

Aus dem Institut für Medizinische Genetik  
der Medizinischen Fakultät Charité – Universitätsmedizin Berlin

**DISSERTATION**

**Medizinische und molekulargenetische Untersuchung von  
Cherubismuspatienten**

zur Erlangung des akademischen Grades  
Doctor medicinae dentariae (Dr. med. dent.)

vorgelegt der Medizinischen Fakultät  
Charité – Universitätsmedizin Berlin

von

Beatrice Biernat, geb. Dette

aus Berlin

Gutachter: 1. Prof. Dr. R. Witkowski

2. Prof. Dr. C. Opitz

3. Prof. Dr. med. G. Thiel

Datum der Promotion: 23. Juni 2013

## Inhaltsverzeichnis

|        |   |    |
|--------|---|----|
| 1      | Einleitung und Aufgabenstellung .....               | 8  |
| 2      | Krankheitsbild Cherubismus .....                    | 10 |
| 2.1    | Ätiologie und Pathogenese .....                     | 10 |
| 2.2    | Genetik und molekulare Grundlagen.....              | 10 |
| 2.3    | Klinische Befunde beim Cherubismus .....            | 28 |
| 2.4    | Radiologische Zeichen .....                         | 31 |
| 2.5    | Histologie.....                                     | 32 |
| 2.6    | Differentialdiagnosen .....                         | 34 |
| 2.7    | Therapie .....                                      | 35 |
| 3      | Patienten und Methodik .....                        | 38 |
| 3.1    | Ablauf der Untersuchung.....                        | 38 |
| 3.2    | Klinische Untersuchungsparameter der Patienten..... | 38 |
| 3.3    | Labormethoden.....                                  | 39 |
| 3.3.1  | Präparation von genomischer DNA aus Vollblut.....   | 42 |
| 3.3.2  | Generierung der Oligonukleotide.....                | 44 |
| 3.3.3  | Polymerase- Kettenreaktion .....                    | 47 |
| 3.3.4  | Standardansatz für die PCR.....                     | 50 |
| 3.3.5  | Agarose-Gelelektrophorese .....                     | 51 |
| 3.3.6  | Optimierung der Polymerasekettenreaktion.....       | 52 |
| 3.3.7  | Enzymatische Reinigung der PCR-Produkte .....       | 52 |
| 3.3.8  | Sequenzierung .....                                 | 53 |
| 3.3.9  | Sequenzieransatz .....                              | 55 |
| 3.3.10 | Snapshotverfahren.....                              | 56 |
| 4      | Ergebnisse .....                                    | 58 |
| 4.1    | Auswertung der Sequenzierung des SH3BP2-Gens.....   | 58 |
| 4.2    | Fallbeschreibung.....                               | 64 |
| 4.3    | Tabellarische Darstellung der Ergebnisse .....      | 75 |

|     |  |     |
|-----|--|-----|
| 5   | Diskussion .....   | 78  |
| 5.1 | Klinische Darstellungen .....  | 78  |
| 5.2 | Kasuistiken mit molekulargenetischen Befunden .....                      | 79  |
| 5.3 | Molekulargenetische Befunde .....  | 79  |
| 5.4 | Untersuchungen auf Proteinebene .....                                    | 79  |
| 5.5 | Klinische Befunde mit Bezug zu den molekulargenetischen Grundlagen ..... | 80  |
| 6   | Zusammenfassung .....  | 92  |
| 7   | Abkürzungsverzeichnis .....  | 95  |
| 8   | Literaturverzeichnis.....  | 100 |
| 9   | Danksagung.....  | 110 |
| 10  | Lebenslauf.....  | 111 |
| 11  | Erklärung.....   | 112 |

## Abbildungsverzeichnis

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 1 Proteinbiosynthese mit den Anteilen der Transkription und Translation ..... | 12 |
| Abbildung 2 SH3BP –Protein .....  | 13 |
| Abbildung 4 Guanosintriphosphatase, Subfamilie Ras.....                                 | 16 |
| Abbildung 5 Bänder und Stäbchenmodell des Parathormons .....                            | 18 |
| Abbildung 6 Grafische Darstellung des MSX1 Proteins .....                               | 19 |
| Abbildung 7 Humaner Acidic fibroblast growth factor (AFGF) .....                        | 21 |
| Abbildung 8 Transkriptionsfaktors Cbfa.....   | 22 |
| Abbildung 9 Grafische Darstellung eines IgG-Antikörpers.....                            | 24 |
| Abbildung 10 Spleen tyrosine kinase (Syk).....  | 25 |
| Abbildung 11 Mäuseenzym rank (receptor activator of NF- $\kappa$ B).....                | 26 |
| Abbildung 12 NFAT Komplex (nuclear factor of activated T-cells).....                    | 27 |
| Abbildung 13 100bp PCR- Marker für die Gelelektrophorese .....                          | 39 |
| Abbildung 14 1kbp PCR- Marker für die Gelelektrophorese .....                           | 39 |
| Abbildung 15 Gelelektrophorese nach eigener Durchführung .....                          | 45 |
| Abbildung 16 Snapshot-Ergebnis (p.Pro 418 Arg) .....                                    | 57 |
| Abbildung 17 Snapshot-Ergebnis (p.Pro 418 His).....                                     | 57 |
| Abbildung 18 SH3BP2 Gen mit Polymorphismus in Exon 2 Position 243 .....                 | 60 |
| Abbildung 19 SH3PB2 Gen mit Polymorphismus in Exon 4 Position 396 .....                 | 61 |
| Abbildung 20 SH3BP2 Gen mit Polymorphismus in Exon 4 Position 420 .....                 | 61 |
| Abbildung 21 SH3BP2 Gen mit Polymorphismus in Exon 8 Position 870 .....                 | 62 |
| Abbildung 22 SH3BP2-Gen mit Mutation (p.P 418 R) .....                                  | 62 |
| Abbildung 23 SH3BP2-Gen mit Mutation (p.P 418 H).....                                   | 63 |
| Abbildung 24 SH3BP2-Gen mit Mutation (p.G 420 R).....                                   | 63 |
| Abbildung 25 Frontalansicht von Patient A.G.....  | 65 |
| Abbildung 26 Portraitansicht von Patient A.G.....                                       | 65 |
| Abbildung 27 Frontalansicht von Patient K.-U. G.....                                    | 66 |
| Abbildung 28 Gebißsituation von Patient K.-U. G.....                                    | 66 |
| Abbildung 29 Portraitansicht von Patientin L. R.....                                    | 67 |
| Abbildung 30 Ansicht des Unterkiefers der Patientin L. R.....                           | 68 |
| Abbildung 31 Frontalansicht von Patientin H.....  | 68 |
| Abbildung 32 Frontalansicht Patientin C.A.V.....  | 70 |
| Abbildung 33 OPTG von Patientin C.A.V.....  | 70 |
| Abbildung 35 OPTG von Patientin C.M.C.G.....  | 72 |

|   |    |
|---|----|
| Abbildung 37 Gebißsituation von Patient J.T. ....   | 73 |
| Abbildung 38 Patientin C.M.C.G. mit 4 Jahren .....  | 83 |
| Abbildung 39 Patientin C.M.C.G. mit 9 Jahren .....  | 84 |
| Abbildung 40 Patientin C.M.C.G. mit 10 Jahren ..... | 84 |
| Abbildung 41 Patientin C.M.C.G. mit 11 Jahren ..... | 85 |

## **Tabellenverzeichnis**

|  |    |
|--|----|
| Tabelle 1 Klassifikation nach Kalantar .....                                 | 30 |
| Tabelle 2 Verzeichnis der verwendeten Reagenzien.....                        | 39 |
| Tabelle 3 Verzeichnis der verwendeten Kit-Systeme .....                      | 40 |
| Tabelle 4 Verzeichnis der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien ..... | 40 |
| Tabelle 5 Verzeichnis der genutzten Anwendungen zur Genomanalyse.....        | 42 |
| Tabelle 6 Verzeichnis der verwendeten Internetressourcen.....                | 42 |
| Tabelle 7 Übersicht der untersuchten Exone und zugehöriger Primer.....       | 46 |
| Tabelle 8 Temperaturprofil für PCR Standardansatz.....                       | 50 |
| Tabelle 9 Programmablauf für den Thermocycler .....                          | 52 |
| Tabelle 10 Temperaturprofil der Thermocycler für die Sequenzreaktion.....    | 55 |
| Tabelle 11 Übersicht der Mutationspositionen des SH3BP2-Gens .....           | 59 |
| Tabelle 12 Übersicht der Polymorphismuspositionen des SH3BP2-Gens.....       | 60 |
| Tabelle 13 Übersicht der Ergebnisse.....                                     | 75 |

# 1 Einleitung und Aufgabenstellung

Der Cherubismus wurde erstmals 1933 von Jones beschrieben (Jones W 1933), (McKusick VA, Antonarakis SE 1998). Zurzeit sind in der Weltliteratur ca. 200 Fälle bekannt. Die WHO-Klassifikation ordnet die Erkrankung in die Gruppe der nicht neoplastischen Läsionen des Knochens ein (Kramer IR et al. 1992).

Der Name "Cherubismus" leitet sich von den Engelsdarstellungen der Renaissancebilder ab. Die dort gezeigten Cherubine mit pausbäckigem Gesichtsausdruck, dem himmelwärts gerichteten Blick und den sichtbaren unteren Skleren entsprechen der Erkrankung „Cherubismus“ bei gleichzeitigen Veränderungen im Ober- und Unterkiefer und dabei starker Größenzunahme des Oberkiefers (Jones W 1933).

Weitere Auffälligkeiten, neben den bilateralen, schmerzlosen Schwellungen der Wangen und der submandibulären Kieferknochenregion, sind die Hypodontien und Dislokationen sowie Formanomalien der Zähne (Wiedemann H et al. 1989). Zwischen dem 18. Lebensmonat und dem 7. Lebensjahr treten erste klinische Symptome auf (Graf A 1982). Das klinische Bild des Cherubismus reicht von Mikrosymptomen bis zu schwerwiegenden Veränderungen mit Entstellungen des Gesichtes und funktionellen Beeinträchtigungen (Ayoub AF, el-Mofty SS 1993), (Belloc JB et al. 1993), (Essafi Z, Slesinger MJ 1976), (Frenkel GS, Hauk H 1983), (Kalantar MH 1998), (Kaugars GE et al. 1992), (Timosca GC 1996).

Röntgendiagnostisch sind multilokuläre und zystisch imponierende Defekte erkennbar, diese sind aber fast ausschließlich auf den Gesichtsschädel beschränkt. Histologisch ist der Cherubismus durch lockeres, fibröses Gewebe mit Spindelzellen und mehrkernigen Riesenzellen gekennzeichnet (Hauenfelder H 1967).

Trotz der genannten, unterschiedlichen Symptome sind differentialdiagnostisch andere Erkrankungen, wie Kieferknochenveränderungen, Stoffwechselstörungen und weitere Syndrome auszuschließen. Auch initial unilaterale Schwellungen (Arnott DG 1978), (Wayman JB 1978), (Reade PC et al. 1984) und einige nichtfamiliäre Krankheitsfälle (DeTomaso DC et al. 1985), (Benetti C et al. 1995) sind zu beobachten und erschweren die Diagnosestellung. Zu einer eindeutigen Diagnose müssen daher neben einer positiven Familienanamnese, klinischen, röntgenologischen und histologischen Befunden, normalen

Blutwerten, auch eine Manifestation im ersten Lebensjahrzehnt und der Mutationsnachweis im SH3BP2-Gen zusammentreffen (Foissin B, Ohanian D 1965).

Da der Cherubismus eine Erkrankung mit regressiver Tendenz ist, wird therapeutisch nur zurückhaltend eingegriffen. Das Mittel der Wahl bei starken Deformationen ist die chirurgische Intervention (Hamner J3, Ketcham AS 1969), (Katz JO et al. 1992), (Regezi JA et al. 1987), (Timosca GC 1996).

Bei einer Mutation im Gen für das SH3- Bindungsprotein (SH3BP2) ist die Diagnose gesichert (Mangion J et al. 1999), (Tiziani V et al. 1999), (Ueki Y et al. 2001). Es sind verschiedene Mutationen bekannt.

Ziel dieser Arbeit ist es, eine Verbindung zwischen der klinischen Symptomatik und der diagnostizierten Mutation bei dieser autosomal-dominant bedingten Erkrankung aufzuzeigen. Dazu wurde bei 68 Patienten aus 17 Familien die Mutation im SH3BP2- Gen analysiert, das klinische Bild bei 8 Patienten eingehend untersucht. Bei diesen Patienten konnten anschließend die klinischen Befunde und die zugrunde liegende Mutation verglichen werden. In der darauf folgenden Diskussion werden die Möglichkeiten und Grenzen einer klinischen Prognose aufgrund einer bekannten Mutation in der genetischen Beratung dargestellt.

## **2 Krankheitsbild Cherubismus**

### **2.1 Ätiologie und Pathogenese**

Seit der Erstbeschreibung des Krankheitsbildes Cherubismus, gab es unterschiedliche Hypothesen für seine Entstehung.

Jones nahm eine odontogene Läsion an, die durch eine überschießende Milchzahnresorption oder den Wachstumsdruck der bleibenden Zähne verursacht wird (Jones W 1933). Später wurde eine familiäre Form der fibrösen Dysplasie vermutet (Jones WA 1965), (McClendon J 1962). Unterschiedliche Autoren sahen den Cherubismus auch als eine Form des Riesenzellgranuloms (Hamner J3 1969), (Hamner J3, Ketcham AS 1969), (Hebert JM et al. 1972), (Thoma K 1962) an. Weiterhin wurden eine Zwischenform von fibröser Dysplasie und Riesenzellgranulom (Bradley Tr et al. 1967), (Friedman E, Eisenbud L 1981), ein resorptiver, reparativer Tumor (Hauenfelder H 1967), (Jones WA 1965), (McClendon J 1962), (Thoma K 1962) und ein Hämartom (Hoppe W et al. 1966) diskutiert.

Erst mit der Lokalisation und Identifikation eines Gens für Cherubismus auf dem Chromosom 4 konnte die genetische Ätiologie der Erkrankung bestätigt werden (Mangion J et al. 1999), (Tiziani V et al. 1999), (Ueki Y et al. 2001).

Die dort gefundenen Punktmutationen im Gen für das SH3- Bindungsprotein führen zu Veränderungen im Protein, dadurch wahrscheinlich zu einer Dysfunktion des Proteins in vivo und somit zu Entzündungsprozessen und Veränderungen im Knochen (Miah SM et al. 2004). Weitere Einzelheiten zu den Auswirkungen der Punktmutationen auf die Funktion des Gens unter Absatz 4.2 (Mutation im SH3BP2-Gen).

### **2.2 Genetik und molekulare Grundlagen**

Die Zahnentwicklung wurde schon früh als Auslöser für den Cherubismus vermutet (Jones WA 1965). Der Manifestationszeitpunkt der Krankheit und der ausgeprägte Befall des Ober- und Unterkiefers sind Anzeichen für diese Möglichkeit. Es wurde angenommen, daß die wachsenden Zahnkeime einen auslösenden Reiz auf die Kieferknochen darstellen und die pathologische (exzessiv osteolytische) Reaktion im Gewebe hervorrufen (Jones WA 1965).

Die zweiten und dritten Molaren sind die einzigen Zähne, die mit der Geburt noch nicht komplett entwickelt sind. Da die Mineralisation dieser Zähne im Alter von zwei bis drei Jahren beginnt, ist eine Verbindung mit der Krankheitsentstehung möglich (Hyckel P et al.

2005). Weiterhin kann auch die Remission des Cherubismus im Erwachsenenalter in Verbindung mit der dann abgeschlossenen Molarenodontogenese gebracht werden. Der Befall der Orbita und der „Himmelsblick“ können auch mit der Entstehung der letzten Molaren begründet werden, da die Zahnkeime in Alter von 2-3 Jahren hoch im Tuber lokalisiert sind (Hyckel P et al. 2005).

Der Zahndurchbruch und das Zahnwachstum der zweiten Dentition, v.a. der zweiten und dritten Molaren, triggern Wachstumssignale. Diese Signale gelangen während des Wachstums durch die extrazelluläre Matrix an Maxilla und Mandibula. Sie steuern die Erhöhung der Osteoblasten- und Osteoklastenaktivität, die beim Zahndurchbruch und beim Kieferwachstum eine wichtige Rolle spielen. Ein gestörtes Gleichgewicht zwischen Knochenauf- und -abbau könnte die Läsionen verursachen. Mit dabei involviert ist das genetisch veränderte Signalprotein SH3BP2.

Der Cherubismus folgt dabei einem autosomal dominanten Erbgang. Das verantwortliche Gen hat eine variable Expressivität und eine Penetranz von 100% beim männlichen und von 50 - 70% beim weiblichen Geschlecht. Dabei reicht das klinische Bild von Mikrosymptomen bis hin zu schwerwiegenden Erkrankungen mit völliger Entstellung der Gesichtsform und funktionellen Behinderungen (Ayoub AF, el-Mofty SS 1993), (Belloc JB et al. 1993), (Essafi Z, Slesinger MJ 1976), (Frenkel GS, Hauk H 1983), (Kalantar MH 1998), (Kaugars GE et al. 1992), (Timosca GC 1996).

Beim Cherubismus sind weder geographische noch ethnische Gruppen bevorzugt (McClendon J 1962), (Peters WJ 1979).

Erst 1999 konnte das Gen für den Cherubismus in der Chromosomenregion 4p16.3 eingegrenzt werden (Tiziani V et al. 1999), (Mangion J et al. 1999), (Mangion J et al. 2000). In Nachbarschaft zu dem Gen befinden sich z.B. die Genorte für die Huntington- Erkrankung, für die Achondroplasie, die Hypochondroplasie und das Crouzon- Syndroms. Ein Jahr später gelang es, Punktmutationen im SH3BP2- Gen zu finden (Ueki Y et al. 2001).

Alle dem Cherubismus zugrunde liegenden Mutationen wurden bisher im SH3BP2-Gen gefunden. Sie befinden sich im Exon 9 innerhalb einer Sequenz von 18 Basenpaaren. Das entspricht 6 Aminosäuren: Arg415-Ser416-Pro417-Pro418-Asp419-Gly420, welche 31-36 Aminosäuren upstream von der SH2-Bindungsdomäne und 205-210 Aminosäuren downstream von der SH3-Domäne liegen.

Die Mutation führt zu einer Substitution von Cytosin durch Guanin (p.Pro 418 Arg) oder durch Adenin (p.Pro 418 His) und damit zu einem nichtkonservativen Austausch der Aminosäure Prolin (CCC) durch Arginin (CGC) oder Histidin (CAC). Auch an einer zweiten Position konnte eine Mutation nachgewiesen (p.Gly 420 Arg) werden. Hier wurde Glycin nach Arginin getauscht, Guanin (GGG) gegen Adenin (AGG) in der Aminosäuresequenz geändert.

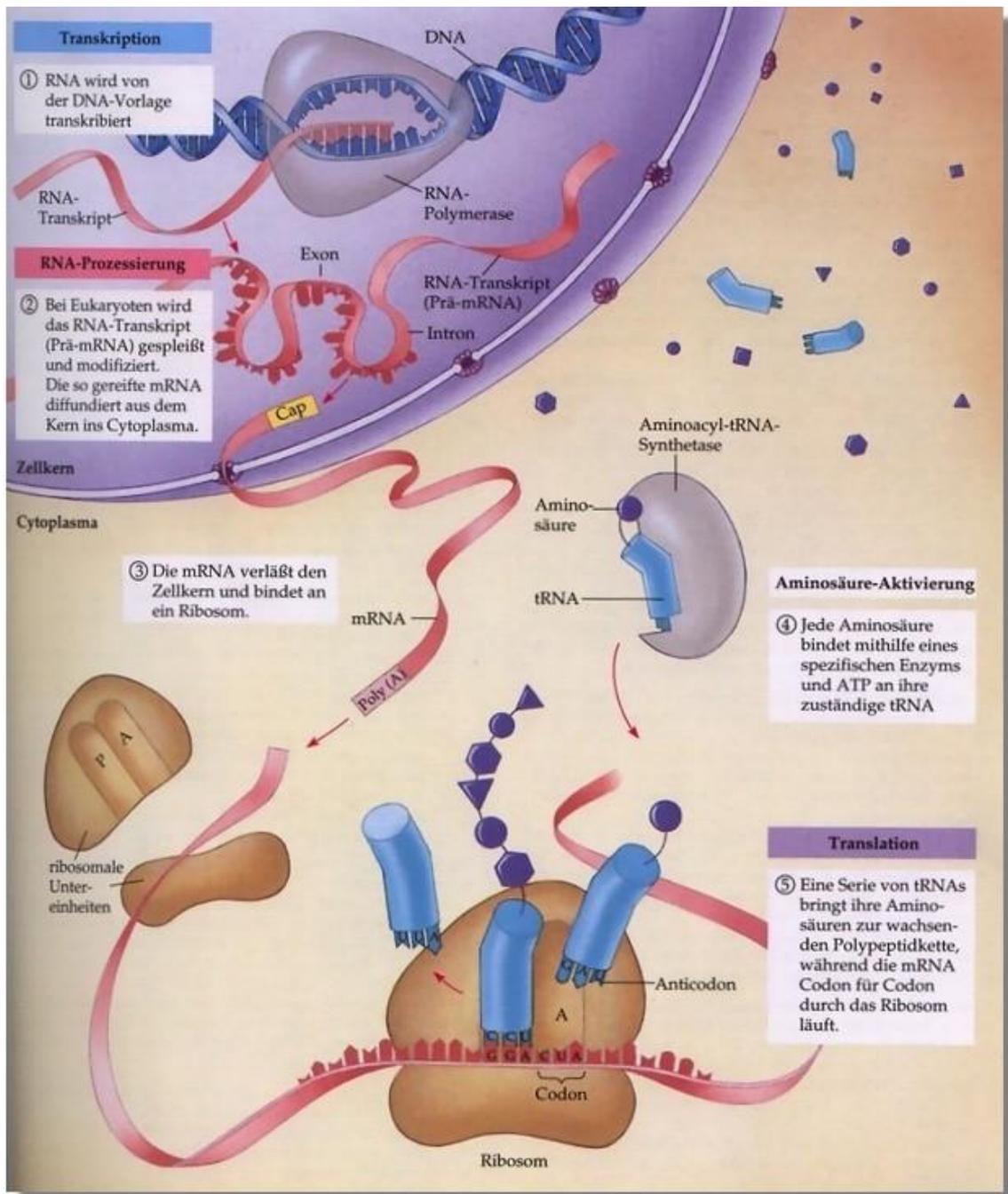


Abbildung 1 Proteinbiosynthese mit den Anteilen der Transkription und Translation (Vereinfachtes Schema der Proteinbiosynthese)

Dieses Protein wurde auf Chromosom 4 während der Suche nach dem verursachenden Gen für die Huntington-Erkrankung beim Menschen entdeckt.

