning and characterization of a novel member of the LIM domain gene family. Medizinische Genetik (Abstraktband). Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Heidelberg

Chung BD, Kaiserili H, Ai M, Bartels C, Üzümcü A, Nürnberg P, Nürnberg G, Warman ML, Wollnik B, Kubisch C, Netzer C. (2008) Unusual LRP5 mutations cause an atypical phenotype in a Turkish family and provide evidence that genetic variation in the signal peptide influences translation efficiency. Medizinische Genetik. (Abstraktband). Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Humangenetik, Hannover

DANKSAGUNG

Mein erster Dank gilt Herrn Prof. Dr. Christian Kubisch für die außerordentlich gute, fachliche und langjährige Betreuung dieser Doktorarbeit, sein Vertrauen, seine Unterstützung, Anregungen, Ideen und konstruktive Kritik sowie die Überlassung dieses spannenden Themas.

Herrn Prof. Dr. Thomas Wiehe möchte ich ebenfalls ganz herzlich für die Betreuung und freundliche Übernahme des Koreferats meiner Doktorarbeit danken.

Herrn Prof. Dr. Matthias Hammerschmidt danke ich für die freundliche Übernahme des Vorsitzes der Prüfungskommission.

Für die Möglichkeit, diese Arbeit am Institut für Humangenetik der Universität zu Köln durchführen zu können sowie für die stets angenehme und motivierte Arbeitsatmosphäre am Institut, danke ich unserer Institutsdirektorin Frau Prof. Dr. Brunhilde Wirth ganz herzlich.

Ein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. Christian Netzer für die Überlassung dieses Projektes, sein Vertrauen, die langjährige Betreuung, konstruktive Kritik, seine Hilfsbereitschaft, Unterstützung und unendliche Geduld.

Herrn Dr. Bernd Wollnik (Inst. für Humangenetik der Uniklinik Köln), Frau Dr. Hülya Kayserili (Abteilung für Med. Genetik der Universität Istanbul), den Mitarbeitern der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. Peter Nürnberg des Max-Dellbrück-Centrums in Berlin und des *Cologne Center for Genomics (CCG)* der Universität zu Köln, Herrn Dr. Jan Freudenberg (*Center for Genomics and Human Genetics, Feinstein Institute for Medical Research, North Shore–Long Island Jewish (LIJ) University Hospital, Manhassat, New York, USA*) und insbesondere Herrn Prof. Dr. Matthew Warman und seinen Mitarbeitern Herrn Dr. Minrong Ai und Frau Dr. Cindy Bartels (*Department of Genetics and Center for Human Genetics, Case School of Medicine and University Hospital of Cleveland, Cleveland, Ohio, USA*) danke ich für die freundliche Zusammenarbeit im Rahmen dieses Projektes.

Auch meinen lieben Kollegen aus der Arbeitsgruppe Kubisch gilt ein ganz ganz herzlicher Dank für den stets heiteren Laboralltag sowie für den fachlichen und wissenschaftlichen Austausch. Dabei möchte ich insbesondere Barbara Stiller und André Heimbach für die besondere Freundschaft danken.

Meiner lieben Freundin Katharina Goerg danke ich herzlichst für die Durchsicht des Manuskripts, ihre besondere freundschaftliche Unterstützung während meiner Doktorarbeit und insbesondere für die außergewöhnliche und langjährige Freundschaft.

Lieben Dank auch an Dr. Gökhan Yigit für die sehr fachliche und gute Durchsicht des Manuskriptes, für Geduld, Motivation, fachliche Diskussionen und Aufmunterung während der Endphase dieser Arbeit.

Von ganzem Herzen möchte ich an dieser Stelle meinen liebevollen Eltern, meiner Schwester Binh und meinem Bruder Hang danken, die mich in jeglicher Hinsicht uneingeschränkt unterstützen, fördern, an mich glauben und mich stets in allen Lebenslagen begleiten. Besonderer Dank gilt dabei meiner lieben Schwester für ihre immerwährende Fürsorge, Motivation, Ablekung, und Aufmunterung, insbesondere in der Endphase dieser Arbeit.

Schließlich gilt ein ganz besonderer Dank meinem lieben Freund Oliver für seine unendliche Geduld, sein Verständnis, aber auch Motivation und liebevolle Unterstützung während der ganzen Zeit meiner Doktorarbeit. Insbesondere danke ich für die Zeit außerhalb des Laboralltags.

LEBENS LAUF

Aus Datenschutzgründen ist mein Lebenslauf in der elektronischen Version meiner Dissertation nicht mit veröffentlicht.

ERKLÄRUNG

Hiermit versichere ich, Boidinh Chung, dass die von mir vorgelegte Dissertation selbständig angefertigt, die benutzten Quellen und Hilfsmittel vollständig angegeben und die Stellen der Arbeit – einschließlich Tabellen, Karten und Abbildungen –, die anderen Werken im Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen sind, in jedem Einzelfall als Entlehnung kenntlich gemacht habe; dass diese Dissertation noch keiner anderen Fakultät oder Universität zur Prüfung vorgelegen hat; dass sie – abgesehen von den angegebenen Teilpublikationen – noch nicht veröffentlicht worden ist, sowie dass ich eine solche Veröffentlichung vor Abschluss des Promotionsverfahrens nicht vornehmen werde. Die Bestimmungen der Promotionsordnung sind mir bekannt. Die von mir vorgelegte Dissertation ist von Herrn Prof. Dr. Christian Kubisch und von Herrn Prof. Dr. Thomas Wiehe betreut worden.

Köln, 28. April 2009

Boidinh Chung