Auffallend ist, daß bei Deletionen in dieser Chromosomenregion außerdem das Wolf-Hirschhorn-Syndrom entsteht. Haploinsuffizienzen bei diesem Syndrom führen aber nicht zu Cherubismus-ähnlichen Symptomen (Ueki Y et al. 2001). Ursache hierfür könnte eine veränderte Proteinfunktion („gain of function“) des SH3BP2-Proteins oder ein dominant-negativer Effekt durch die Mutation sein.

Das verantwortliche SH3BP2-Gen wurde durch Ren et al. als Erster bei der Maus identifiziert (Ren R et al. 1993). Es wurden eine Reihe von kurzen cDNA-Fragmenten vom Menschen vom Chromosom 4 isoliert, wobei ein Fragment zu 84% homolog zum SH3BP2-Gen der Maus war (Jou YS et al. 1994). Alle untersuchten Cherubismuspatienten wiesen eine Mutation in dieser Chromosomenregion (4p16.3) auf.

Das SH3BP2-Gen selber besteht aus 13 Exons und beinhaltet 16,1 Kilobasen. Das Genprodukt stellt ein Adapterprotein (SH3BP2-Protein) aus insgesamt 561 Aminosäuren dar. Das Protein enthält drei unterschiedliche Domänen, eine Src-Homologie-2-Domäne (SH2-Domäne), eine Src-Homologie-3-Domäne (SH3-Domäne) sowie eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) (Bell SM et al. 1997).



*Abbildung 2 SH3BP –Protein mit der Src-Homologie-2-Domäne (SH2-Domäne), der Src-Homologie-3-Domäne (SH3-Domäne) und der Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH-Domäne) (Hatta R et al.)*

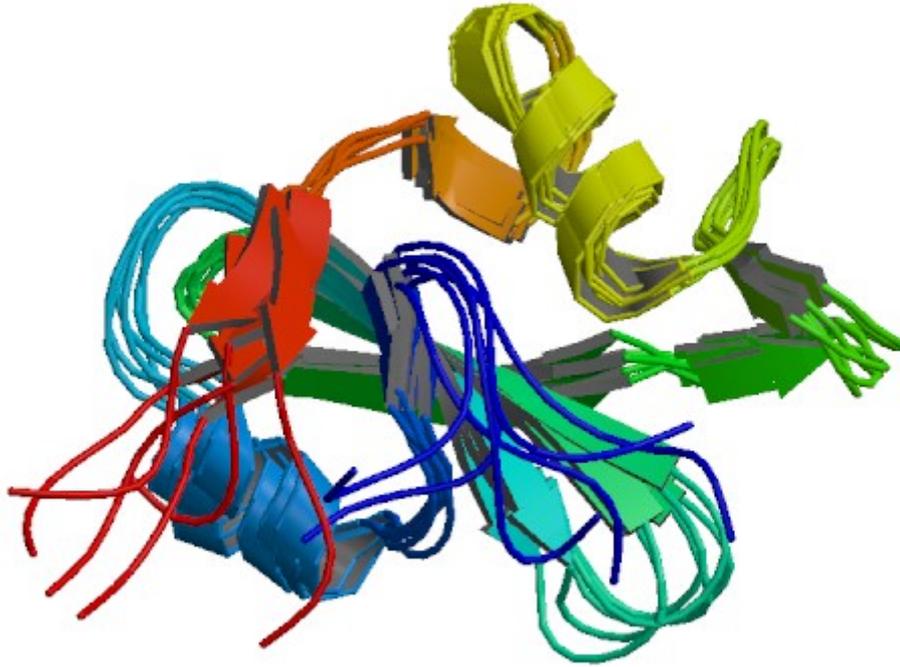
Die Src-Homologie-2-Domäne erhielt den Namen aufgrund der Homologie zum Gen Scr, welches die cytosolische Tyrosin-spezifische Proteinkinase Src (Sarcoma) codiert. Die SH2-Domäne enthält circa 100 Aminosäuren mit einer phosphotyrosinbindenden Schleife. Diese Aminosäuren erkennen somit phosphorylierte Tyrosine. Damit ermöglichen sie Proteinen, die SH2-Domänen besitzen, aktivierte Rezeptor-Tyrosinkinasen und andere intrazelluläre Signalproteine zu binden, die vorübergehend an ihren Tyrosinresten phosphoryliert sind.

Die SH3-Domäne besteht dagegen nur aus neun bis zehn Aminosäuren, die Bindungsdomäne ist prolinreich. Sie ist zu anderen Src-Regionen homolog, und ihre Funktion ist ungeklärt. Vermutlich kann sie in der Zelle an andere Proteine binden.

Auch die PH-Domäne setzt sich, wie die SH2-Domäne, aus etwa 100 Aminosäuren zusammen. Sie hat eine dreidimensionale Struktur, welche aus mehreren antiparallelen  $\beta$ -Faltblättern und einer C-terminalen  $\alpha$ -Helix besteht. Zahlreichen Signalproteine, z.B. mehrere Serin-Threonin-Kinasen, GTPasen, GTP-aktivierende-Proteine und Phospholipasen, sind mit PH-Domänen ausgestattet. Viele Moleküle mit PH-Domäne zeigen Interaktionen mit Guaninnucleotidbindenden-Proteinen (G-Proteinen), wie z.B. mit der  $\beta$ -Adrenorezeptor-Kinase. Somit ist die PH-Domäne wahrscheinlich bei Protein-Protein- oder Protein-Fettsäure-Interaktionen beteiligt (Bell SM et al. 1997).

Einige Adapterproteine verbinden eine SH2- und viele SH3-Domänen. Sie wandeln damit spezifische Phosphotyrosine in definierte Signale um. Durch die Rekrutierung vieler SH3-Bindungsproteine, die in einer spezifischen Zellantwort eingebunden sind, kann eine Phosphotyrosinverbindung mehrere Signale auslösen (Pawson T et al. 2001). Ein Adapter kann somit für mehrere (positive und negative) Regulationen genutzt werden.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, daß die SH3-Gruppe des Proteins bei der Maus in vitro an abl-Onkogen-Produkte bindet (Ren R et al. 1993).



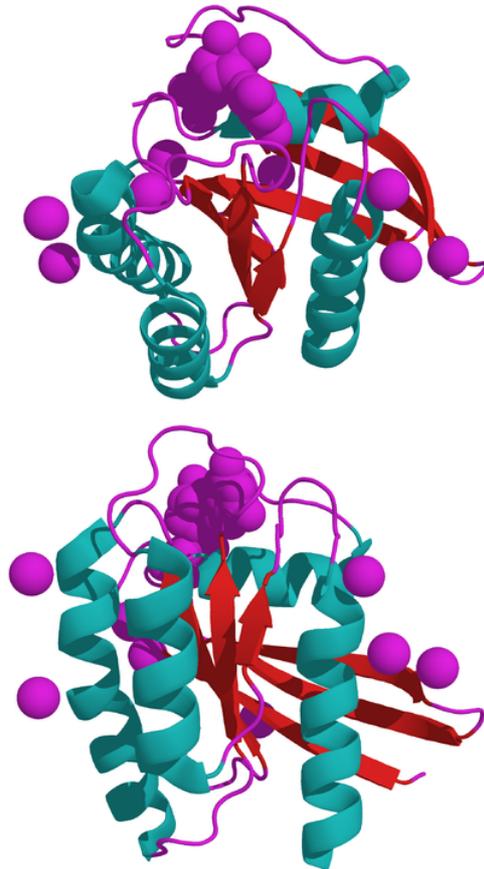
*Abbildung 3 Src- Homologie 2 Domäne von c-abl  
(Overduin M et al.)*

Das in Abbildung 3 dargestellte Protein, auch bekannt als ABL 1, wird im menschlichen Genom durch das ABL-Gen 1 auf dem langen Arm des Chromosoms 9 kodiert. Das ABL-Protein gehört zu der Familie der Tyrosinkinase, die an den Prozessen der Zelldifferenzierung, Zellteilung und Zelladhäsion beteiligt sind.

Das abl-Onkogen ist abgeleitet vom tierischen Retrovirus der Abelson-Maus-Leukämie und gehört in die Klasse III der Onkogene. Diese Klasse beinhaltet Proteine, die an der Signalübertragung beteiligt sind. SH-Domänen sind in vielen Onkogenproteinen nachgewiesen worden. Die Bildung von spezifischen Proteinaggregaten, die normalerweise als signalübertragende Strukturen wirken, gehört augenscheinlich zu den entscheidenden Voraussetzungen der Tumorentwicklung. Durch sie werden Wachstum und Metastasierung der Krebszellen induziert (Luo K, Lodish HF 1996). Diese Verbindung kann einen Hinweis auf die Wirkungsweise des SH3BP2-Proteins geben (Luo K, Lodish HF 1996).

In neueren Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß das SH3BP2-Protein die Funktion der Tyrosinkinase c-abl in einigen Zellen, wie z.B. den Osteoblasten, reguliert. Es beeinflusst vielleicht aber auch verschiedene Signalmoleküle in anderen Zellen, eventuell sogar in den Osteoklasten-Progenitor-Zellen (Ueki Y et al. 2001).

Weiterhin können andere Interaktionen des SH3BP2-Komplexes gestört sein. Es wurden Adaptorproteine beschrieben, die durch eine SH-basierte Interaktion Ras-abhängige Signal-Transduktionswege unterstützen (Han L et al. 1997), (Wang Y et al. 2002), (Tzivion G et al. 2001). Ras (Rat sarcoma) ist ein Proto-Onkogen und ein zentraler Bestandteil verschiedener Signaltransduktionswege, die Wachstums- und Differenzierungsprozesse regulieren.



*Abbildung 4 Guanosintriphosphatase, Subfamilie Ras mit den zusätzlichen posttranslationalen Modifikationen einer Prenylierung und Palmitoylierung (GTPase NRas) (3d structure of NRas GTPase (1-172) from two perspectives with GDP and 8 Mg<sup>2+</sup> Ions after PDB 3CON, 2008)*

Die in Abbildung 4 dargestellten Phosphatasen, kleine Proteine, fungieren als Schalter in Signaltransduktionsketten, ähnlich den Proto-Onkogenen.

Dies ist aber nicht der einzige fundamentale Bestandteil der Signal-Transduktion in der eukaryoten Zelle, auch die Regulation von non-Rezeptor Tyrosin-Kinasen (src, abl) durch die src-homologen Sequenzen SH2 und SH3 gehören dazu.

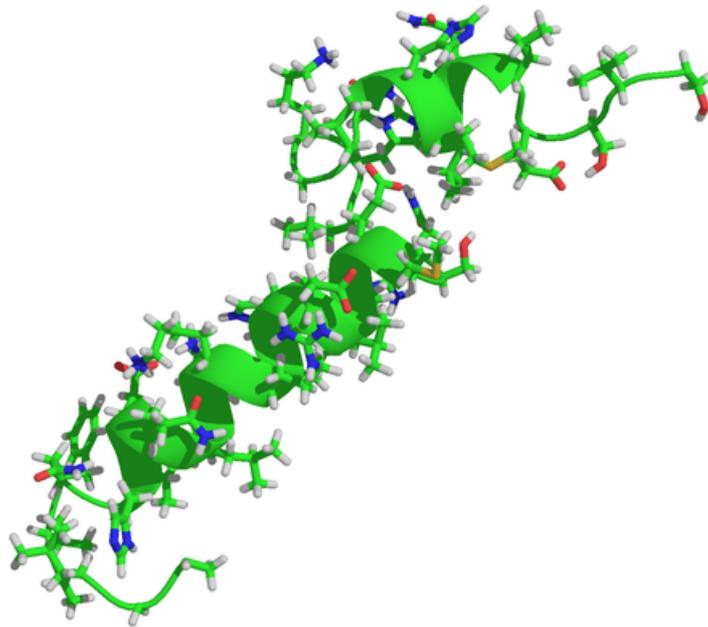
Wang stellt in seiner neuesten Publikation fest, daß die Tyrosinkinase c-Src (cell-sarcoma, zelluläres Sarkomprotein) wahrscheinlich für die Ausprägung aller Läsionen, die

Riesenzellen beinhaltenden (Cherubismus, zentrales Riesenzellgranulom der Kiefer, zentraler Riesenzelltumor), mit verantwortlich ist (Wang C et al. 2006).

Eine Vermutung über die Wirkungen geht auf die eingehende Untersuchung der Umwandlung des hoch konservierten Zellokogens (c-src) des Rous-Sarkoma-Virus in ein Onkogen zurück.

Die intramolekulare Bindung dieses Zellokogens an eine SH2- und SH3-Domäne führt bei diesen beiden Domänen zur Abtrennung der interagierenden Domäne vom exogenen Bindungspartner und zu einer Unterdrückung der Kinaseaktivität. Die Verminderung dieser Aktivität kommt wahrscheinlich durch eine Kopplung der beiden Domänen durch eine kurze Verbindungssequenz zustande. Das konnte durch Untersuchungen der molekularen Beweglichkeit dieses gehemmten Onkogen-SH2/3-Domäne-Komplexes gezeigt werden (Pawson T et al. 2001). Da alle beschriebenen Mutationen direkt in der genetischen Beschreibung der Verbindungsregion von SH2 und SH3 liegen, wird eine verminderte Kinasebindungsaktivität des veränderten Genprodukts vermutet.

Eine weitere Theorie der Entstehung des Cherubismus legt die Ähnlichkeit der Läsionen mit Riesenzellgranulomen nahe. Riesenzellgranulome entstehen aufgrund einer Dysregulation der Parathormonsignaltransduktion. Auch Cherubismusläsionen könnten so entstehen. Einige Veröffentlichungen beschreiben den Einfluss von SH3BP2 auf die Regulation des Parathormonrezeptors (PTH) und dem verwandten (related) Protein (PTHrP).



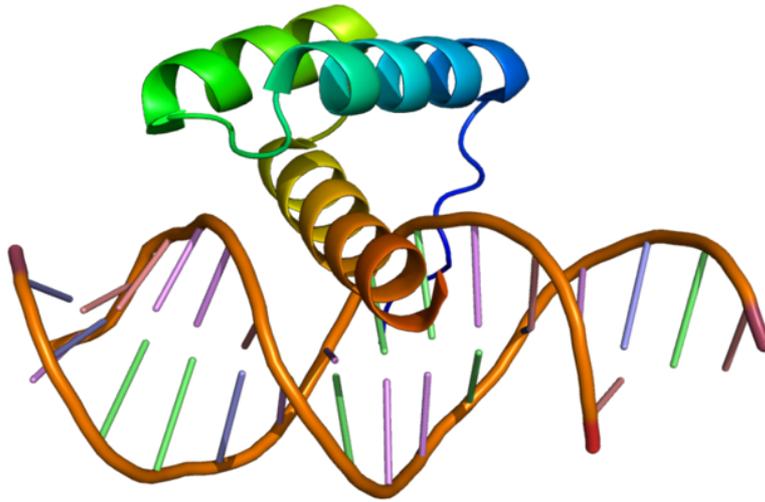
*Abbildung 5 Bänder und Stäbchenmodell des Parathormons  
(3d structure of parathyroid hormone (PTH) fragment 1-39 from PDB 1BWX, 2008)*

Die Sekretion des in Abbildung 5 dargestellten Parathormons wird durch den aktivierten Parathormonrezeptor bei hoher Calciumkonzentration gesenkt. Der 1993 entdeckte Parathormonrezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor und somit calciumsensitiv.

Es konnte nachgewiesen werden, daß SH3BP2 mit dem Chaperone-Protein 14-3-3 interagiert (Foucault I et al. 2003). Dieses Protein ist ein Regulator-Protein des Typ I PTH/PTHrP-Rezeptors (Tazawa H et al. 2003). Die PTHrP-PTHrP-Rezeptor-Interaktion ist von großer Wichtigkeit für die Organisation der Knochenzellen im umgebenden Kieferknochen und deren osteoklastischen Funktion in der normalen Zahnentwicklung und während des Zahndurchbruchs (Philbrick WM et al. 1998), (Wysolmerski JJ et al. 2001), (Mekaapiruk K et al. 2002), (Kitahara Y et al. 2002). Ein durch Mutation verändertes SH3BP2-Protein kann die Interaktion mit dem Chaperone-Protein 14-3-3 aufheben und somit zu Störungen bei der Knochenentwicklung führen (Miah SM et al. 2004).

Auch der direkte Einfluß auf die Zahnentwicklung durch die SH3BP2- Interaktion mit Regulationsmechanismen kann mutationsbedingt gestört sein (Romashkova JA, Makarov SS 1999), (Bushdid PB et al. 2001).

Hierbei interagieren die SH3BP2-abhängigen Signaltransduktionsketten speziell mit diesen Regulationswegen, die zeitweilig die Knochenmorphogenese, v.a. in der Molarenregion, determinieren. Diese Entwicklung reguliert eine Gruppe von kurzzeitig aktiven Entwicklungskontrollgenen, die homeotic selector- Gene (Hox-Gene, Homöotischen Selektor-Gene). Über den PTH-Rezeptor hat die SH3BP2-Mutation auch einen Einfluß auf Msx-1 (vormals Hox-7)-abhängige Regulationen.



*Abbildung 6 Grafische Darstellung des MSX1 Proteins  
(Structure of the MSX1 protein, 2009)*

Das in Abbildung 6 dargestellte MSX1-Protein, auch bekannt als MSH homeobox 1, ist eine ca. 60 Aminosäuren lange Proteindomäne, die an DNA binden kann. Codiert wird diese Domäne durch die Homöobox, einer charakteristischen Sequenz homöotischer Gene. Diese Gene sind zuständig für die Identität von Organstrukturen und Körpersegmenten. Diese Homeoboxen stellen somit einen grundlegenden Regulationsmechanismus bei der Individualentwicklung dar.

Eine direkte Wirkung des PTH- Rezeptor-Signals auf die Msx-Expression konnte dementsprechend festgestellt werden (Satokata I et al. 2000).

Hox-7 (Msx-1) ist zum Beispiel involviert in die Regulation der mesenchymalen-epithelialen Interaktion in der kraniofacialen Morphogenese, v.a. der Strukturen des ersten Kiemenbogens (Chen Y et al. 1996). Die histologischen Untersuchungen der Cherubismusläsionen zeigten bemerkenswerterweise auch nur Derivate des ersten Kiemenbogens.

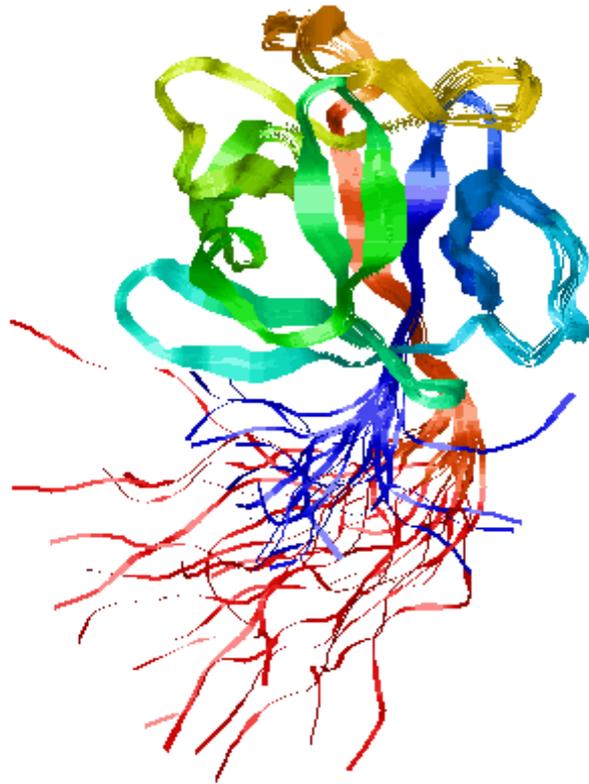
Mutationen im Hox-7-Gen können u.a. zu selektiven Fehlbildungen der zweiten und dritten Molaren oder zu Hypodontien und Spaltbildungen der Lippen oder des Gaumens führen (Wolf- Hirschhorn-Syndrom, Witkop-Syndrom) (Vastardis H et al. 1996), (Hu G et al. 1998).

Ähnliche Beobachtungen können auch bei Mäusen mit genetischen Veränderungen von Msx-1 gemacht werden (Satokata I, Maas R 1994). Einige alte Untersuchungen zeigten außerdem eine Msx-1-Expression in Riesenzellgranulomen, woraus geschlußfolgert werden kann, daß die Entwicklung von Riesenzellgranulomen aufgrund einer Dysregulation von Msx-1 erfolgt.

Diese Beobachtungen führen zu dem Schluß, daß dieses Gen in der frühen Zahnentwicklung eine zentrale Rolle spielt.

Untersuchungen haben bestätigt, daß Hox-7/ Msx-1 die Wechselwirkungen des zahnformenden Epithels und Mesenchyms während der Entwicklung der Zahnkeime durch Interaktion mit Mediatoren der BMP-, FGF-, Wnt- und Hh- Familie und den Homeobox-Genen (homeotischen Genen, Hox-Genen) Dlx-1 und Dlx-2 reguliert (Bei M, Maas R 1998).

Diese Mediatoren sind z.T. Proteine (BMP/ Bone morphogenetic protein; FGF/ Fibroblast growth factor), die einen Knochenwachstumsfaktor darstellen (BMP) oder das Knochenwachstum kontrollieren (FGF).



*Abbildung 7 Humaner Acidic fibroblast growth factor (AFGF)  
Grafische Darstellung der gelösten Struktur in der Anwesenheit eines Proteinstabilisierers (Enomoto  
M et al.)*

Dieser in Abbildung 7 dargestellte Faktor ist ein Subtyp der FGF-Familie, die als Regulator für das Zellwachstum und die Zelldifferenzierung bekannt ist. Die FGF spielen eine Schlüsselrolle in der embryonalen Entwicklung und sind aktiv eingebunden in Wundheilungsprozesse, die Angiogenese und die Regeneration von Nerven- und Knorpelgewebe.

Das Signal- oder Entwicklungsprotein Wnt (abgeleitet von Wg für wingless aus der *Drosophila melanogaster*-Forschung und dem Int-Gen aus der Mäuseforschung) ist Bestandteil eines Signaltransduktionsweges in der Embryonalentwicklung. Zu den Mediatoren gehören aber auch Gene, wie das Gen für die embryonale Entwicklung (Hh/hedgehog gen) und das Homeobox-Gen Dlx (distal-less homeobox). Die postnatale Entwicklung der zweiten und dritten Molaren benötigt eine Reaktivierung dieser embryonalen Mechanismen des Gens Hox-7/ Msx-1.

Das Gen wirkt vor allen Dingen auf die Formation des Kappenstadiums bei der Zahnentwicklung ein. Dieses Kappenstadium ist essentielle Voraussetzung für die weitere Gewebeinteraktion, welche außerdem von einer wachsenden Separierung abhängig ist.

Bei Abwesenheit dieser Separierung beeinflusst die Dysregulation von mesenchyalem, knochenformenden Gewebe die Zahnentwicklung. Die Separierung scheint dabei besonders über die endogene Msx-1 Antisense-Transkription auf die Regulation der Msx-1-Expression einzuwirken. Ein Anwachsen der Msx-1-Antisense-RNA führt demnach zu einer Überexpression von Msx-1 und konsequenterweise zu einem Anwachsen der Cbfa 1-Expression, und damit des osteoblastären Transkriptionsfaktors Core binding factor-alpha 1, und einer Runterregulation der Osteocalcin-RNA (Blin-Wakkach C et al. 2001).



*Abbildung 8 Transkriptionsfaktors Cbfa  
Grafische Darstellung der Faltung (Berardi M et al. 1999)*

Abbildung 8 zeigt eine Darstellung der Faltung des Transkriptionsfaktors Cbfa. Die Cbf sind in die Transkriptionsregulation verschiedener Gene involviert, die für die Hämatopoese wichtig sind. Die heterodimeren Transkriptionsfaktoren enthalten eine DNA-bindende alpha-Untereinheit und eine nicht-DNA-bindende beta-Untereinheit. Die nicht-DNA-bindende beta-Untereinheit verstärkt die Affinität und Stabilität der Bindung der alpha-Untereinheit an die DNA.

Wenn eine genetisch determinierte postnatale Hochregulation von Msx-1 im Kontext einer Molarenentwicklung vorliegt und die Transformation in das Kappenstadium fehlt (wie bei fehlender Separierung), kommt es zu einer unphysiologischen Ausschüttung von Msx-1 in das Knochenmesenchym und damit zu einer insuffizienten Cbfa 1- Expression mit einem Verlust der Osteoblastendifferenzierung. Dieser Proliferationsdruck führt zur Formation von neuem

und undifferenziertem Gewebe (Granulomen). Dies führt zu kortikalen Läsionen und Wurzelresorptionen.

Die außerdem steigende Osteoklastenaktivität und damit wachsende Expression von Osteoprotegerin manifestiert sich histologisch durch TRAP (tartrate-resistant acid phosphatase)- positive Riesenzellen. Die hohe Osteoklastenresorptionsaktivität erklärt auch die Lymphknotenschwellungen.

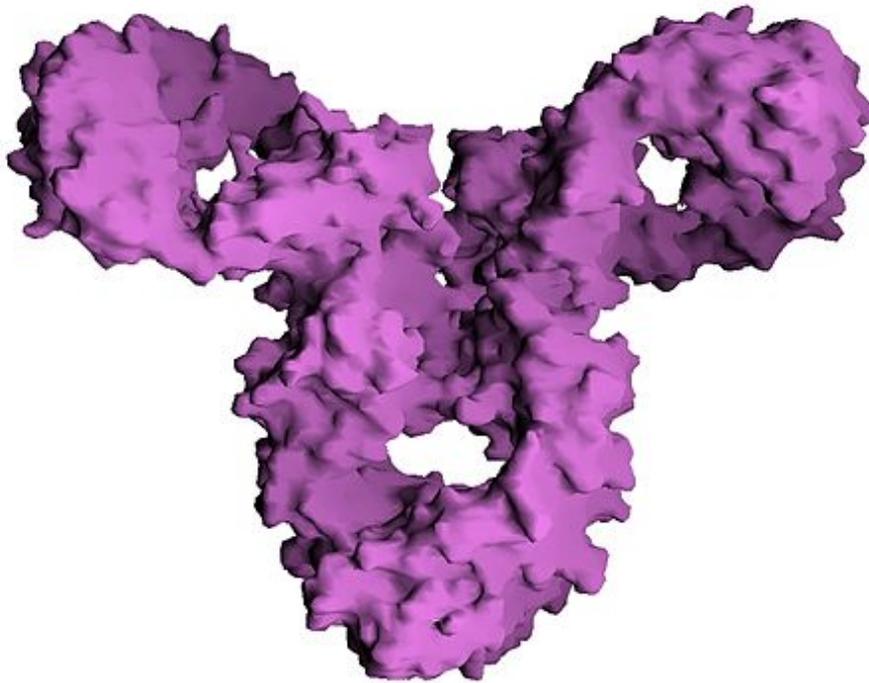
Die genetische Information für Msx-1 wird nach Ende der Molarenentwicklung abgeschaltet, was zu einer Normalisierung von Cbfa 1 und damit der Osteocalcin-Produktion führt. Während der zweiten Wachstumsperiode im Erwachsenenalter werden die Defizite in der normalen Knochenentwicklung komplett ausgeglichen.

Sind diese komplexen Interaktionen der Signalwege gestört, könnte das prinzipiell zu einem kompletten Abbruch der Zahnentwicklung führen. Die Umwandlung des Zahnkeims in das Kappenstadium während der Entwicklung wird unterbrochen, was ein generelles Defizit in der Zahnentstehung darstellt (Jernvall J, Thesleff I 2000).

Die komplette embryonale Zahnentwicklung beim Cherubismus kann somit mit der späteren Dysregulation der Msx-1-abhängigen Molarenmorphogenese und außerdem durch eine mögliche intrauterine mütterliche Substitution der fehlenden Regulationsfaktoren erklärt werden. Mit dem genetisch determinierten Ende der Molarenentwicklung im Erwachsenenalter kommt es zum definierten Ende des genetischen Programms und somit zur Remission der Erkrankung.

Auch neueste Untersuchungen (Ueki Y et al. 2007), (Miah SM et al. 2004) belegen den Einfluß des SH3BP2-Proteins auf die Entstehung der krankheitstypischen Läsionen.

Miah fand heraus, daß SH3BP2 über einen hoch affinen Rezeptor für IgE, den FcepsilonRI-Rezeptor, die Aktivierung der Mastzellausschüttung reguliert.



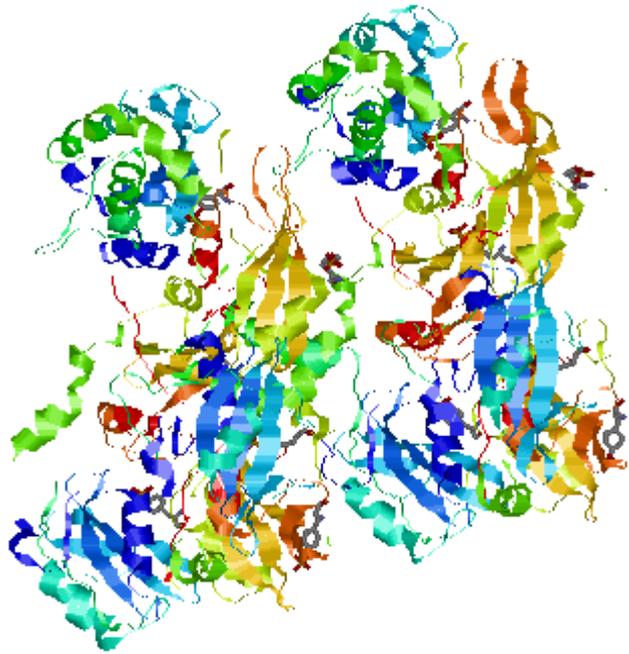
*Abbildung 9 Grafische Darstellung eines IgG-Antikörpers  
(White G)*

Die in Abbildung 9 dargestellten Proteine stehen im Dienste des Immunsystems und werden als Reaktion auf Antigene von B-Lymphozyten gebildet. Die zur Gruppe der Glykoproteine gehörenden Globuline bestehen aus zwei identischen schweren und zwei identischen leichten Ketten. Durch kombinierbare schwere und leichte Ketten entstehen unterschiedliche Antikörper.

Die multiplen, zystischen Läsionen beim Cherubismus im Kieferknochen sind mit aktivierten Osteoklasten und auch Mastzellen angereichert. Die vermehrte Ausschüttung eines veränderten SH3BP2-Proteins hemmt die Antigen-induzierte Degranulation und Aktivierung dieser Mastzellen.

In T- oder B-Zellen triggern demzufolge Rezeptoren die Tyrosinphosphorylierung von SH3BP2. Das Tyrosin selber wird durch die Protein-Tyrosin-Kinase Syk mit der Phosphorgruppe verbunden.

Ein unverändertes SH3BP2-Protein wird in Mastzellen durch die Anbindung des SH3BP2-Rezeptors schnell mit Tyrosin phosphoryliert. Diese Tyrosinphosphorylierung unterstützt z.B. die Aktivierung des Rac1-Substrates durch die SH2-Domäne am Vav1-Protein und induziert weiterhin die Bindung der SH2-Domäne an Syk, deren Aktivität steigt.



*Abbildung 10 Spleen tyrosine kinase (Syk)  
Grafische Darstellung mit RasMol (Futterer K et al. 1998)*

Die in Abbildung 10 dargestellten Proteine gehören zur Familie der Proteinkinasen, welche reversibel eine Phosphatgruppe auf die Hydroxygruppe der Aminosäure Tyrosin eines anderen Proteins übertragen (Phosphorylierung). Das Zielprotein wird dadurch beträchtlich aktiviert. Tyrosinkinasen sind somit Bestandteil von Rezeptorsystemen und leisten einen wichtigen Beitrag zur Signalübertragung.

Eine Überexpression der SH2-Domäne resultiert in einer starken Ausschüttung des IgE-Rezeptors, einer Mastzellaktivierung und Calciummobilisation und -degranulation.

Die Möglichkeit der Inhibition von SH3BP2 durch Herabsetzen der T- und B-Zellen-Aktivierung durch NFAT (nuclear factor of activated T-cells) ist aber gegeben (Hatani T, Sada K 2008).

Auch andere Proteine, wie z.B. die Serin/Threonin-Kinasen MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen, mitogen activated protein kinase), zu denen die ERK (Extrazellulär-regulierte Kinasen, extracellular signal regulated kinase) und die JNK (c-Jun N-terminale Kinasen, c-Jun N-terminal kinase) gehören, sind in Zellen mit vermehrter Ausschüttung von verändertem SH3BP2-Protein beeinträchtigt.

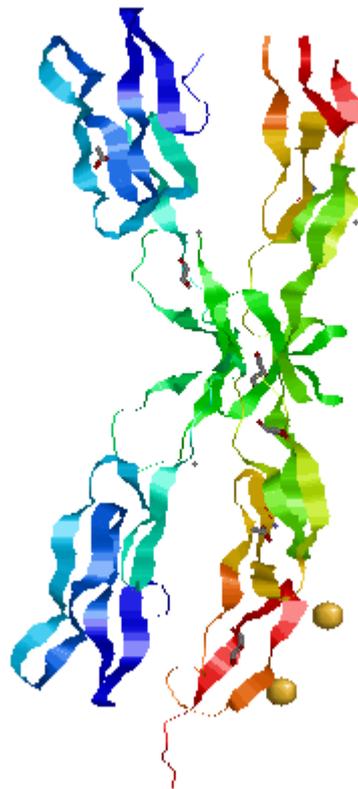
Der Inhibitor des nukleären Transkriptionsfaktors kappaB (inhibitor of nuclear factor kappaB kinase, IKK) stellt ein weiteres Protein, daß durch SHBP2 beeinflusst werden kann, dar. Der

Transkriptionsfaktor NF-kappaB (nuclear factor kappaB) ist in die Entzündungsantwort von Zellen involviert.

Die Punktmutation im Gen bedingt also die Dysfunktion des Proteins in vivo und somit Entzündungsprozesse und Veränderungen im Knochen (Miah SM et al. 2004).

Ueki stellt weiterhin fest, daß SH3BP2 die Antwort von Knochenmarkzellen auf eine Stimulation durch M-CSF und rankl bestimmt.

Das mononukleäre M-CSF (mononuclear phagocyte colony-stimulating factor), ein Koloniestimulierender Faktor der Makrophagen, wird von Mesenchymalzellen synthetisiert. Das Enzym rankl (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand) ist im Knochenmark für die Osteoklasten-Aktivität wichtig.



*Abbildung 11 Mäuseenzym rank (receptor activator of NF- $\kappa$ B)  
Grafische Darstellung der Kristallstruktur mit RasMol (Lui C et al. 2010)*

Das in Abbildung 11 gezeigte Protein wird auf der Oberfläche von Osteoklasten exprimiert. Rank, sein Ligand rankl und das weitere Regulatorprotein Osteoprotegerin spielen eine wichtige Rolle im Knochenstoffwechsel.

Die gesteigerte Antwort der durch SH3BP2 veränderten Knochenmarkszellen auf die Stimulation von M-CSF und rankl führt durch gebildete Makrophagen zu einer vermehrten Ausschüttung vom TNF-alpha (Tumornekrosefaktor-alpha) und überdimensionierten Osteoklasten. Dies geschieht durch eine steigende Phosphorylierung mithilfe der vermehrt aktivierten Serin/Threonin-Kinasen ERK 1+2 (extracellular signal regulated kinase 1 and 2, Extrazellulär-regulierte Kinase 1 und 2) und die Proteintyrosinkinase Syk (spleen tyrosine kinase). Diese Vorgänge lösen Entzündungen und Knochensubstanzverluste aus (Ueki Y et al. 2007).

Auch weitere neue Studien unterstützen die Wichtigkeit des Enzyms rankl. So wird z.B. auch die Steigerung des Calcineurin-/NFAT-Signalweges in den Vorläuferzellen der Osteoklasten durch rankl stimuliert. Eine Aktivierung der RAW 264.7 Präosteoklastenzellen findet dadurch statt, und die Expression der TRAP, ein spezifischer Marker der Osteoklastendifferenzierung, wird erhöht.

Weiterhin stimuliert rankl, potenziert durch SH3BP2, die Phosphorylierung von PLC $\gamma$ 1 und 2 in den RAW 264.7-Zellen. Nicht nur beim Cherubismus wird dadurch die schnelle Translokation von NFAT in den Nukleolus unterstützt und die Genese von TRAP-positiven Osteoklasten in RAW 264.7-Zellen erhöht. Calcineurin (eine Calcium-/Calmodulinabhängige Proteinphosphatase) und SH3BP2 aktivieren die NFAT-Phosphoproteine, welche die Translokation von NFAT in den Nukleolus durchführen. Cyclosporin A, ein Calcineurin-Inhibitor, hemmt diese Vorgänge. (Lietman SA et al. 2008).



*Abbildung 12 NFAT Komplex (nuclear factor of activated T-cells)  
Grafische Darstellung mit RasMol (Zhou P et al. 1998)*

Die in *Abbildung 12* gezeigten Transkriptionsfaktoren in T-Lymphozyten binden bei Aktivierung an einen Promoter im Zellkern und starten die Transkription von Zytokinen. Die NFAT besitzen eine spezifische DNA-Bindedomäne für die Transkription und zwei unterschiedliche Bindedomänen für die Aktivierung durch Calcineurin.

Ob auch der Befall anderer Knochen, wie Humerus, Femur und Rippen durch die beschriebenen Interaktionen erklärbar ist, können nur weitere Untersuchungen zeigen. Diese Untersuchungen zu den genauen mikrobiologischen Vorgängen müssen noch durchgeführt werden. Nur durch genaue Kenntnis dieser Abläufe ist ein weiterer pharmakologischer Therapieansatz möglich.

### **2.3 Klinische Befunde beim Cherubismus**

Zu den Hauptmerkmalen dieser autosomal dominanten Erkrankung gehören die bilateral annähernd symmetrischen und schmerzlosen Auftreibungen der submandibulären Region des Kieferknochen, Hypodontien und Dislokalisationen von Zähnen (häufig der 2. und 3. Molaren), sowie Wurzelresorptionen (Wiedemann H et al. 1989), (Burlund JG 1962), (Hoppe W et al. 1966), (Ireland AJ, Eveson JW 1988), (Opitz C, Wittstock K 1990).

Die Unterkieferwinkelregion ist bei Cherubismus stets betroffen. Initial wurde auch das Auftreten unilateraler Schwellungen beobachtet (Arnott DG 1978), (Wayman JB 1978), (Reade PC et al. 1984). Weiterhin ist bei über der Hälfte der Patienten (60,5%) eine Beteiligung des Oberkiefers festgestellt worden, wobei der Tuberbereich bevorzugt wird. Bei 20% der Patienten mit einer Oberkiefererkrankung imponierte zusätzlich ein sogenannter "Himmelsblick", der in einigen Fällen mit einem mäßigen Exophthalmus kombiniert war (Graf A 1982). Durch die massiven Vergrößerungen des Alveolarknochens kann eine umgekehrt V- förmige Einkerbung der Raphe mediana beobachtet werden. Eine isolierte Veränderung des Oberkiefers wurde bis jetzt noch nicht beschrieben.

Auch die Beteiligung anderer Knochen, wie z.B. Rippen, Humerus, Trochanter, proximale Enden von Metatarsalia und Femur ist beschrieben worden (Arnott DG 1978), (Benetti C et al. 1995), (DeTomaso DC et al. 1985), (Reade PC et al. 1984), (Wayman JB 1978).

Alle Knochenveränderungen sind von derber Konsistenz, die Haut ist stets reizlos und verschiebbar auf der knöchernen Unterlage.

Die submandibulären Lymphknoten sind häufig geschwollen (Harris M 1968), (McClendon J 1962), (Wowern N von 1972).

Zwischen dem 18. Lebensmonat und dem 7. Lebensjahr treten die ersten klinischen Symptome auf.

Das mittlere Manifestationsalter beträgt 5,4 Jahre. Dabei liegt der Wert beim männlichen Geschlecht bei 5,1 Jahren und beim weiblichen bei 5,7 Jahren (Graf A 1982).

Ein Wachstumsstillstand der knöchernen Läsionen findet erst mit dem Abschluß der Pubertät statt (Kolesov AA et al. 1973). Bis zu diesem Zeitpunkt ist der Verlauf periodisch und von Patient zu Patient sehr variabel. Die unterschiedliche Penetranz reicht von klinisch nicht erkennbaren Symptomen bis zu starken Krankheitsausprägungen mit Funktionsbeeinträchtigungen und starken Veränderungen der Gesichtsform (Ayoub AF, el-Mofty SS 1993), (Belloc JB et al. 1993), (Essafi Z, Slesinger MJ 1976), (Frenkel GS, Hauk H 1983), (Kalantar MH 1998), (Kaugars GE et al. 1992), (Timosca GC 1996). Bei all diesen Veränderungen ist zu keinem Zeitpunkt eine Abweichung der Blutwerte von der Norm erkennbar.

Diese hohe Varianz in den Verlaufs- und Ausprägungsformen macht es schwierig, eine Klassifikation der Erkrankung zu erstellen. In der Literatur sind einige Beispiele zu finden (Arnott DG 1978), (Kalantar MH 1998). Kalantar erstellte die differenzierteste Einteilung, die sich klinisch aber nicht durchsetzen konnte. Nachstehend soll diese dennoch eingehender erläutert werden.

Die Klassifikation nach Kalantar (Kalantar MH 1998) teilt den Cherubismus in 5 Grade ein, die wiederum unterschiedliche Klassen beinhalten.

Grad I der Erkrankung entsprechen Läsionen des Unterkiefers ohne Resorptionen der Wurzeln. Je nach Anzahl und Lokalisation der Läsionen werden die Grad I- Erkrankungen in die Klassen eingeteilt.

Der zweite Grad beinhaltet Veränderungen des Ober- und Unterkiefers, auch ohne Anzeichen von Wurzelresorptionen. Die einzelnen Klassen richten sich auch hier nach Ausprägung und Lokalisation der erkrankten Areale.

Grad III und IV sind inhaltlich dem ersten und zweiten Grad ähnlich - mit dem entscheidenden Unterschied, daß hier Wurzelresorptionen anzutreffen sind. Auch die Klasseneinteilung entspricht Grad I und II.

Grad V- Erkrankungen sind gleichzusetzen mit aggressiven, stark deformierenden Läsionen, die Mandibula und Maxilla, Condylen und Coronoidea betreffen können.

| Grad |   | Klasse |   |
|------|---|--------|---|
| I    | Läsionen des Unterkiefers ohne Wurzelresorptionen   | 1      | Vereinzelte Läsionen im Unterkieferkorpus                                   |
|      |   | 2      | Multiple Läsionen im Unterkieferkorpus                                      |
|      |   | 3      | Vereinzelte Läsionen in einem Ramus   |
|      |   | 4      | Multiple Läsionen der Rami  |
|      |   | 5      | Läsionen betreffen den Mandibulakorpus und die Rami                         |
| II   | Läsionen des Unterkiefers und des Oberkiefers ohne Wurzel-resorptionen  | 1      | Läsionen treten in der Mandibula und im Tuberbereich der Maxilla auf        |
|      |   | 2      | Läsionen sind in der Mandibula und in der anterioren Maxilla anzutreffen    |
|      |   | 3      | Läsionen involvieren die Mandibula und die vollständige Maxilla             |
| III  | aggressive Läsionen des Unterkiefers mit Anzeichen von Wurzel-resorptionen  | 1      | Vereinzelte Läsionen des Unterkieferkorpus                                  |
|      |   | 2      | Multiple Läsionen des Unterkieferkorpus                                     |
|      |   | 3      | Vereinzelte Läsionen in einem Ramus   |
|      |   | 4      | Multiple Läsionen der Rami  |
|      |   | 5      | Läsionen betreffen den Mandibulakorpus und die Rami                         |
| IV   | Läsionen betreffen den Unterkiefer und Oberkiefer und zeigen Anzeichen von Wurzelresorptionen   | 1      | Läsionen treten in der Mandibula und im Tuberbereich der Maxilla auf        |
|      |   | 2      | Läsionen sind in in der Mandibula und in der anterioren Maxilla anzutreffen |
|      |   | 3      | Läsionen involvieren die Mandibula und die vollständige Maxilla             |
| V    | Die seltenen Läsionen sind massiv wachsend, aggressiv und stark deformierend. Sie sind bei den Jugendlichen in der Maxilla und Mandibula anzutreffen und können Coronoidea und Condylen involvieren |        |   |

*Tabelle 1 Klassifikation nach Kalantar  
(Kalantar MH 1998)*

Auch nach Stillstand des Wachstums der Knochenläsionen sind Merkmale der Erkrankung auch noch bei Erwachsenen erkennbar. Aufgrund der Hypodontien und der bisweilen radikalen Therapiemethoden sind Atrophien der Mandibula relativ häufig. Die Patienten haben dadurch ein greisenhaftes Untergesicht und wirken optisch gealtert (Hoppe W et al. 1966). Weiterhin bleibt der Unterkiefer trotz selbständiger Rekonturierung der Kiefer verbreitert und ruft einen derben, klobigen Gesichtsausdruck hervor. Im Oberkiefer ist der Gaumen abgeflacht und transversal geweitet.

Eine Koinzidenz des Cherubismus mit anderen Erkrankungen, wie dem Mc-Cune-Albright-Syndrom, der Neurofibromatose Typ1, Burkitt-Lymphom, Noonan-Syndrom, Fragile-X-Syndrom, Ramon-Syndrom, sowie Cranio- und Pulmunalstenosen, ist ebenfalls beschrieben worden (Dunlap C et al. 1989), (Grunebaum M, Tiqva P 1973), (Hoyer PF, Neukam FW 1982), (Pirnar T et al. 1971), (Prigent F et al. 1982), (Quan F et al. 1995), (Stiller M et al. 2000).

## **2.4 Radiologische Zeichen**

Zur röntgenologischen Untersuchung kommen in erster Linie die konventionellen Röntgentechniken zum Einsatz. Diese umfassen die Panoramaschichtaufnahme, Schädelaufnahmen sowie die Nasennebenhöhlendarstellung. Zur besonders realistischen Darstellung der räumlichen Läsionen ist die Computertomographie geeignet (Bianchi SD et al. 1987). Die zugrunde liegenden geweblichen Veränderungen können durch die Magnetresonanztomographie (MRT) näher erfaßt werden. Relevante Erkenntnisse für die Therapie lassen sich durch das MRT aber nicht erzielen (Wackerle B et al. 1987). Auch die Knochenszintigraphie kann die diagnostischen Erwartungen nicht erfüllen (Hardt N 1984).

Röntgenologisch erkennt man im Unterkiefer das sogenannte „Seifenblasenbild“. Dieses ist gekennzeichnet durch multilokuläre, septierte, polyzystische und scharf umgrenzte Aufhellungen unterschiedlicher Größe mit weitgehender Verlagerung der verdünnten Kortikalis, die stellenweise fehlen kann (Bradley Tr et al. 1967), (Cornelius EA, McClendon JL 1969), (Hauenfelder H 1967). Die Fehlbildungen können bei stark ausgeprägten Symptomen auch das Kiefergelenk mit Processus coronoideus und condylaris betreffen (Ayoub AF, el-Mofty SS 1993), (Bianchi SD et al. 1987).

Im Oberkiefer erscheinen die Kieferhöhlen völlig verschattet, die Konturen der Sinus sind oft kaum zu verfolgen. Nach Ausheilung der Erkrankung werden diese meist repneumatisiert. Die vor allem in den frühen Stadien des Cherubismus auftretenden symmetrischen Prozesse im

Tuberbereich werden mittels konventioneller Röntgentechniken nicht erkannt. Daher wird vor allem für die Diagnosesicherung im Anfangsstadium die Computertomographie empfohlen. Eine Beteiligung des Ethmoids wurde nicht festgestellt (Bianchi SD et al. 1987).

Die bleibenden Stigmata im Röntgenbild sind in den Regionen der ehemaligen Läsionen eine grobkörnige Struktur mit teils sehr dichten Opazitäten (ground-glasses) (Caffey J, Williams JL 1951).

Extrafaziale Knochenherde treten in wenigen Fällen auf, wobei die langen Röhrenknochen deutlich bevorzugt werden. Die Skelettläsionen außerhalb des Kieferbereichs wiesen keine Deformationen der Knochenkortikalis auf.

## **2.5 Histologie**

Bei Untersuchungen imponiert histologisch ein stark vaskularisiertes Gewebe aus fibroblastischen Elementen, kollagenen Fasern und zahlreichen mehrkernigen Zellen, die herdförmig um Hämorrhagien und Hämosiderinablagerungen gruppiert sind. Diese Riesenzellen prägen das histologische Bild (Hauenfelder H 1967), (Ramon Y et al. 1967). Eine Phagozytose von Erythrozyten durch die Riesenzellen konnte von Hoppe beschrieben werden (Hoppe W et al. 1966).

Die Gefäße sind dünnwandig und mit großen Endothelzellen ausgekleidet. Vereinzelt umgeben die Gefäße manschettenförmig eosinophile Strukturen (Hamner J3 1969), (Hebert JM et al. 1972). Der perivaskulären Ablagerung von Kollagen kann nach Meinung einiger Autoren besondere diagnostische Relevanz zugesprochen werden (Becelli R et al. 1998). Zwischen den kleinen Gefäßen finden sich depotartige Hämosiderinablagerungen.

Die Aktivität der Erkrankung läßt sich aufgrund des histologischen Bildes erkennen, da akute Befunde mehr Riesenzellen und multiple Hämorrhagien aufweisen. Bei inaktiven Läsionen wird das Gewebe zunehmend fibröser, Riesenzellen sind nur noch vereinzelt vorhanden und neuer Knochen entsteht (Kramer IR et al. 1992).

Nach (Chomette G et al. 1988) werden die unterschiedlichen histologischen Bilder in drei Stadien eingeteilt, wodurch eine histologisch enzymatische Untersuchung möglich wurde:

Das erste Stadium (osteolytischen Stadium) ist durch eine überschießende Vaskularisation und viele mehrkernige Riesenzellen charakterisiert. Die Riesenzellen und die meisten Stromazellen des fibrösen Gewebes der Cherubismusläsionen exprimieren SH3BP2-Proteine (Ueki Y et al. 2001). Die oxidativen Enzyme und die saure Phosphatase sind hoch aktiv. Die

alkalische Phosphatase und ATP-asen sind nur in den Gefäßwänden nachweisbar. Perivaskulär sind häufig Ödeme und hämorrhagische Exsudationen zu erkennen. Weiterhin sind häufig Hämosiderinablagerungen anzutreffen.

Das nächste Stadium (verknüpfte Regeneration) ist durch eine gute Vaskularisation gekennzeichnet. Die Osteolyse ist nur noch in den peripheren Gewebsabschnitten zu finden. Es sind viele, aktive Fibroblasten vorhanden, die ultrastrukturell eine große Ähnlichkeit mit Osteoklasten aufweisen. Die Aktivität von alkalischer Phosphatase, Leucinaminopeptidase und ATP-asen ist jetzt sehr hoch.

Das dritte Stadium ist ein Stadium der Knochenregeneration. Bevor diese einsetzt, ist eine erhöhte Aktivität der ATP-asen und sauren Phosphatasen im mesenchymalen Gewebe registrierbar.

Aufgrund der nicht seltenen Vergrößerung der submandibulären Lymphknoten und deren anschließenden Exstirpation bietet sich histologisch das Bild einer chronischen unspezifischen Lymphadenitis ohne Anhalt für einen spezifischen Prozeß oder eine Metastasierung (Hauenfelder H 1967). Die Entzündung ist durch eine Kapsel- und Trabekelverdickung, diffuse Fibrosierung und retikuloendotheliale Hyperplasie gekennzeichnet. Die Lymphfollikel mit prominenten Germinalzentren bleiben erhalten (Jones W 1933), (Schindel J et al. 1974), (Wowern N von 1972).

## 2.6 Differentialdiagnosen

Differentialdiagnostische Schwierigkeiten können v.a. bei sporadischen Fällen (DeTomasi DC et al. 1985), (Benetti C et al. 1995) und im Initialstadium der Erkrankung, in dem die Kieferveränderungen mitunter nur unilateral zu beobachten sind (Arnott DG 1978), (Wayman JB 1978), (Reade PC et al. 1984) auftreten.

Es sind dabei die fibröse Dysplasie Jaffe-Lichtenstein, das Mc-Cune-Albright-Syndrom, das Noonan-Syndrom, das zentrale Riesenzellgranulom der Kiefer, der Hyperparathyreodismus sowie der im Kieferbereich sehr seltene zentrale Riesenzelltumor (zystischer Tumor) und odontogene Zysten diagnostisch auszuschließen.

Die fibröse Dysplasie tritt erst im dritten und sechsten Lebensjahr gehäuft auf. Der Unterkiefer ist, untypisch für den Cherubismus, seltener betroffen, der Befall ist unsymmetrisch und die Oberkieferläsionen sind einseitig (Khosla VM, Korobkin M 1970). Weiterhin ist auch keine Rückbildungstendenz vorhanden (Cornelius EA, McClendon JL 1969). Histologisch sind die Faserknochenbälkchen der inaktiven Cherubismusläsion im Gegensatz zur fibrösen Dysplasie kürzer und treten nur sehr diskret in der Erscheinung (Adler CP, Harle F 1974).

Das Mc-Cune-Albright-Syndrom hat verschiedene Merkmale, die nicht mit dem Cherubismus vereinbar sind. So sind z.B. die spezifischen, landkartenförmig angeordneten Café-au-lait-Flecken des Mc-Cune-Albright-Syndroms beim Cherubismus nicht vorhanden.

Desweiteren kann das Noonan- Syndrom, spezifischer das Noonan-ähnliche/ multiple Riesenzell- Syndrom, aufgrund der Krankengeschichte leicht nachgewiesen werden. Eine geringe Körpergröße, verminderte Intelligenz, Pulmonalstenosen und typische tiefansetzende Ohren sind einige der Merkmale für das Syndrom, die Cherubismus-Patienten nicht aufweisen.

Weiterhin läßt sich das zentrale Riesenzellgranulom durch seine Lokalisation (vorderer Bereich des Unterkiefers, immer unilateral) vom Cherubismus abgrenzen. Frauen sind häufiger als Männer betroffen, das Riesenzellgranulom ist nicht familiär (Katz JO, Underhill TE 1994).

Der Hyperparathyreodismus ist sehr einfach laborhistochemisch auszuschließen, da eine deutliche Hyperkalzämie, Hyperkalzurie, Hypophosphatämie sowie eine Erhöhung des alkalischen Phosphatase- und des Parathormonwertes beim Cherubismus nicht vorliegt.

Desweiteren tritt der Hyperparathyreodismus erst ab dem 30. Lebensjahr auf, weshalb eine routinemäßige Blutuntersuchung nicht notwendig ist (Becelli R et al. 1998). Auch die typischerweise beim Hyperparathyreodismus fehlende Lamina dura der Zahnfächer tritt beim Cherubismus nicht auf.

Ein odontogenes Geschehen (zystischer Tumor oder odontogene Zysten), von Jones wegen der Lokalisation im Ober- und Unterkiefer zuerst angenommen (Jones W 1933), läßt sich aufgrund der histologisch fehlenden epithelialen Anteile nicht bestätigen (Sitzmann F 1973).

Ist eine schnelle, eindeutige Diagnostik nicht möglich, ist die enge Zusammenarbeit zwischen dem Kliniker, Pathologen und Genetiker zwingend erforderlich.

Die zweifelsfreie Diagnostik ist erst durch die Lokalisation des Cherubismus-Gens auf dem Chromosom 4p16 (Tiziani V et al. 1999), (Mangion J et al. 1999), (Mangion J et al. 2000) und die Identifikation des Gens (Ueki Y et al. 2001) möglich.

Zusammenfassend wird das Krankheitsbild Cherubismus heute von der Mehrzahl der Autoren als eine Krankheitseinheit betrachtet. Die Diagnose sollte daher bei Vorliegen folgender Symptomenkonstellation ohne weiteres möglich sein:

1. röntgenologisch bilaterale multizystische Aufhellungen in der Unterkieferwinkelregion.
2. im Biopsiematerial fibröses Gewebe und Riesenzellen (Histologie)
3. positive Familienanamnese
4. Manifestationsalter im ersten Lebensjahrzehnt
5. keine Auffälligkeiten im Blutbild (Foissin B, Ohanian D 1965)
6. Nachweis einer Mutation im SH3BP2-Gen

## **2.7 Therapie**

Die Prognose des Cherubismus ist günstig. Eine primär maligne Entartung ohne therapeutischen Eingriff ist nicht zu befürchten. Die Ausweitung der Läsionen kommt in der Pubertät zum Stillstand, anschließend beginnen sich langsam neue Knochenstrukturen auszudifferenzieren, und die Deformitäten bilden sich allmählich zurück. Spätfolgen sind in den stark atrophischen Alveolarfortsätzen zu sehen, die für eine prothetische Versorgung ungünstige Voraussetzungen darstellen.

Trotzdem gab es seit der Erstbeschreibung durch Jones viele verschiedene Behandlungskonzepte.

Die bisher bekannte Pathogenese hat noch zu keinem kausalen Therapieansatz geführt. Daher ist die chirurgische Intervention die Therapie erster Wahl. Sie sollte bei einer Erkrankung mit regressiver Tendenz nur zurückhaltend eingesetzt werden, denn eine vollständige Remission ohne Therapie ist schon beschrieben worden. Sie gilt aber dennoch als Ausnahme (Hamner J3, Ketcham AS 1969), (Katz JO et al. 1992), (Regezi JA et al. 1987), (Timosca GC 1996). Eine Intervention ist daher in der Mehrzahl der Fälle durch die erheblichen Gesichtsdeformitäten indiziert. Nach Beendigung des Wachstums der Läsionen kann demnach ein modellierender chirurgischer Eingriff vorgenommen werden, um psychischen Problemen der Patienten vorzubeugen. Dabei sollte nur so viel Knochengewebe abgetragen werden, wie für die Wiederherstellung einer ausreichenden Funktion notwendig ist.

Nach Grau sollte die chirurgische Intervention solange wie möglich hinausgezögert werden (Grau H et al. 1986), da Operationen in einer floriden Phase des Cherubismus zu einem schweren Rückschlag und zu hohen Rezidivquoten mit aggressiveren Läsionen führen kann.

Im Gegenteil dazu konnten andere Autoren in Studien feststellen, daß eine vorsichtige Kürettage während des rapiden Wachstums der Läsionen nicht nur gute, sofortige Resultate zeigt, sondern auch die aktive Phase der Erkrankung unterbricht und sogar gleichzeitig das Knochenwachstum stimuliert (Dukart RC et al. 1974), (Meng XM et al. 2005). Dies geschieht vermutlich aufgrund des hohen Wachstumspotentials und der unvollständigen Entfernung des pathologischen Gewebes. Weitere Untersuchungen sind dazu notwendig.

In Einzelfällen, bei Behinderungen von Atem-, Sprech- und Kaufunktionen und gravierenden ästhetischen Entstellungen, wird sogar eine chirurgische Intervention im Kindesalter notwendig (Battaglia A et al. 2000). Bei der Geschwulstreduktion durch z.B. modellierende Osteotomien und Kürettagen sollte auf den Erhalt der Zahnkeime und die Schonung des Nervus alveolaris inferior geachtet werden, da eine radikale Operationsmethode erhebliche Wachstumsstörungen der Kiefer und unnötigen Zahnverlust verursachen kann (Hamner J3, Ketcham AS 1969).

Weitere Operationstechniken sind die autogene Knochentransplantation zur Defektauffüllung (Davis GB et al. 1983), (Fleuchaus PT, Buhner WA 1967) und die Liposuction (Dubin B, Jackson IT 1990). Knochentransplantate sollten bei Patienten mit extremen Läsionen und der Gefahr einer pathologischen Fraktur der Mandibula nach segmentaler Entfernung der Mandibula durch Knochen der Fibula erfolgen.

Auch die postoperative Radiatio wurde zur Therapie eingesetzt (Harris M 1968). Sie ist aber wirkungslos und auch aufgrund der Nebenwirkungen auf den wachsenden Schädel abzulehnen.

Inadäquate Therapieversuche (mehrmaliges „Anoperieren“ der Läsionen, Strahlentherapie) führten zu histologischen Befunden, die zu malignen Veränderungen tendieren. Eine Sarkominduktion durch die Radiotherapie beim Cherubismus ist beschrieben worden (Peters WJ 1979).

Weitere Ansätze zur Therapie sind die Iontophorese, die hormonelle Therapie (Interferon alpha), sowie die systemische Gabe von Calcitonin (Get'man II 1973), (Hart W et al. 2000), (Lange J de et al. 1999), (Southgate J et al. 1998), (Timosca GC et al. 2000). In vitro-Versuche mit Calcitonin waren bei der Hemmung der Knochenresorption erfolgreich, weitere Untersuchungen sind hierzu notwendig. Durch die genaue Kenntnis der mikrobiologischen Vorgänge beim Cherubismus sind auch weitere pharmakologische Therapieansätze denkbar (siehe Abschnitt 2.2 Genetik und molekulare Grundlagen).

## **3 Patienten und Methodik**

### **3.1 Ablauf der Untersuchung**

Für diese Arbeit stand Untersuchungsmaterial aus 6 Ländern zur Verfügung. Im Vorfeld der Untersuchung wurden auch deutschlandweit Universitäten angeschrieben, um DNA- Proben zu akquirieren.

Gleichzeitig konnte die genetische Analyse aller Exons des Gens (bis auf das nicht translatierte Exon 1) durch Auswahl geeigneter Primer und Aufbau der entsprechenden PCR- und Sequenziermethoden standardisiert werden. Die Auswahl der Primer erfolgte mittels des Softwareprogramms „Primer 3“, bezogen wurden sie von der Firma Tib Molbiol aus Berlin.

Es wurden daraufhin bei insgesamt 17 Familien mit 68 Patienten klinische und genetische Untersuchungen durchgeführt.

Die behandelnden Mediziner erhoben den klinischen Befund und stellten ihn zur Verfügung. Die genetische Analyse erfolgte im Institut für Medizinische Genetik.

Die DNA wurde teilweise von den behandelnden Kliniken präpariert, zum größten Teil aber aus Vollblut im Institut für Medizinische Genetik gewonnen. Bei der anschließenden optimierten Polymerasekettenreaktion wurde mit den ausgewählten Primern die DNA amplifiziert und anschließend sequenziert. Die Ergebnisse wurden ausgewertet und mit den klinischen Befunden verglichen. Ein Zusammenhang zwischen der klinischen Symptomatik und der genetischen Mutation konnte untersucht werden.

### **3.2 Klinische Untersuchungsparameter der Patienten**

Stellvertretend von den untersuchten 68 Patienten wurden 8 Patienten für die genetische und klinische Untersuchung näher beschrieben.

Es soll eine Korrelation zwischen den gefundenen Mutationen und der klinischen Situation aufgezeigt werden. Dazu wurden wesentliche Krankheitsmerkmale des Cherubismus auf ihren Ausprägungsgrad hin untersucht und mit den dazugehörigen krankheitsspezifischen Mutationen verglichen.

Diese Merkmale sind die bilateralen Auftreibungen der submandibulären Region des Kieferknochens, Befall des Oberkiefers und Stärke des sogenannten „Himmelblickes“ und Hypodontien bzw. Dislokationen/ Anomalien von Zähnen.

Bei der klinischen Untersuchung wurde darauf geachtet, möglichst genau die krankhaften Veränderungen beim Patienten zu erfassen.

### 3.3 Labormethoden

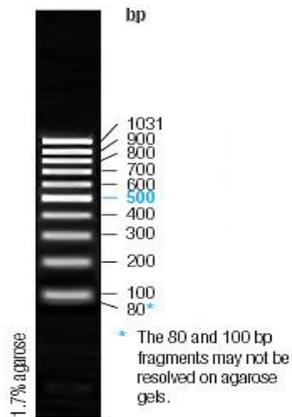
Zunächst eine Übersicht über die verwendeten Materialien (siehe unten).

*Tabelle 2 Verzeichnis der verwendeten Reagenzien*

| Produkt                   | Hersteller           |
|---------------------------|----------------------|
| Agarose                   | Invitrogen, UK       |
| Aqua ad injectabilia      | Braun, Melsungen     |
| Ethidiumbromid (10 mg/ml) | Boehringer, Mannheim |
| HPLC- Wasser              | J. T. Baker, Holland |

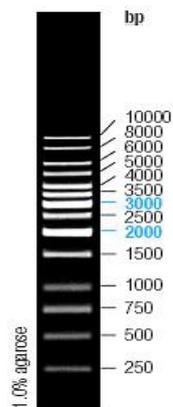
#### *DNA Größenstandard*

GeneRuler™ 100bp DNA Ladder



*Abbildung 13 100bp PCR- Marker für die Gelelektrophorese*

GeneRuler™ 1kb DNA Ladder



*Abbildung 14 1kbp PCR- Marker für die Gelelektrophorese*

MBI Fermentas, Kanada

*Enzyme*

| <b>Produkt</b>   | <b>Hersteller</b>           |
|--|-----------------------------|
| Ampli Taq DNA- Polymerase (5 U/μl)   | Roche Diagnostics, Mannheim |
| Exonuklease I ( 10 U/μl)   | NEB, Neuseeland             |
| SAP (Shrimp Alkaline Phosphatase, 1 U/μl)  | Roche Diagnostics, Mannheim |
| EcoR1 (Restriktionsendonuklease)   | NEB, Neuseeland             |
| <i>Nukleotide</i>  |                             |
| Desoxyribonukleotide (dNTPs, 10mM)   | Abgene, USA                 |
| Oligonukleotide (Primer, 1:10 Verdünnung)  | TIB MolBiol, Berlin         |
| <i>Puffer</i>  |                             |
| BigDye Puffer  | Applied Biosystems, USA     |
| Loading Dye Solution   | MBI Fermentas, Kanada       |
| NE Buffer EcoR 1   | NEB, Neuseeland             |
| PCR Buffer (15mM MgCl <sub>2</sub> )   | Roche Diagnostics, Mannheim |
| 10x TAE-Puffer, pH 7,7 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 0,4 M Tris</li> <li>▪ 10 mM EDTA</li> <li>▪ Essigsäure (pH 7,7)</li> </ul> | Merck, Darmstadt            |
| 10x TE-Puffer, pH 8,5 <ul style="list-style-type: none"> <li>▪ 10 mM EDTA</li> <li>▪ 0,4 M Tris</li> </ul>                                 | Merck, Darmstadt            |

*Tabelle 3 Verzeichnis der verwendeten Kit-Systeme*

| <b>Produkt</b>                               | <b>Hersteller</b>       |
|--|-------------------------|
| Big Dye Terminator Cycle Sequencing Reaction | Applied Biosystems, USA |
| Taq PCR Core Kit                             | Quiagen GmbH, Hilden    |
| QIAquick Gel Extraction Kit                  | Quiagen GmbH, Hilden    |

*Tabelle 4 Verzeichnis der verwendeten Geräte und Verbrauchsmaterialien*

| <b>Produkt</b>                     | <b>Hersteller</b>       |
|------------------------------------|-------------------------|
| DNA-Sequenzierer 3730 DNA Analyzer | Applied Biosystems, USA |
| Eismaschine                        | Ziegler, Deutschland    |

| <b>Produkt</b>                    | <b>Hersteller</b>          |
|-----------------------------------|----------------------------|
| Elektrophoresekammern             | Hybaid GmbH, Heidelberg    |
| Gelschlitten und Kämmen           | peQiab GmbH, Erlangen      |
| Kühlblöcke                        | Diverse                    |
| Abdeckmatten                      | Diverse                    |
| Pipettenspitzen                   | Diverse                    |
| Schüttler für Rörchen             |                            |
| Sicherheitswerkbank Klasse II     |                            |
| Spannungsgeber                    | Consort, Belgien           |
| UV-Transilluminator Eagle Eye II  | Stratagene, USA            |
| Vortex-Genie 2                    | Scientific Industries, USA |
| <i>PCR- und Sequenzierplatten</i> |                            |
| 96-Well Platten                   | G. Kisker GbR, Steinfurt   |
| Optical 96-Well Reaction Plate    | Applied Biosystems, USA    |
| <i>Pipetten</i>                   |                            |
| Eppendorf-Pipetten                | Eppendorf, Hamburg         |
| Pasteur-Pipetten, steril          | Sarstedt, Deutschland      |
| <i>Thermocycler</i>               |                            |
| GenAmp* PCR System 9700           | Applied Biosystems, USA    |
| Mastercycler gradient             | Eppendorf, Hamburg         |
| <i>Zentrifugen</i>                |                            |
| Biofuge fresca                    | Heraeus, Osterode          |
| Megafuge 1.0                      | Heraeus, Osterode          |
| Mini Centrifuge C-1202            | Labnet, Woodbridge         |

*Tabelle 5 Verzeichnis der genutzten Anwendungen zur Genomanalyse*

| <b>Anwendung</b>                | <b>Funktion</b>      | <b>Hersteller</b>                           |
|---------------------------------|----------------------|---|
| Primer 3                        | Primergenerierung    | Whitehead Institute for Biomedical Research |
| Eagle Sight Version 3.1         | Gelbilddokumentation | Statagene                                   |
| Sequencing Analysis Version 5.1 | Sequenzauswertung    | Applied Biosystems, USA                     |
| SeqMan II Version 5.0           | Sequenzauswertung    | DNA Star Inc.                               |

*Tabelle 6 Verzeichnis der verwendeten Internetressourcen*

| <b>Link</b> | <b>Internetadresse</b>  |
|-------------|---|
| NCBI        | <a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov">http://www.ncbi.nlm.nih.gov</a> |

### **3.3.1 Präparation von genomischer DNA aus Vollblut**

Die DNA-Sequenzierung ist ein wichtiger Baustein in der Molekulargenetik. Bevor die DNA aber untersucht werden kann, muß sie zunächst einmal isoliert und aufgereinigt werden.

Dies konnte im Institut für Medizinische Genetik mithilfe des Biorobot M48 und des MagAttract-DNA-Blood-Mini M48-Kits™ von Qiagen durchgeführt werden. Für die Analyse wird mit EDTA-Vollblut, in Ausnahmefällen auch heparinisieretes Blut, verwendet.

Von diesem vorbehandelten Blut werden 200 µl mit einer chaotropen Reagenz, dem Lysispuffer (200 µl), behandelt, wodurch sich die Zellwände auflösen und die DNA freigesetzt wird.

Der Lysepuffer besteht aus Tris-HCl (1 M; pH 7,4; 2,5 ml), EDTA (0,5 M; pH 8,1; 10 ml), NaCl (5 M, 1 ml), SDS (10%, 5 ml), aqua dest. (31,5 ml).

Nach der Freisetzung der DNA findet das Befüllen der Biorobotcontainer mit der Lösung statt. Im Gerät bindet die DNA an die silizierte Oberfläche der paramagnetische Perlen, womit eine Trennung des genetischen Materials von dem Puffer ermöglicht wird. Die DNA wird somit einer Reinigung zugänglich gemacht.

Zunächst wird das genetische Material mit dem Waschpuffer I (500µl) gereinigt. Anschließend findet eine Ethanol-fällung mit 96-100% Ethanol (200µl) statt. Damit stoppt die Lyse und die DNA wird präzipitiert. Anschließend kommt es noch zu einer letzten Reinigung mit dem Waschpuffer II (500µl).

Durch das Entlangführen der DNA an einer Magnetwand mithilfe der Perlen kommt es zu einer hochgradigen Reinigung der DNA auf eine Konzentration von 30 ng/µl. Die Perlen werden mithilfe eines Magneten entfernt.

Die gewonnene DNA kann bis zur Weiterverarbeitung einige Tage im Kühlschrank bei 4°C oder über mehrere Wochen bei -20°C im Gefrierschrank aufbewahrt werden.

Für einen Teil der Proben erfolgte die Gewinnung der genomischen DNA aus Zitrat-Vollblut nach der Mainzer-Methode mit folgenden Reagenzien:

- 50 mM KCl
- Lysepuffer
  - 10 mM Tris
  - 400 mM NaCl
  - 2 mM Na<sub>2</sub>EDTA
  - Auf pH 8,2 einstellen und autoklavieren
- 10 % SDS
- Proteinase K (20 mg/1 ml Lysepuffer)
- Phenol (äquilibrieren mit Tris-HCL, pH 0,2)
- Chloroform

Von der Blutprobe werden 10ml Zitratblut bei 37°C aufgetaut und mit 40ml KCl (50mM) versetzt und vorsichtig vermischt. Dieses Gemisch wird bei 4°C und 3000 Umdrehungen pro Minute 10 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das Lymphozyten-Pellet bei Raumtemperatur mit 3ml Lysepuffer, 200µl SDS (10%) und 50µl Proteinase K resuspendiert. Die Behandlung mit Proteinase K erfolgt für 2-3 Stunden bei 55°C. Die Probe wird anschließend in ein neues Eppendorf-Gefäß pipettiert und mit je 1,75ml Phenol und Chloroform versetzt. Das Gemisch wird 5 Minuten vorsichtig per Hand geschwenkt und 10 Minuten bei Raumtemperatur mit 5000 Umdrehungen pro Minute zentrifugiert.

Die Oberphase enthält die DNA, welche vorsichtig abpipettiert und in ein neues Gefäß überführt wird. Die Probe wird nochmals mit 3,5ml Chloroform vermischt und anschließend 5 Minuten per Hand und 10 Minuten mit der Zentrifuge bei Raumtemperatur und 5000 Umdrehungen gemischt. Die Oberphase wird wiederum in ein neues Gefäß pipettiert. Dabei muß eine ausgeprägte Interphase vorhanden sein, ansonsten muß eine weitere Fällung mit 3,5ml Chloroform durchgeführt werden. Nach Zugabe von 7ml Ethanol (100%) wird die

DNA mit einem Glasstab aufgewickelt und mit 70%igem Ethanol gespült. Die DNA wird anschließend luftgetrocknet und in 1xTE-Puffer gelöst.

Ein Aliquot dieser Lösung wird zur Konzentrationsbestimmung bei 225nm im UV-Spektralphotometer durchgeführt. Die isolierte DNA wird bei -20°C gelagert.

### 3.3.2 Generierung der Oligonukleotide

Die Oligonukleotide, auch Primer genannt, sind kurze, chemisch synthetisierbare Nukleinsäurefragmente, die spezifisch an definierte DNA-Sequenzen binden.

Bei der Anwendung der Polymerase-Kettenreaktion zur selektiven Vermehrung von DNA-Abschnitten werden Primerpaare benötigt, welche die gesuchte Sequenz flankieren. Sie liegen zwischen 20-50bp vor der zu sequenzierenden Region. Der Intronbereich vor und hinter dem zu amplifizierenden Exon muss für die Generierung der Primerpaare daher bekannt sein. Informationen dazu sind den gängigen Datenbanken (z.B. NCBI) entnehmbar.

Es wird zwischen dem sogenannten Forward- und Reverse-Primer unterschieden. Der erstgenannte Primer liest den DNA-Strang in 5'→3'- und der Reverse-Primer in 3'→5'-Richtung.

Bei der Auswahl der Primer ist darauf zu achten, daß beide Primer eine ungefähr gleiche Anlagerungstemperatur aufweisen.

Die „Annealing“-Temperatur eines solchen Primers wird anhand folgender Formel abgeschätzt:

$$T [^{\circ}C] = n_{GC} \times 4 + n_{AT} \times 2 - 5$$

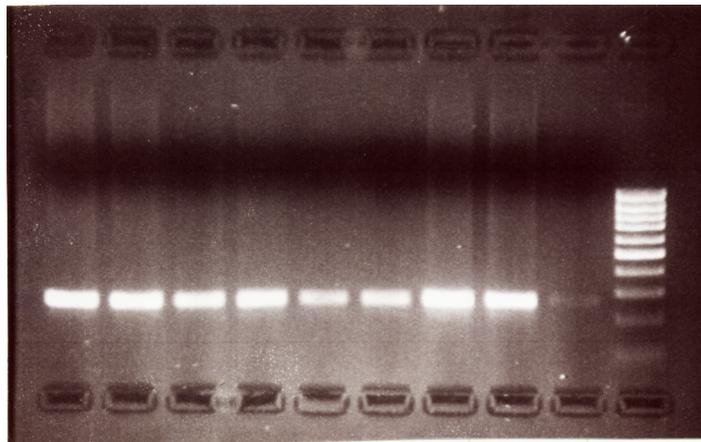
Wobei  $n_{GC}$  Anzahl der Basen G/C und  $n_{AT}$  Anzahl der Basen A/T in der Sequenz des Primers ist.

Diese Temperatur wird anschließend experimentell bestätigt bzw. korrigiert. Dazu wird die Polymerase- Kettenreaktion versuchsweise bei verschiedenen Temperaturen durchgeführt. Das Ergebnis wird anschließend durch eine Gelelektrophorese überprüft. Ist ein Produkt mittels Elektrophorese sauber nachweisbar, kann der Primer bei der entsprechenden Temperatur eingesetzt werden.

Ein weiteres Kriterium für die Primerauswahl wird durch den GC-Gehalt bestimmt. Dieser sollte zwischen 40-60% liegen. Auch sollten die Primer keine Sequenzanteile enthalten, die

eine Haarnadelschleifenbildung oder Primerdimerisierung hervorrufen könnten. Im Idealfall sollten sie eine Länge von 18-25 Nukleotiden besitzen.

Unter Berücksichtigung der oben genannten Punkte erfolgte die Primerauswahl mit dem „Primer3“-Programm des Whitehead Institute for Biomedical Research. Diese vorgefertigten Komponenten der Reaktion wurden von der Firma TIB MOLBIOL® in Berlin synthetisiert.



*Abbildung 15 Gelelektrophorese nach eigener Durchführung  
Eine Synthese des untersuchten Exons 8.1 mit unterschiedlicher Patienten-DNA (Patienten 1-8) bei bekanntem Temperatur-optimum des Primers. Die vorletzte Bande stellt eine PCR ohne DNA zur Überprüfung einer Primerdimerisierung dar. Die rechte Bande gibt zur Größenorientierung des amplifizierten Produkts unterschiedliche, definierte Fragmentgrößen in einer DNA-Leiter an. Hier synthetisiertes Produkt ist dementsprechend fast 300bp groß.*

In folgender Tabelle sind die ausgewählten Primer und die Größe der untersuchten Exone aufgelistet. In Exon 8 und 13 wurden sie überlappend eingesetzt. Eine mögliche Bindung der Primer an weitere, für die Untersuchung nicht relevante, DNA-Sequenzen konnte durch „BLAST-search“ ausgeschlossen werden.

*Tabelle 7 Übersicht der untersuchten Exone und zugehöriger Primer*

| <b>Exon</b> | <b>Exon-<br/>größe</b> | <b>Hinprimer</b>                 | <b>Rückprimer</b>                |
|-------------|------------------------|----------------------------------|----------------------------------|
| Exon 1      |                        |                                  |                                  |
| Exon 2      | 140bp                  | 5'-aca/tct/cct/gcc/tga/ccg/ta-3' | 5'-aag/cat/cct/ctc/caa/gcc/tc-3' |
| Exon 3      | 103bp                  | 5'-gtc/ctc/aca/gtg/ggt/ctt/gg-3' | 5'-ctt/att/ccc/gcc/caa/gga-3'    |
| Exon 4      | 118bp                  | 5'-ggc/cat/ccc/tat/agg/tgt/ga-3' | 5'-caa/aga/gaa/ggt/gtg/gct/gg-3' |
| Exon 5      | 71bp                   | 5'-ttg/gga/gtc/aca/gca/gag/c-3'  | 5'-taa/agg/ttt/cct/gga/ggt/gc-3' |
| Exon 6      | 89bp                   | 5'-cgt/gtg/cct/gtg/tgt/acc/tt-3' | 5'-ctt/tgg/cag/tgc/gca/gta/g-3'  |
| Exon 7      | 69bp                   | 5'-ctt/gcc/tcc/tgg/act/cag/c-3'  | 5'-ctt/ccg/ctt/ccc/tgc/tgt-3'    |
| Exon 8.1    | 655bp                  | 5'-acc/act/gcc/agg/aga/gga/ta-3' | 5'-tct/gag/cac/cat/gcc/cac-3'    |
| Exon 8.2    |                        | 5'-gcc/cac/tcc/ttt/acc/tcc/a-3'  | 5'-gat/agg/tga/aga/gga/ccc/cc-3' |
| Exon 8.3    |                        | 5'-cct/tgc/ttc/cgg/gag/agt-3'    | 5'-acg/acg/ggg/tac/cag/gtg-3'    |
| Exon 9      | 110bp                  | 5'-tac/ccg/gat/ctc/tgt/tgt/cc-3' | 5'-cca/gta/ggt/gga/cag/gtg/gt-3' |
| Exon 10     | 56bp                   | 5'-ggg/aca/cag/cac/cat/gta/aa-3' | 5'-gca/gaa/acc/aga/gga/gtg/ga-3' |
| Exon 11     | 82bp                   | 5'-tgc/tca/gct/cct/gag/acc/ta-3' | 5'-taa/acc/act/ccc/ctt/gtg/ga-3' |
| Exon 12     | 60bp                   | 5'-gac/cca/gcc/ttg/atg/gtt/ct-3' | 5'-aga/ctg/gca/cct/cca/gga/ta-3' |
| Exon 13.1   | 593bp                  | 5'-tgc/tgc/tgc/ctt/gtt/tta/ca-3' | 5'-gta/gga/ccc/agg/cag/tct/ca-3' |
| Exon 13.2   |                        | 5'-tag/gtg/atg/gca/gtc/cat/gt-3' | 5'-agg/aac/gct/aag/aca/cag/gc-3' |
| Exon 13.3   |                        | 5'-tgt/tgc/ccc/aca/cta/act/tg-3' | 5'-gag/tga/ctt/ccc/cag/ggt/g-3'  |

### 3.3.3 Polymerase- Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion (polymerase chain reaction, PCR) ist eine standardisierte, zyklische Methode, die zur enzymatischen Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente in vitro dient.

Dieses Fragment kann ein Gen, Teile einer Gensequenz oder nicht kodierende DNA-Abschnitte enthalten. Bis zu mehreren tausend Basenpaaren können bei dieser Reaktion kopiert werden.

Den ersten theoretischen Gedanken, DNA- Sequenzen durch zwei flankierende, komplementäre Primer zu vervielfältigen, hatte Har Gobind Khorana Anfang der 70er Jahre (Kleppe K et al. 1971). Dieser Gedanke wurde aber nicht weitergeführt.

Erst durch Kary Banks Mullis wurde 1983 das Verfahren der Polymerase- Kettenreaktion in die Praxis umgesetzt. Er wurde für diese Idee bereits 1993 mit dem Nobelpreis für Chemie geehrt.

Mullis wollte die DNA durch wiederholtes Kopieren exponentiell in mehreren Zyklen unter Mithilfe eines Enzyms im Labor vervielfältigen. Dieses Enzym, die DNA-Polymerase, kommt in allen Zellen vor und verdoppelt den DNA- Strang vor der Zellteilung. Sie bindet dafür an den denaturierten Strang und erzeugt eine dazu komplementäre DNA- Sequenz.

Mullis verwendete bereits in den ersten PCR- Versuchen dieses Enzym in vitro. Die genutzte Polymerase war aber nicht hitzestabil, sondern wurde durch die Denaturierung der DNA bei 96°C zerstört. Somit mußte nach jedem Erhitzen die Polymerase neu hinzugegeben werden. Das machte das ursprüngliche Verfahren sehr zeit- und kostenaufwendig. Auch konnte der Versuch nicht automatisiert ablaufen, da ständige Aufmerksamkeit erforderlich war.

Erst durch die Verwendung einer DNA-Polymerase aus thermophilen Bakterien konnte der PCR-Prozess verbessert werden. Da das Enzym aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* stammt, wird es Taq-Polymerase genannt. Diese Polymerase ist thermostabil und kann durch das Erhitzen nicht mehr zerstört werden, ihr Aktivitätsoptimum liegt bei 72°C. Somit wurde der PCR-Vorgang erheblich vereinfacht und konnte nun auch automatisiert ablaufen.

Die Taq- Polymerase hat auch heute noch ein breites Anwendungsgebiet. Ihr Nachteil ist, daß sie Fehler beim Kopiervorgang produzieren kann, was zu Mutationen in der Sequenz führt. Dies wird durch neuere „proof reading“-Polymerasen, wie Pwo und Pfu, die aus Archaea

gewonnen werden, umgangen. Diese Polymerasen haben einen Korrekturmechanismus, der die Anzahl der Mutationen in der kopierten DNA erheblich senkt.

Der Reaktionsansatz für eine Polymerase-Kettenreaktion besteht aus folgenden Komponenten:

- die Original-DNA mit der zu vervielfältigenden Sequenz
- zwei Primer (Oligonukleotide), die den Startpunkt für die PCR auf beiden komplementären DNA-Strängen angeben. Die Primer sind chemisch synthetisierte Oligonukleotide. Anhand der bekannten DNA-Sequenz werden diese, bis zu 25bp langen, Oligonukleotide ausgewählt. Sie liegen zwischen 20-50bp vor der zu sequenzierenden Region. Ihre Sequenz ist jeweils zu einem DNA-Strang in einem flankierenden Fragmentbereich komplementär. Die Primer sind weiterhin so gestaltet, daß eine Haarnadelschleifenbildung oder Primerdimerisierung ausgeschlossen ist. Ihre Anlagerungstemperatur ist etwa gleich hoch.
- das Enzym, die DNA-Polymerase
- ein Nukleotidgemisch, die dNTP's Adenin, Thymin, Guanin und Cytosin
- Pufferlösungen als chemische Voraussetzung für den Einsatz der Polymerase.

Nach Herstellung des Reaktionsansatzes findet die PCR im sogenannten Thermocycler statt. Dieses Gerät stellt die reaktionsspezifischen Temperaturen für die DNA-Polymerase ein.

Zu Anfang jeder PCR-Reaktion wird das Reaktionsgemisch bei 95°C über 10 Minuten lang erhitzt, um eine Aktivierung der Taq-Polymerase zu erreichen.

Der PCR-Prozess besteht aus 30 bis 50 Zyklen. Jeder Zyklus besteht aus drei Reaktionsschritten.

#### 1. Denaturierung

Zunächst wird die doppelsträngige DNA bei 94°C eine Minute erhitzt, um eine Denaturierung der DNA durch Aufbrechen der Wasserstoffbrückenbindungen zu erreichen. Die doppelsträngige DNA-Helix liegt in zwei Einzelsträngen vor. Die Polymerase weist bei der verwendeten Denaturierungstemperatur von 94 °C eine Halbwertszeit von ungefähr einer Stunde auf.

## 2. Annealing

Nach der Auftrennung der DNA- Stränge wird die Temperatur abgesenkt, damit sich die Primer an die DNA-Matrize anlagern können. Dieses Annealing (die Primerhybridisierung) findet bei einer primerspezifischen Temperatur (zwischen 50-60°C) eine Minute lang statt. Die Temperatur ist abhängig von der Sequenz des Primers und der Schmelztemperatur des zu erwartenden DNA-Doppelstranges.

## 3. DNA-Synthese

Abschließend ist eine Verlängerung/ Elongation der angelagerten Primer mithilfe der Desoxyribonukleotide (dNTPs) und der thermostabilen DNA- Polymerase vom 3'-Hydroxyl-Ende des Primers aus möglich. Somit entsteht abhängig von der einsträngigen DNA- Matrize ein zweiter, komplementärer DNA- Strang in 5' → 3' - Orientierung.

Eine Ablösung des Primers erfolgt nicht, da er den Anfang des Einzelstranges bildet. Dieser Schritt wird bei 72°C (abhängig von der Polymerase) über eine Minute lang (abhängig von der Länge des DNA- Fragmentes) durchgeführt.

Ein Zyklus aus Denaturierung, Anlagerung der Primer („Annealing“) und DNA-Synthese wird dabei mehrfach (ca. 30 bis 35 mal) wiederholt, wodurch das Zielfragment exponentiell angereichert wird.

Auf diese Weise können DNA-Fragmente mit einer Länge von 50 bp bis zu mehreren hundert Basenpaaren zuverlässig amplifiziert werden.

Zum Abschluß findet eine Abkühlung auf 4°C statt. In diesem Zustand kann das Reaktionsprodukt aufbewahrt oder weiter verwendet werden.

Das PCR- Produkt kann durch die Agarose- Gelelektrophorese anhand seiner Größe identifiziert werden. Bei diesem Verfahren wird die gewonnene DNA in ein Agarose- Gel eingebracht und anschließend eine Spannung angelegt. Die kürzeren DNA- Stränge bewegen sich daraufhin schneller auf den Pluspol zu als die längeren. Die Länge der reproduzierten DNA- Stränge kann durch einen Vergleich mit einer DNA- Leiter, die DNA- Fragmente bekannter Größe enthält, bestimmt werden.

### 3.3.4 Standardansatz für die PCR

Die Polymerasekettenreaktion wurde für diese Arbeit im Institut für Medizinische Genetik durchgeführt.

Zuerst wurde die zu untersuchende humane genomische DNA aus Blutproben, wie zuvor beschrieben, extrahiert. Die anschließende PCR hat einen Standardansatz, der aus 7 Komponenten besteht. Diese ergeben zusammen ein Reaktionsgemisch von 40µl.

Ein typischer Standardansatz (40µl) für die PCR sieht wie folgt aus:

1. destilliertes Wasser: 28µl
2. Probanden-DNA (30ng/µl): 4µl
3. AmpliTaq-Reaktionspuffer: 5µl (enthält 15mM MgCl<sub>2</sub>)
4. Primer (10pmol/µl) : jeweils 1µl für die komplementären DNA-Stränge
5. Gold-Taq-DNA-Polymerase (5U/µl): 0,5µl (Firma Perkin Elmer)
6. Desoxy-Nukleotidtriphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP) dNTP (10mM): 0,5µl

Durch Herstellung von Mastermixen wurde die Verunreinigung durch Aerosole vermieden. Die DNA wurde separat hinzupipettiert.

Die Polymerasekettenreaktion wurde im programmierbaren Thermocycler (mit beheizbarem Deckel) durchgeführt. Folgendes Temperaturprofil wurde angewendet:

*Tabelle 8 Temperaturprofil für PCR Standardansatz*

| # | Schritt              | Zeit t | Temperatur T                      |                |
|---|----------------------|--------|-----------------------------------|----------------|
| 1 | Anfangsdenaturierung | 10 min | 95°C                              | } 33<br>Zyklen |
| 2 | DNA- Denaturierung   | 1 min  | 94°C                              |                |
| 3 | Primerannealing      | 1 min  | optimierte<br>Annealingtemperatur |                |
| 4 | Elongation           | 1 min  | 72°C                              |                |
| 5 | Abschlußelongation   | 10 min | 72°C                              |                |

### 3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

In Anschluß an die Polymerasekettenreaktion erfolgt die Überprüfung der Qualität der Amplifikate mit Hilfe der Gelelektrophorese. Durch den Einsatz der Gelelektrophorese kann eine Auftrennung und direkte Sichtbarmachung der Nukleinsäurefragmente erfolgen.

In der vorliegenden Untersuchung wurde 2%-iges Agarosegel in 1x TAE-Puffer genutzt. Die Anfärbung der PCR-Produkte erfolgte durch den Zusatz von Ethidiumbromid, welches schon bei der Gelherstellung in der Konzentration von 0,5 µg/ml unter das erhitzte Substrat gemischt wurde. Das Ethidiumbromid besitzt ein aromatisches Molekülgerüst und wirkt interkalierend. Der dadurch entstandene Farbstoffkomplex fluoresziert unter UV-Licht nach Anregung im UV-Transilluminator.

In die, in das Gel eingelassenen, Geltaschen erfolgte das Pipettieren von 5µl des PCR-Produktes und 5µl 6x Loading Dye Solution (blue). Der in diesem Puffer (Loading Dye Solution) enthaltene Zucker bewirkte ein Absinken der Proben in der Geltasche. Für die Größenabschätzung der PCR-Amplifikate direkt im Gel wurde parallel zu den Proben ein Größenstandard aufgetragen.

Aufgrund der negativen Ladung ihrer Phosphatgruppen konnten die PCR-Produkte durch das anschließende Anlegen einer Spannung von 100-110 mA innerhalb von 30-40 Minuten aufgetrennt werden. Unterstützt durch ein Puffersystem mit leicht basischem pH-Wert wandern die Amplifikate dabei von der Kathode zur Anode. Die Wanderungsgeschwindigkeit ist im Wesentlichen abhängig von der Größe des PCR-Produktes, der Höhe der angelegten Spannung und der Agarosegelkonzentration.

Nach dem Auftrennen der Amplifikate wurde das Ergebnis auf einem UV-Transilluminator durch das Ethidiumbromid sichtbar gemacht und photographisch dokumentiert. Durch Mispriming entstandene Produkte können nun ausgeschlossen werden, da die Größe der Fragmente im Gel mit den aus der Primerbestellung vorgegebenen Produktgrößen verglichen werden können.

### 3.3.6 Optimierung der Polymerasekettenreaktion

Die ausgesuchten Primerpaare unterscheiden sich hinsichtlich der Sequenzlängen und GC-Gehalte. Die dadurch variierenden Annealingtemperaturen wurden durch Polymerasekettenreaktionen mit unterschiedlichen Temperaturen in einem festgelegten Bereich ermittelt. Gegebenenfalls können Zusätze, die das Schmelzverhalten beeinflussen (Q-solution der Firma Quiagen), andere Polymerasen und GC-Kits für die optimalen Reaktionsbedingungen dem Ansatz zugefügt werden.

### 3.3.7 Enzymatische Reinigung der PCR-Produkte

Um die erhaltenen PCR-Produkte für die Sequenzanalyse einsetzen zu können, müssen die Taq-Polymerase, überschüssige dNTP's, Primer, sowie weitere störende Salze und Zusätze entfernt werden.

Hierfür kann, neben speziellen Kit-Systemen zur Aufreinigung, auch eine enzymatische Reinigung stattfinden. Dabei werden zwei Enzyme dem PCR-Produkt für 1 Stunde bei 37°C im Thermocycler zugesetzt. Zunächst macht man sich die Fähigkeit des Enzyms Exonuklease I zu nutze, welche ausschließlich einsträngige DNA, die Primer, abbaut. Die eingesetzte Shrimp Alkaine Phosphatase (SAP) verdaut nicht eingebaute dNTP's.. Die anschließende Inkubation der Proben bei 80°C für 15min führt zur Inaktivierung der Enzyme.

Die enzymatische Reinigung wurde nach folgendem Ansatz durchgeführt:

Reaktionsansatz (10µl) besteht aus

- PCR-Produkt 7,5µl
- SAP (1U/µl) 2,5µl
- Exonuklease I (20 U/ml) 0,1µl

*Tabelle 9 Programmablauf für den Thermocycler*

| <b>Temperatur T</b> | <b>Zeit t</b> |
|---------------------|---------------|
| 37 °C               | 1 Stunde      |
| 80 °C               | 15 min        |
| 4 °C                | ∞             |

### 3.3.8 Sequenzierung

Die Sequenzierung dient der Bestimmung der DNA-Sequenz, also der Basenabfolge in einem Abschnitt der Erbsubstanz.

Mehrere Methoden (Maxam und Gilbert Methode, Didesoxymethode nach Sanger, Pyrosequenzierung, Sequenzierung durch Hybridisierung) für die Sequenzierung sind bekannt.

Überwiegend finden aber Weiterentwicklungen der Methode nach Frederick Sanger Anwendung.

Das Prinzip der DNA-Sequenzierung nach der Didesoxymethode von Sanger wird auch Kettenabbruchmethode genannt. Sie stellt eine enzymatische Methode dar und wurde um 1975 entwickelt. Bereits 1977 wurde dieses Verfahren mit der ersten vollständigen Sequenzierung eines Bakteriophagengenoms vorgestellt (Sanger F et al. 1977). Dafür erhielt Sanger zusammen mit Gilbert 1980 den Nobelpreis für Chemie.

Das Prinzip beruht auf einem gezielten Abbruch der Sequenzierung an verschiedenen Stellen der Synthese.

Nach der Denaturierung erfolgt das Annealing der beiden Primer an den jeweiligen DNA-Einzelstrang. Ausgehend von diesen Primern verlängert die DNA-Polymerase beide DNA-Stränge mit Hilfe von Nukleotiden (dNTP) komplementär.

Die allgemeine Abkürzung für ein Nukleotid (dNTP) steht für die 4 verschiedenen Basen, also für dATP, dCTP, dGTP, dTTP.

In vier sonst im Ansatz gleiche Reaktionsgemische wird je eine der Basen in viel geringerer Konzentration als Didesoxynukleotid (ddNTP) zugegeben. Die ddNTPs als die entsprechenden Didesoxyvarianten der dNTPs führen bei ihrem Einbau in den neu synthetisierten DNA-Strang aufgrund der fehlenden 3'-Hydroxylgruppe an der Desoxyribose zum Abbruch der Polymerisationsreaktion. Die Einlagerung von ddNTP's erfolgt zufallsgemäß über die gesamte Matrize hinweg, wodurch eine Mischung neusynthetisierter DNA-Fragmente mit unterschiedlicher Länge entsteht. Die Reaktionsansätze enden in jedem Ansatz am 3'-Ende mit dem gleichen ddNTP.

Anschließend werden die Reaktionsprodukte mittels der Gelelektrophorese nach der Länge aufgetrennt. Die ddNTP sind entweder radioaktiv oder mit einer fluoreszierenden Gruppe

markiert. Somit kann das Synthesergebnis später in einem Gel sichtbar gemacht werden. Durch den Längenvergleich der unterschiedlich langen Fragmente in den vier Ansätzen auf dem Agarosegel kann die Basenabfolge abgelesen werden.

Als Weiterentwicklung der Methode nach Sanger kommt seit Anfang der neunziger Jahre eine Variation der Polymerase-Kettenreaktion zum Einsatz (Drossman H et al. 1990).

Dabei wird, anders als bei der PCR, pro Ansatz nur ein Primer eingesetzt, so daß in zwei Ansätzen jeweils einer der DNA-Stränge linear amplifiziert wird. Zu jedem Ansatz werden außerdem mit einem Fluoreszenzfarbstoff markierte Didesoxynukleotide zugesetzt. Dabei wird an jedes der vier ddNTPs ein spezifischer Farbstoff gekoppelt. Dadurch können alle vier Didesoxynukleotide in ein Reaktionsgefäß pipettiert werden, wobei eine Aufteilung in vier verschiedene Ansätze und der Einsatz von Radioisotopen entfällt.

Die auch hier entstehenden unterschiedlich langen Fragmente werden nach Reinigung mithilfe einer Kapillar-Gelelektrophorese getrennt. Der Farbstoff an den markierten ddNTPs wird durch einen Laser zur Fluoreszenz angeregt. Die unterschiedlichen Farben der ddNTPs am Ende jedes Fragmentes können von einem Detektor erkannt werden. Die Abfolge der am Detektor erscheinenden Farbsignale gibt direkt die Basenabfolge des sequenzierten Stranges wieder und kann mit einer geeigneten Software (z.B. SeqMan II 5.0) ausgewertet werden.

Auch die neueste Variante der Sangermethode, die Pyrosequenzierung, nutzt die Fähigkeiten der DNA-Polymerase (Ronaghi M et al. 1999; Nordstrom T et al. 2000). Der Anbau von Nukleotiden an den neusynthetisierten DNA-Strang durch die Polymerase kann hier direkt verfolgt werden. Der erfolgreiche Einbau eines Nukleotids wird durch ein Enzymsystem (u.a. durch Luziferase) in einen Lichtblitz übersetzt, der von einem Detektor erfasst wird.

Dabei liegt die zu sequenzierende DNA als einzelsträngige Matrize vor. Von einem Primer ausgehend erfolgt die Verlängerung des komplementären DNA-Stranges durch Zugabe einzelner Nukleosidtriphosphate kontrolliert. Beim Einbau eines passenden Nukleotids erfolgt dabei ein Signal (Lichtblitz). Überschüssige dNTP werden schnell aus der Lösung entfernt, es kommt daher zu keiner Vermischung der Signale. Beim Einbau einiger gleicher Nukleotide hintereinander erhält man ein zur Anzahl der eingebauten Basen proportionales Signal.

Diese Möglichkeit der quantitativen Signalauswertung ist eine der Stärken dieser Methode. Weiterhin ist die Pyrosequenzierung gut automatisierbar und eignet sich daher zur hochparallelen DNA-Analyse. Somit kann diese Methode zur Bestimmung der Häufigkeit von

speziellen Genmutationen (single nucleotide polymorphism/ SNP), bei der Untersuchung von Erbkrankheiten, eingesetzt werden.

### 3.3.9 Sequenzieransatz

In dieser Arbeit wurde für den Sequenzieransatz das BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit von Applied Biosystems verwendet. Das Kit enthält im Terminator Ready Reaktion Mix neben einer thermostabilen DNA-Polymerase auch einen für die Reaktion benötigten Puffer und Desoxynukleotide und fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide im Verhältnis 200:1.

Sequenzieransatz (10µl) besteht aus

- Big Dye Terminator Ready Reaktion Mix v3.1      2µl
- Primer (10pmol/µl)                                      1µl
- enzymatisch aufgereinigtes PCR-Produkt        5µl
- HPLC-Wasser    ad 10µl

*Tabelle 10 Temperaturprofil der Thermocycler für die Sequenzreaktion*

| # | Schritt            | Zeit t | Temperatur T                                |                |
|---|--------------------|--------|---|----------------|
| 1 | DNA- Denaturierung | 10 s   | 96 °C                                       | } 25<br>Zyklen |
| 2 | Primerannealing    | 15 s   | optimierte<br>Annealingtemperatur<br>- 1 °C |                |
| 3 | Elongation         | 4 min  | 60 °C                                       |                |
| 4 | Abkühlung auf      |        | 4 °C  |                |

Die Anwesenheit von überschüssigen Reagenzien nach Ablauf der Reaktion kann bei der anschließenden Sequenzierung die kapillarelektrophoretische Auftrennung beeinflussen.

Störende Salze, Enzyme oder nicht eingebaute Nukleotide können durch eine Fällung mit HPLC-Wasser und absolutem Ethanol heraus gewaschen werden. Dabei werden 26µl HPLC-Wasser und 64µl absolutes Ethanol mit dem PCR-Produkt aus der Sequenzreaktion gemischt und bei Raumtemperatur 20 Minuten präzipitiert. Ein erster Überstand wird nach 50-minütiger Zentrifugation bei 1500g abgegossen und das Pellet zwei weitere Male mit 100µl Ethanol (70%) gewaschen. Ein zweiter Überstand wird nach erneuter Zentrifugation für 10 Minuten bei 1500g abgegossen. Das gewonnene Substrat wird danach eine Minute bei 700g über Kopf zentrifugiert und für 10 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Nach einer

folgenden Resuspension in 16µl HPLC-Wasser steht das PCR-Produkt zur Sequenzanalyse bereit.

In der vorliegenden Untersuchung fand eine abschließende Aufreinigung der Produkte nach dem Prinzip der Gelfiltration mit dem DyeEx™ 2.0 Spin Kit der Firma Quiagen nach Herstellerangaben statt.

Mit Hilfe von Sephadex-Säulen, die mit PCR-Produkt (10µl) und HPCL-Wasser (10µl) getränkt wurden, und einer dreiminütigen Zentrifugation bei 3000g fand dabei die Vorbereitung der PCR-Produkte für die Sequenzierung statt. Das gereinigte PCR-Produkt wurde abschließend für die kapillarelektrophoretische Trennung mit HPLC-Wasser 1:4 verdünnt.

Die Sequenzierung fand mit dem ABI Prism Model 3100 Genetic Analyzer statt.

Um Veränderungen im genetischen Material möglichst eindeutig nachzuweisen, wurde jedes zu untersuchende PCR-Produkt sowohl vom 5`-Ende als auch vom 3`-Ende ausgehend sequenziert. Der Vergleich der Sequenzen erfolgte abschließend mit den aus Internet-Datenbanken (Ensembl Genome Browser) erhältlichen Wildtyp-Sequenzen.

### **3.3.10 Snapshotverfahren**

Das Snapshotverfahren eignet sich vor allen Dingen gut für die automatisierte Bestimmung schon bekannter Mutationen.

Prinzipiell ist das Snapshotverfahren, oder auch die Primer-Extensions-Methode, eine Sequenzierung von nur einer Base. Dabei sind methodische Ähnlichkeiten zur Sequenzierung erkennbar.

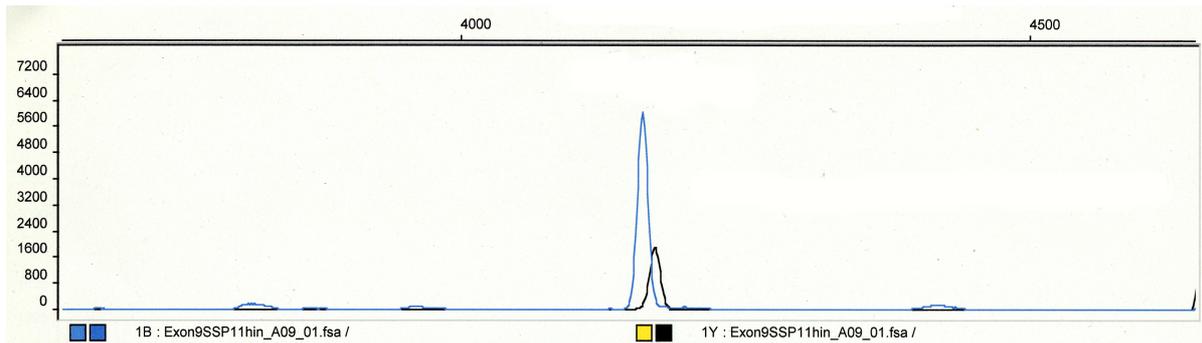
In diesem Verfahren werden die Primer so gewählt, daß sie exakt eine Base vor dem zu untersuchenden Polymorphismus spezifisch an das amplifizierte Fragment aus der Polymerase-Kettenreaktion binden. Durch die folgenden Amplifikationszyklen werden, wie bei der Sequenzierung, fluoreszenzmarkierte DNA-Stränge gebildet. Diese sind in dem Verfahren aber nur eine Base lang und zeigen genau den bekannten Ort der Substitutionsmutation.

Die kurze Sequenz ist dadurch möglich, daß in dem Snapshot-Ansatz nur Didesoxynukleotide (Abbruchnukleotide) und keine anderen Nukleotide enthalten sind. Als Reaktionsprodukt

erhält man den spezifischen Primer mit einem an die Stelle des Polymorphismus eingebauten fluoreszenzmarkierten Abbruchnukleotid.

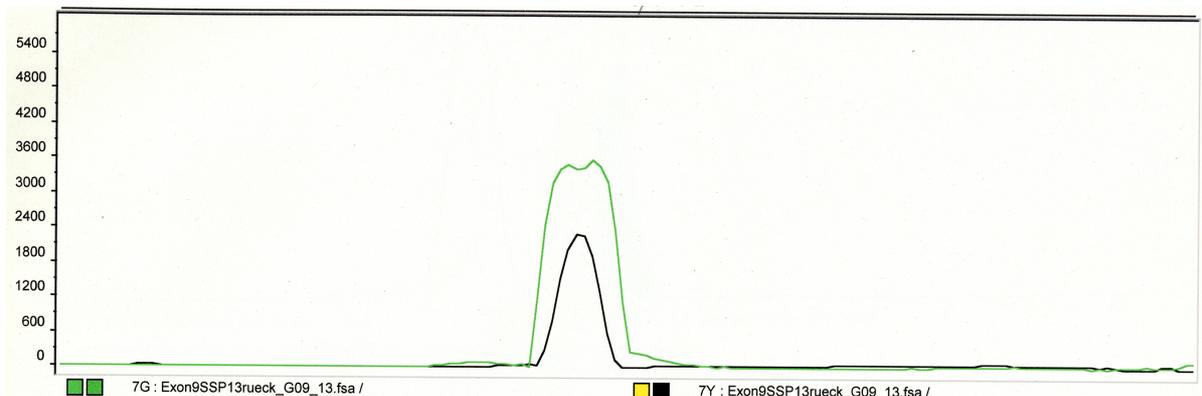
Bei einem autosomal-dominanten Erbgang erhält man demzufolge eine Sequenz mit zwei möglichen Abbruchnukleotiden.

Folgende Darstellungen von Snapshot-Ergebnissen belegen die Wirkungsweise dieses Verfahrens.



*Abbildung 16 Snapshot-Ergebnis (p.Pro 418 Arg)  
nach eigener Ausführung bei Patient A. G.*

*Diese Darstellung der Abbruchnukleotide in einer Hinsequenz zeigt den Austausch des Cytosins gegen Guanin. Aufgrund der farbigen Markierung ist eine Auswertung der dargestellten Nukleotide möglich. Da es sich beim Cherubismus um eine autosomal-dominante Erkrankung handelt, ist nur ein Teil der Chromosomensequenzen durch die Mutation verändert. Demzufolge liegen zwei Abbruchnukleotide in Hin- und Rücksequenz vor.*



*Abbildung 17 Snapshot-Ergebnis (p.Pro 418 His)  
nach eigener Ausführung bei Patient R. P.*

*Diese Darstellung der Abbruchnukleotide in einer Rücksequenz zeigt den Austausch des Guanins gegen Thymin. Aufgrund der farbigen Markierung ist eine Auswertung der dargestellten Nukleotide möglich. Da es sich beim Cherubismus um eine autosomal-dominante Erkrankung handelt, ist nur ein Teil der Chromosomensequenzen durch die Mutation verändert. Demzufolge liegen zwei Abbruchnukleotide in Hin- und Rücksequenz vor.*

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Auswertung der Sequenzierung des SH3BP2-Gens

Es wurden insgesamt 68 Patienten aus 17 Familien untersucht. Dabei konnte in 12 Familien bei 31 Mitgliedern eine Mutation festgestellt werden. Das sequenzierte Gen wurde dafür mit einer DNA-Sequenz eines gesunden Probanden verglichen.

Es waren 3 unterschiedliche genetische Veränderungen im Exon 9 des SH3BP2-Gens auf dem Chromosom 4p16 vorhanden.

Die Angabe der Mutationspositionen erfolgt anhand einer Sequenz (NM\_001122681.1) aus der Reference sequence-Datenbank des National Center for Biotechnology Information (NCBI).

An der mRNA-Position 1373 der oben genannten Sequenz wurde die Base Cytosin gegen Guanin und damit die Aminosäure Nummer 418, Prolin (CCC), durch Arginin (CGC) ersetzt.

Diese Mutation wird im folgenden Text in der üblichen Proteinschreibweise p.Pro 418 Arg bzw. p.P 418 R angegeben.

Am gleichen Mutationsort (mRNA-Position 1373) konnte Cytosin auch gegen Adenin ausgetauscht und dadurch Prolin zu Histidin (CAC) in der Proteinfole werden.

Auch diese Mutation wird im Weiteren mit p.Pro 418 His oder mit p.P 418 H beschrieben.

In einer weiteren Mutation wurde an mRNA-Position 1378 der oben genannten Sequenz Glycin (GGG) nach Arginin (AGG) geändert, Guanin wurde hier gegen Adenin getauscht.

Diese Mutation (rs 28938170, MIM Al Var 602 104.006) hat als Abkürzung p.Gly 420 Arg bzw. p.G 420 R.

Tabelle 11 Übersicht der Mutationspositionen des SH3BP2-Gens

| <b>Mutationsposition<br/>anhand der<br/>Sequenz<br/>NM_001122681.1<br/>(mRNA)</b> | <b>Basenaustausch</b> | <b>Aminosäureaus-tausch</b>              | <b>Proteinschreibweise</b> |
|---|-----------------------|--|----------------------------|
| Position 1373   | Cytosin → Guanin      | Nr. 418 Prolin (CCC) →<br>Arginin (CGC)  | p.Pro 418 Arg<br>p.P 418 R |
| Position 1373   | Cytosin → Adenin      | Nr. 418 Prolin (CCC) →<br>Histidin (CAC) | p.Pro 418 His<br>p.P 418 H |
| Position 1378   | Guanin → Adenin       | Nr. 420 Glycin (GGG) →<br>Arginin (AGG)  | p.Gly 420 Arg<br>p.G 420 R |

Bei der Datenanalyse wurden einige Polymorphismen auffällig, die hier mit aufgeführt werden sollen.

Die Angabe des Polymorphismusortes bezieht sich auf die mRNA-Sequenz NM\_001122681.1.

Bei drei untersuchten Patienten konnte in Exon 2 an mRNA-Position 243 der bekannte Polymorphismus rs 231402 gefunden werden. Die Aminosäure 41 (Leucin) wird hier durch das Triplet CTG und CTT repräsentiert.

Im Exon 4 konnten sogar zwei Polymorphismen ausgemacht werden. Bei einem Patienten wurde die Aminosäure Asparagin, Nummer 92, an mRNA-Position 396 durch die Basen AAC und AAT dargestellt. Eine rs-Nummer ist noch nicht vorhanden.

Auch in Exon 4 war bei zwei Patienten der Polymorphismus rs 3213501 vorhanden. Die Aminosäure 100 (Histidin) an mRNA-Position 420 wurde durch die Basenfolge CAC und CAT präsentiert.

Gleich bei fünf Patienten war in Exon 8 der Polymorphismus rs 231399 vorhanden. An mRNA-Position 870 stellt GCT und GCG die 250. Aminosäure Alanin dar.

Tabelle 12 Übersicht der Polymorphismuspositionen des SH3BP2-Gens

| Polymorphismusposition<br>anhand der Sequenz<br>NM_001122681.1 (mRNA) | Basenaustausch   | Aminosäure                 |
|---|------------------|----------------------------|
| Exon 2<br>Position 243<br>rs 231402                                   | Thymin → Guanin  | Nr. 41 Leucin (CTT/CTG)    |
| Exon 4<br>Position 396  | Cytosin → Thymin | Nr. 92 Asparagin (AAC/AAT) |
| Exon 4<br>Position 420<br>rs 3213501                                  | Cytosin → Thymin | Nr. 100 Histidin (CAC/CAT) |
| Exon 8<br>Position 870<br>rs 231399                                   | Guanin → Thymin  | Nr. 250 Alanin (GCG/GCT)   |

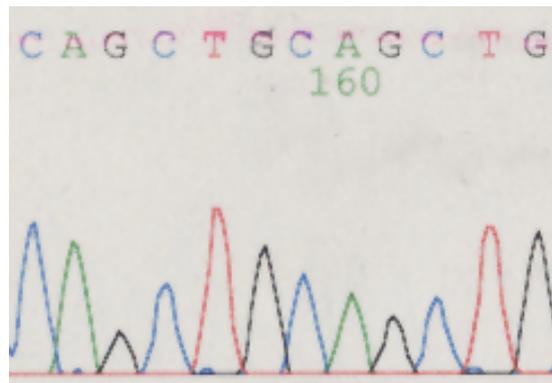
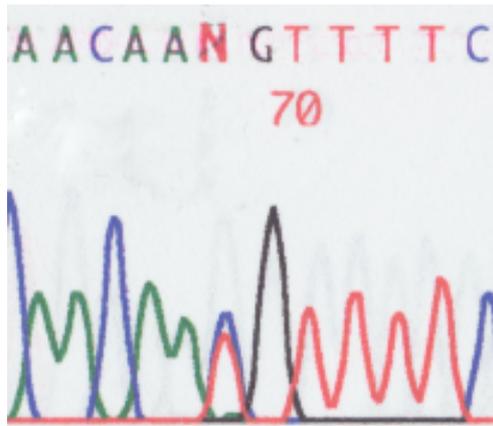


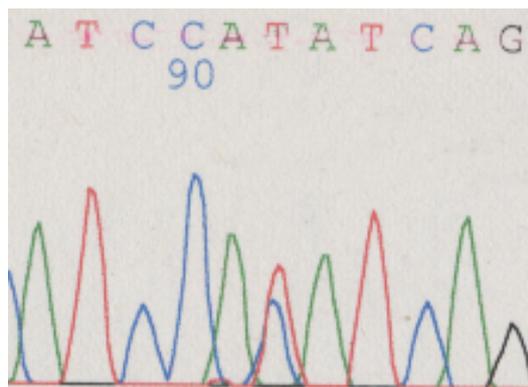
Abbildung 18 SH3BP2 Gen mit Polymorphismus in Exon 2 Position 243  
Elektropherogramm von Exon 2 nach eigener Durchführung

Bei einem Abgleich der Nukleotidsequenz mit einer Wildtypsequenz ist ein Nukleotidaustausch in Exon 2 an Position 243 (rs 231402) erkennbar. Das Nukleotid Thymin ist gegen Guanin in der Hinsequenz (CTT/CTG) ausgetauscht. Bei diesem Polymorphohismus findet kein Wechsel der codierten Aminosäure Nr. 41 Leucin statt.



*Abbildung 19 SH3BP2 Gen mit Polymorphismus in Exon 4 Position 396  
Elektropherogramm von Exon 4 nach eigener Durchführung*

Bei einem Abgleich der Nukleotidsequenz mit einer Wildtypsequenz ist ein Nukleotidaustausch in Exon 4 an Position 396 erkennbar. Das Nukleotid Cytosin ist gegen Thymin in der Hinsequenz (AAC/AAT) ausgetauscht. Bei diesem Polymorphohismus findet kein Wechsel der codierten Aminosäure Nr. 92 Asparagin statt. Durch den Polymorphismus scheint, wie bei einem autosomal-dominanten Erbgang, nur ein Teil der Chromosomensequenzen verändert. Daher sind zwei Nukleotide in der Sequenzfolge erkennbar.



*Abbildung 20 SH3BP2 Gen mit Polymorphismus in Exon 4 Position 420  
Elektropherogramm von Exon 4 nach eigener Durchführung*

Bei einem Abgleich der Nukleotidsequenz mit einer Wildtypsequenz ist ein Nukleotidaustausch in Exon 4 an Position 420 (rs 3213501) erkennbar. Das Nukleotid Cytosin ist gegen Thymin in der Hinsequenz (CAC/CAT) ausgetauscht. Bei diesem Polymorphismus findet kein Wechsel der codierten Aminosäure Nr. 100 Histidin statt. Durch

den Polymorphismus scheint, wie bei einem autosomal-dominanten Erbgang, nur ein Teil der Chromosomensequenzen verändert. Daher sind zwei Nukleotide in der Sequenzfolge erkennbar.

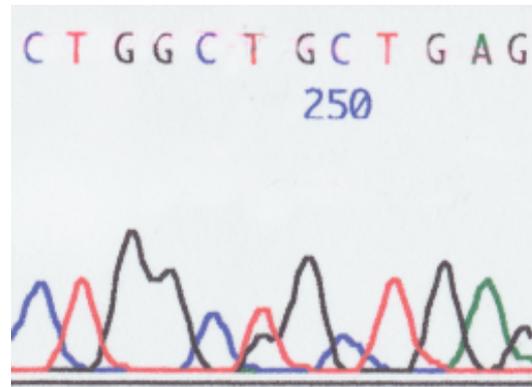


Abbildung 21 SH3BP2 Gen mit Polymorphismus in Exon 8 Position 870  
Elektropherogramm von Exon 8 nach eigener Durchführung

Bei einem Abgleich der Nukleotidsequenz mit einer Wildtypsequenz ist ein Nukleotidaustausch in Exon 8 an Position 870 (rs 231399) erkennbar. Das Nukleotid Guanin ist gegen Thymin in der Hinsequenz (GCG/GCT) ausgetauscht. Bei diesem Polymorphismus findet kein Wechsel der codierten Aminosäure Nr. 250 Alanin statt.

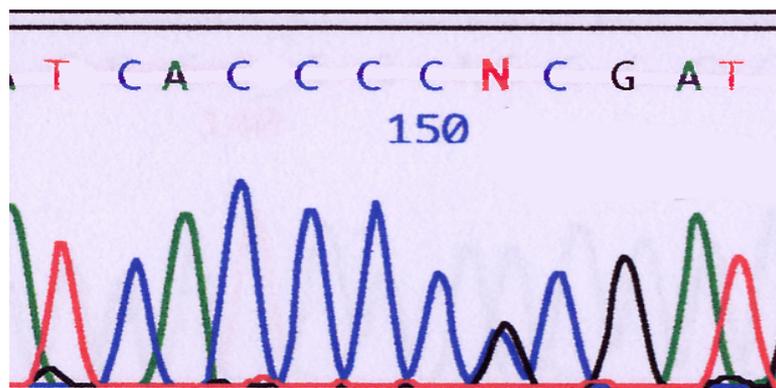
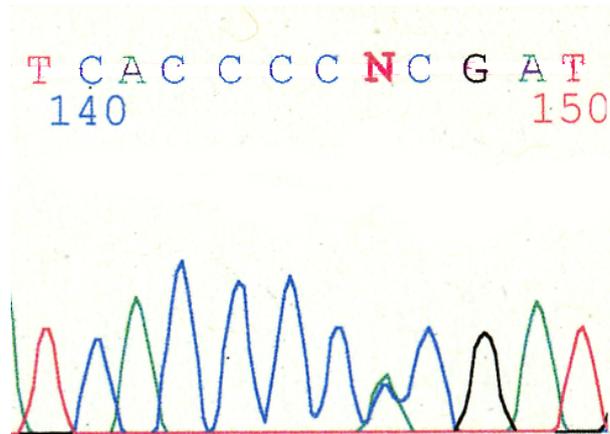


Abbildung 22 SH3BP2-Gen mit Mutation (p.P 418 R)  
Elektropherogramm von Exon 9 nach eigener Durchführung

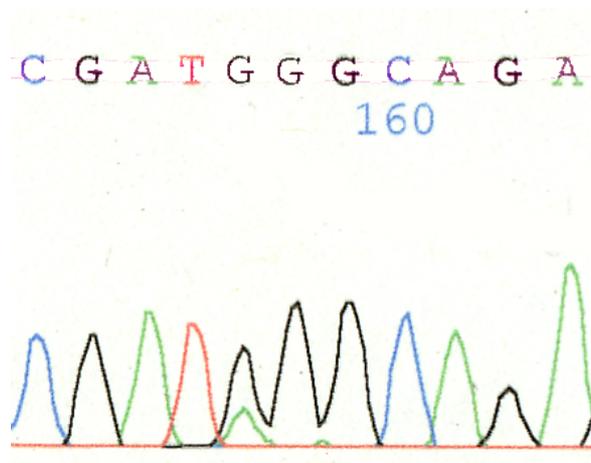
Aufgrund der farbigen Kennzeichnung ist eine Nukleotiderkennung möglich. Man erkennt den Austausch des Nukleotids Cytosin gegen Guanin in einer Hinsequenz. Damit findet ein Wechsel des Enzyms Prolin gegen Arginin statt. Aufgrund des autosomal-dominanten Erbganges beim Cherubismus ist durch die Mutation nur ein Teil der

Chromosomensequenzen verändert. Daher sind zwei Nukleotide in der Sequenzfolge erkennbar.



*Abbildung 23 SH3BP2-Gen mit Mutation (p.P 418 H)  
Elektropherogramm von Exon 9 nach eigener Durchführung*

Aufgrund der farbigen Kennzeichnung ist eine Nukleotiderkennung möglich. Man erkennt den Austausch des Nukleotids Cytosin gegen Adenin in einer Hinsequenz. Damit findet ein Wechsel des Enzyms Prolin gegen Histidin statt. Aufgrund des autosomal-dominanten Erbganges beim Cherubismus ist durch die Mutation nur ein Teil der Chromosomensequenzen verändert. Daher sind zwei Nukleotide in der Sequenzfolge erkennbar.



*Abbildung 24 SH3BP2-Gen mit Mutation (p.G 420 R)  
Elektropherogramm von Exon 9 nach eigener Durchführung*

Aufgrund der farbigen Kennzeichnung ist eine Nukleotiderkennung möglich. Man erkennt den Austausch des Nukleotids Guanin gegen Adenin in einer Hinsequenz. Damit findet ein Wechsel des Enzyms Glycin gegen Arginin statt. Aufgrund des autosomal-dominanten Erbganges beim Cherubismus ist durch die Mutation nur ein Teil der

Chromosomensequenzen verändert. Daher sind zwei Nukleotide in der Sequenzfolge erkennbar.

## **4.2 Fallbeschreibung**

Stellvertretend soll an 8 Patienten aus unterschiedlichen Familien und mit verschiedenen Mutationen nun die Klinik kurz dargestellt werden. Bei diesen Patienten ist der klinische Befund besonders gut dokumentiert, und die erhobenen Daten sind dadurch bedingt vergleichbar.

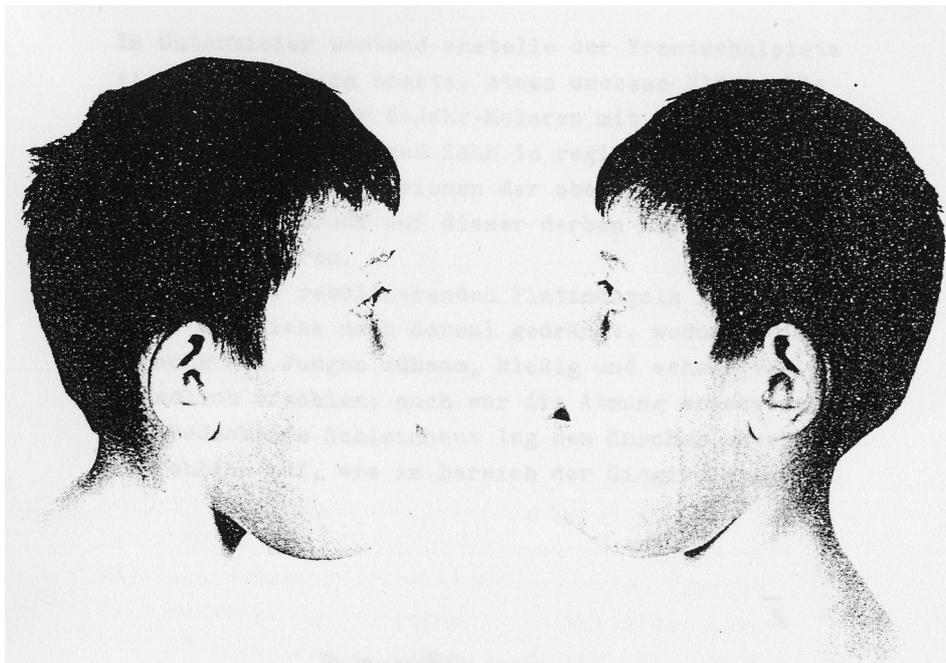
Eine Einteilung nach der von (Kalantar MH 1998) vorgeschlagenen Klassifikation wurde durchgeführt. Bei der Darstellung der klinischen Befunde wird vor allen Dingen auf den Befall des Unterkiefers, des Oberkiefers (mit besonderer Betrachtung des sogenannten „Himmelsblicks“), Hypodontien und Dislokalisationen/Formanomalien der Zähne eingegangen.

Beim ersten Patienten A. G. konnten die klinischen Daten aus der umfangreichen Dissertation von Kathrin Schneck aus dem Jahr 1984 gewonnen werden (Schneck K 1984). Die Arbeit „Cherubismus-eine fibröse Dysplasie- Verlauf und Rehabilitation am Beispiel des Güven, A.“ wurde an der Johann Wolfgang Goethe- Universität in Frankfurt/Main erstellt.

Nach der Klassifikation von Motamedi (Kalantar MH 1998) stellt diese Phänotypbeschreibung einen Patienten mit einer Grad IV.1-Erkrankung dar. Der Patient A. G. zeigte die Mutation (p.Pro 418 Arg) und eine ausgeprägte Auftreibung des Unterkiefers und des Oberkiefers mit 9,5 Jahren. Der Unterkiefer imponierte etwa mit dem 3fachen, der Oberkiefer mit dem ca.1,5fachen der normalen Größe. Auch der „Himmelsblick“ war stark ausgeprägt. Im Oberkiefer fehlten 8 Zähne; 4 Inzisivi, 2 Canini oder Prämolaren und 2 Molaren waren angelegt. Im Unterkiefer zeigte sich nur Zahn 33, ein Zahn war in regio 36 impaktiert, alle anderen Zähne waren nicht angelegt.



*Abbildung 25 Frontalansicht von Patient A.G.  
(Schneck K 1984)*



*Abbildung 26 Portraitansicht von Patient A.G.  
(Schneck K 1984)*

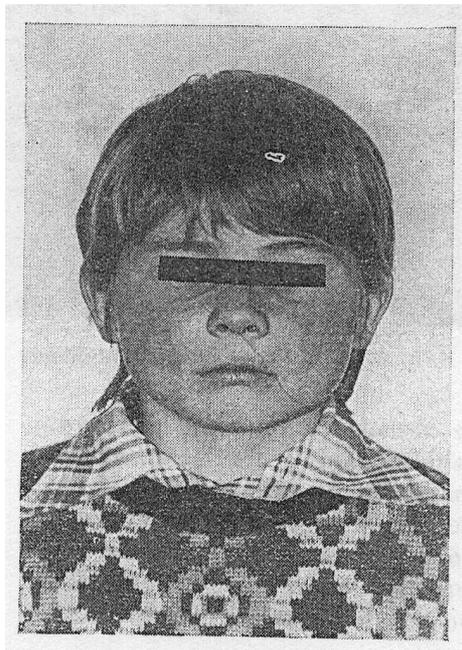
Patient K.-U. G. wurde von Opitz und Wittstock 1990 in einem Artikel phänotypisch beschrieben (Opitz C, Wittstock K 1990).

Auch dieser Patient zeigte eine Grad IV.1-Veränderung mit der Mutation p.Pro 418 Arg.

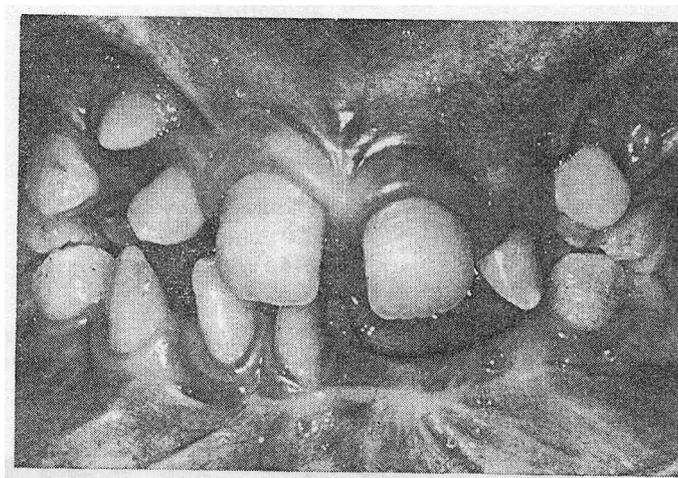
Mit 10,10 Jahren lagen keine typischen Augenveränderungen vor, aber die Wangenregion und Unterkieferseiten waren etwa auf die 1,5fache Größe angeschwollen. Im Oberkiefer fehlten

dem Patienten 2 Zähne (17, 27), die Weisheitszähne waren nur rudimentär angelegt. Im Unterkiefer zeigten sich dagegen 5 Zähne (37, 38, 42, 47, 48) nicht.

Außerdem konnte man multiple Anomalien und Dislokationen der Zähne beobachten. Die Zähne 12, 22 und 14 zeigten Hyperplasien. Zahn 14 hatte außerdem, genau wie Zahn 24, eine bukkale Durchbruchrichtung. Die Zähne 31 und 32 waren um 90° gedreht, 32 befand sich auch noch in linguale Position. Zahn 33 war horizontal verlagert, 45 hatte eine falsche Durchbruchrichtung. Die Eckzähne waren zu schmal gestaltet, die Zahnwurzeln vielfach verkümmert.



*Abbildung 27 Frontalansicht von Patient K.-U. G.  
(Opitz C, Wittstock K 1990)*

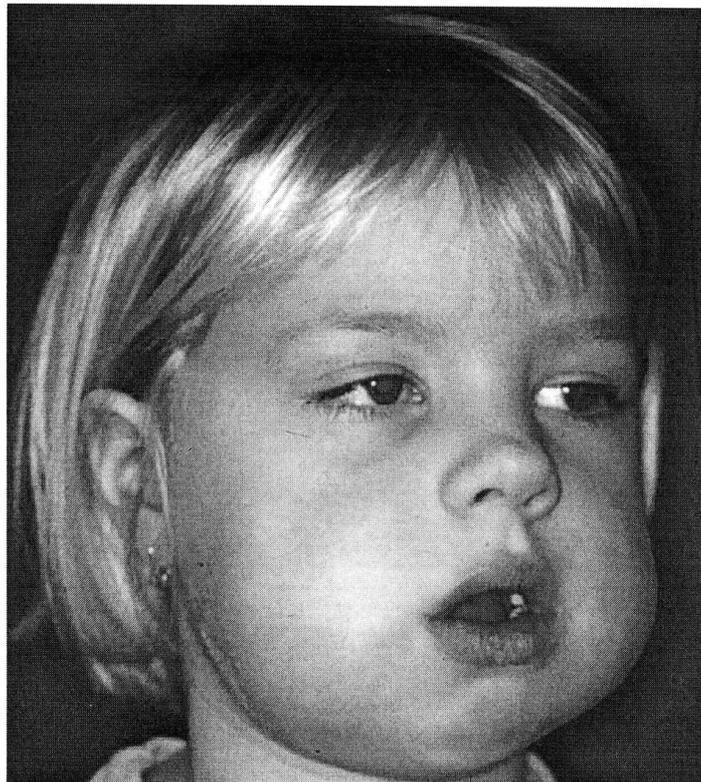


*Abbildung 28 Gebißsituation von Patient K.-U. G.  
(Opitz C, Wittstock K 1990)*

Die klinischen Befunde des dritten Patienten, L. R., wurden in der Dissertation von Michael Petschler 2002 beschrieben (Petschler M 2002). Die Arbeit „5 Generationen Cherubismus: Genetische Befunde und therapeutische Konsequenzen“ der Humboldt-Universität Berlin beschrieb die Krankheitsausprägung bei 5 Patienten und diskutierte die Genese unter genetischen Gesichtspunkten.

Die Patientin L. R. mit der Krankheitsausprägung II.1 wies schon mit 7 Jahren eine 2fache Verbreiterung des Unterkiefers und einen 1,5fach vergrößerten Oberkiefer auf. Auch hier war kein Himmelsblick vorhanden. Im Gegensatz zu den bisherigen Patienten waren hier alle Zähne, bis auf 47, vorhanden. Die Anlage der Weisheitszähne war erwartungsgemäß noch nicht erkennbar. Einzig die Zahnanlage 26 zeigte mit der Zahnkrone nach distal.

Auch hier war die Mutation p.Pro 418 Arg genetisch erkennbar.



*Abbildung 29 Portraitansicht von Patientin L. R.  
(Petschler M 2002)*



*Abbildung 30 Ansicht des Unterkiefers der Patientin L. R.  
(Petschler M 2002)*

Eine ähnliche Veränderung, wie bei dem Patienten Nr.3, war beim nächsten Patienten erkennbar. Auch hier lag die bekannte Mutation p.Pro 418 Arg vor.

Der Patient wurde von Motamedi 1998 in einem Artikel beschrieben (Kalantar MH 1998). Motamedi legte nach der Phänotypbeschreibung eine Krankheitsausprägung des Grades II.3 nach seinem Klassifizierungssystem fest.

Der Patient H. hatte mit 9 Jahren eine sichtbare Verbreiterung auf die 1,5fache Größe des normalen Ober- und Unterkiefers. Pathologische Veränderungen der Augen waren nicht ersichtlich. Im Oberkiefer fehlten anscheinend 4 Zähne (15, 16, 26, 27), im Unterkiefer 2 Zähne (37, 47). Die Anlage der Weisheitszähne konnte noch nicht beurteilt werden. Einige Anomalien an den Zähnen waren erkennbar. Der Zahn 45 bricht an der Position von Zahn 44 durch; weiterhin waren Wurzelanomalien am Zahn 45 vorhanden.



*Abbildung 31 Frontalansicht von Patientin H.  
(Kalantar MH 1998)*

Bei zwei untersuchten Patienten lag die Mutation p.Pro 418 His vor.

Patient R. P. wurde 2003 von L. Lelis, M. S., und S. Yano, M. D., Ph. D., im Division of Medical Genetics Childrens Hospital Los Angeles klinisch untersucht.

Der Patient wies mit 5 Jahren und 4 Monaten nur in der Computertomographie nachweisbare Schwellungen auf. Im Unterkiefer betragen die Veränderungen linksseitig 2,1 x 4,6 x 2,3cm und rechtsseitig 4,5 x 2,4 x 2,1cm, im Oberkiefer war nur linksseitig eine Schwellung der Größe 2,6 x 3,7 x 3,0cm erkennbar. Ein „Himmelsblick“ war dementsprechend nicht auszumachen. Auch zu Hypodontien, Dislokalisationen und Formanomalien an Zähnen lagen noch keine Angaben vor. Dies entspricht einer Krankheitsausprägung vom Grad II.1.

Der zweite Patient mit der Mutation p.Pro 418 His, C. A. V, hatte mit 7 Jahren eine 1,5fache Vergrößerung des Unterkiefers und eine moderate (0,5fach) Anschwellung des Oberkiefers. Die unteren Skleren, und damit ein leichter „Himmelsblick“, waren zu sehen.

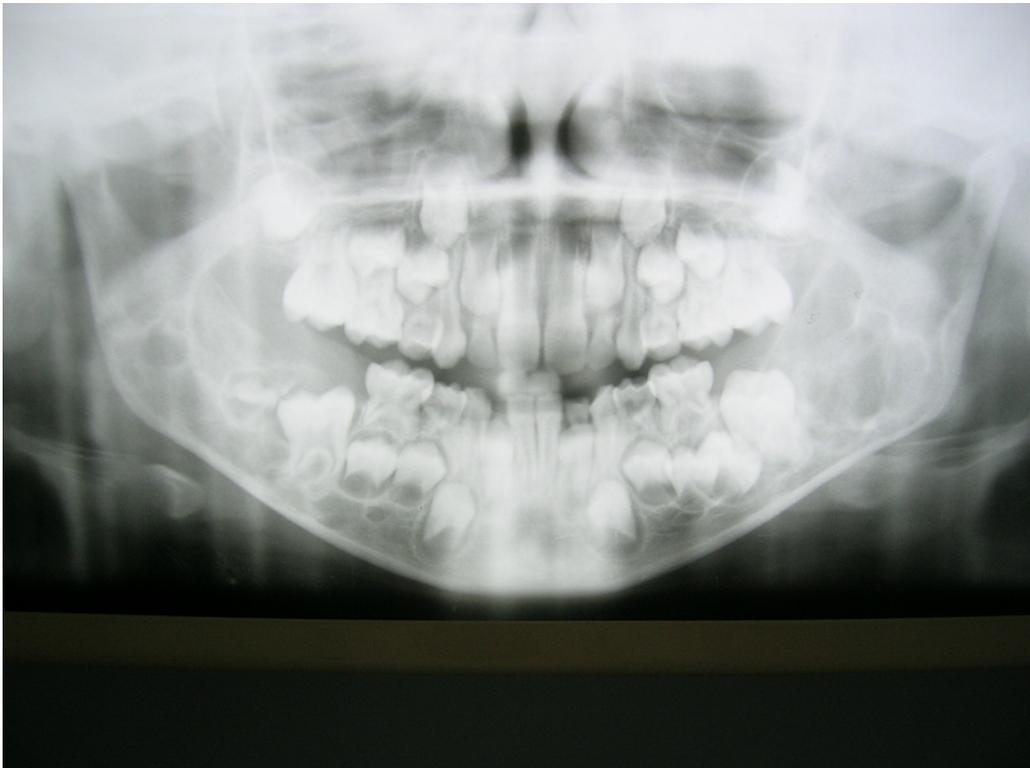
Im Ober- und Unterkiefer lag ein normales Wechselgebiss vor, alle Zähne bis auf die Weisheitszähne und Zahn 37 waren angelegt. Auch die Zahnanomalien waren nur gering ausgeprägt. Zahn 35 zeigte überzählige Höckerspitzen, Zahn 46 lag teilretiniert vor.

Dies wurde 2003 in der klinischen Untersuchung von F. Cortés, M. D., im Institut für Genetik, INTA, Universität von Chile festgestellt.

Somit konnte eine Krankheitsausprägung des Grades I.5 festgelegt werden.



*Abbildung 32 Frontalansicht Patientin C.A.V.*



*Abbildung 33 OPTG von Patientin C.A.V.*

Auch die dritte Mutation p.Gly 420 Arg lag bei zwei Patienten vor.

Der eine Patient, C. M. C. G., wurde 2003 von F. S. Obando, M. D., im Institut für Humangenetik, Universität von Javeriana, Kolumbien klinisch untersucht.

Es lag eine Grad IV.1-Erkrankung vor. Der Patient hatte mit 11 Jahren einen Ober- und Unterkiefer, der das 2fache der normalen Ausdehnung aufwies. Auch ein Himmelsblick mit deutlicher Proptosis waren erkennbar.

Im Oberkiefer lagen die Zähne 13, 15, 17, 23 retiniert vor, die Zahnanlagen von 18, 25, 27, 28 waren nicht vorhanden. Im Unterkiefer waren die Zähne 35, 37, 44, 45, 47 (rudimentäre Anlage) retiniert. Zwei Zähne (38 und 48) fehlten, bzw. die Zahnanlage war noch nicht beurteilbar. Die Keime der Zähne 13 und 23 waren außerdem in regio 16 und 26 verlagert, auch die Zahnkeime 35, 37, 44, 45, 47 wiesen verschiedene Dislokalisationen auf. Zahnkeim 17 war nach mesial gekippt und Zahn 47 mikrodont. Bei den Prämolaren lag eine verzögerte und dysmorphe Wurzelbildung vor.



*Abbildung 34 Frontalansicht von Patientin C.M.C.G.*



*Abbildung 35 OPTG von Patientin C.M.C.G.*

Der andere Patient mit derselben Mutation, J. T., zeigte mit 6 Jahren und 9 Monaten keine äußere Vergrößerung des Unter- und des Oberkiefers oder einen „Himmelsblick“. Weiterhin war ein normales Wechselgebiss vorhanden, alle Zähne (bis auf die Weisheitszähne) waren angelegt. Allgemein war eine enge Keimlage ersichtlich. Im Oberkiefer war eine beidseitige Knochenaufreibung im Bereich der zweiten Molaren und damit eine geringe Verdrängung der Zahnkeime in Kieferhöhlenrichtung zu beobachten. Im Unterkiefer lag eine starke Keimverlagerung der Zähne 37 und 47 in regio 36 und 46 mit apikaler Durchbruchrichtung und gleichzeitiger unterminierender Resorption an 75 und 85 vor. Die Zahnkeime 36 und 46 waren bis an den Unterkieferrand verlagert und zeigten eine starke Krümmung der wenig ausgebildeten Wurzeln.

Die beschriebenen Symptome entsprechen einer Erkrankung des Grades II.1.

Die klinische Untersuchung wurde 2003 von Dr. M. Petschler im Universitätsklinikum Benjamin Franklin, Klinik und Poliklinik für Zahn-, Mund-, Kieferheilkunde, Freie Universität Berlin durchgeführt.



*Abbildung 36 Frontalansicht von Patient J.T.*



*Abbildung 37 Gebißsituation von Patient J.T.*

Aus den dargestellten Untersuchungsergebnissen konnte keine Relation zwischen den unterschiedlichen Mutationen und der Ausprägung des Cherubismus festgestellt werden. Die klinischen Befunde zeigten sogar innerhalb eines Genotyps starke Diskrepanzen. Auch aufgrund der erheblichen Altersunterschiede zwischen den Probanden konnten keine eindeutigen Aussagen getroffen werden. Dies soll an einigen Beispielen dargestellt werden.

Bei den Patienten H. und L. R. konnte die Mutation p.Pro 418 Arg festgestellt werden. Der Patient L. R. zeigte schon mit 7 Jahren eine zweifache Vergrößerung des Unterkiefers, Patient H. mit 9 Jahren nur eine 1,5fache Auftreibung der Mandibula. Dem Patienten L. R. fehlt trotz stärkerer Vergrößerung des Unterkiefers nur ein Zahn, während dem Patienten H. zwei Zähne fehlen.

Drei Patienten im vergleichbaren Alter sind die Patienten A. G. (9,5 Jahre), Patient K.-U. G. (10,10 Jahre) und H. (9 Jahre). Auch diese Patienten zeigten trotz gleicher Mutation starke Unterschiede in der Ausprägung der Krankheit. Patient A. G. zeigte eine dreifache Vergrößerung des Unterkiefers, die Patienten K.-U. G. und H. nur eine 1,5fache Vergrößerung. Des weiteren fehlten dem Patienten A. G. im Unterkiefer 15 Zähne, während dem Patienten K.-U. G. 5 Zähne und dem Patienten H. zwei Zähne fehlten.

Desweiteren bestehen sogar bei Patienten mit unterschiedlichen Mutationen Übereinstimmungen und Unterschiede. Patient L. R. mit der Mutation p.Pro 418 Arg hat mit 7 Jahren eine ähnliche Vergrößerung der Mandibula und Maxilla, wie Patient C. A. V. mit der Mutation p.Pro 418 His. Beiden Patienten fehlt im Unterkiefer ein Zahn, im Oberkiefer sind alle Zähne vorhanden. Im Vergleich dazu zeigt Patient J. T. (Mutation p.Gly 420 Arg) im Alter von 6 Jahren und 9 Monaten keine äußeren Cherubismusanzeichen, alle Zähne sind vorhanden.

Diese Beispiele können als Hinweise auf eine fehlende Korrelation zwischen Genotyp und klinischer Krankheitsausprägung gewertet werden. Darauf wird in der abschließenden Diskussion näher eingegangen.

### 4.3 Tabellarische Darstellung der Ergebnisse

Tabelle 13 Übersicht der Ergebnisse

| Patient  | Mutation      | Klinik   |  |
|----------|---------------|--|--|
|          |               | <i>Veränderungen des Unterkiefers (UK)</i>   |  |
|          |               | <i>Veränderungen des Oberkiefers (OK)</i>  |  |
|          |               | <i>Fehlende Zähne</i>  |  |
|          |               | <i>Sonstige Zahnanomalien</i>  |  |
| A. G.    | p.Pro 418 Arg | UK → dreifache Vergrößerung mit 9,5 Jahren   |  |
|          |               | OK → 1,5 fache Vergrößerung mit 9,5 Jahren<br>„Himmelsblick“ stark ausgeprägt                          |  |
|          |               | OK: 8 Zähne fehlen<br>UK: 15 Zähne fehlen  |  |
|          |               | ausgeprägte Anomalien (verkümmerte Wurzeln etc.)   |  |
| K.-U. G. | p.Pro 418 Arg | UK → 1,5 fache Vergrößerung mit 10, 10 Jahren  |  |
|          |               | OK → 1,5 fache Vergrößerung mit 10, 10 Jahren<br>kein Himmelsblick vorhanden                           |  |
|          |               | OK: 2 Zähne fehlen<br>UK: 5 Zähne fehlen   |  |
|          |               | ausgeprägte Anomalien (hypoplastische Zähne etc.)  |  |
| L. R.    | p.Pro 418 Arg | UK → 2 fache Vergrößerung mit 7 Jahren   |  |
|          |               | OK → 1,5 fache Vergrößerung mit 7 Jahren<br>kein Himmelsblick vorhanden                                |  |
|          |               | OK: alle Zähne vorhanden<br>UK: 1 Zahn fehlt Weisheitszähne noch nicht beurteilbar                     |  |
|          |               |  |  |
| H.       | p.Pro 418 Arg | UK → 1,5 fache Vergrößerung mit 9 Jahren   |  |
|          |               | OK → 1,5 fache Vergrößerung mit 9 Jahren<br>kein Himmelsblick vorhanden                                |  |
|          |               | OK: 4 Zähne fehlen<br>UK: 2 Zähne fehlen   |  |
|          |               | Weisheitszähne noch nicht beurteilbar  |  |
|          |               | geringe Anomalien erkennbar  |  |
| R. P.    | p.Pro 418 His | UK → Schwellungen im CT links 2,1 x 4,6 x 2,3 cm, rechts 4,5 x 2,4 x 2,1 cm mit 5 Jahren und 4 Monaten |  |

|             |               |  |
|-------------|---------------|--|
|             |               | <p>OK → Schwellungen im CT links 2,6 x 3,7 x 3,0 cm mit 5 Jahren und 4 Monaten<br/>kein Himmelsblick vorhanden</p> |
|             |               | k. A.  |
|             |               | k. A.  |
| C. A. V.    | p.Pro 418 His | <p>UK → 1,5 fache Vergrößerung mit 7 Jahren</p>  |
|             |               | <p>OK → 0,5 fache Vergrößerung mit 7 Jahren<br/>leichter „Himmelsblick“ vorhanden</p>                              |
|             |               | <p>OK: alle Zähne vorhanden<br/>UK: 1 Zahn fehlt<br/>Weisheitszähne noch nicht beurteilbar</p>                     |
|             |               | geringe Anomalien erkennbar  |
| C. M. C. G. | p.Gly 420 Arg | <p>UK → 2 fache Vergrößerung mit 11 Jahren</p>   |
|             |               | <p>OK → 2 fache Vergrößerung mit 11 Jahren<br/>„Himmelsblick“ moderat erkennbar, deutliche Proptosis</p>           |
|             |               | <p>OK: 2 Zähne fehlen<br/>UK: alle Zähne vorhanden<br/>Weisheitszähne noch nicht beurteilbar</p>                   |
|             |               | deutliche Anomalien erkennbar (dysmorphe Wurzelbildung etc.)   |
| J. T.       | p.Gly 420 Arg | <p>UK → keine äußere Vergrößerung mit 6 Jahren und 9 Monaten erkennbar</p>   |
|             |               | <p>OK → keine äußere Vergrößerung mit 6 Jahren und 9 Monaten erkennbar<br/>kein „Himmelsblick“ erkennbar</p>       |
|             |               | <p>OK: alle Zähne vorhanden<br/>UK: alle Zähne vorhanden<br/>Weisheitszähne noch nicht beurteilbar</p>             |
|             |               | deutliche Anomalien erkennbar (Keimverlagerung durch Kieferauftreibungen etc.)                                     |



## **5 Diskussion**

Das Ziel der vorliegenden Untersuchung war es, aus dem Vergleich der klinischen Befunde mit den molekulargenetischen Untersuchungsergebnissen Beziehungen zwischen beiden Erhebungen herzustellen.

Für die Praxis würde dies bedeuten, im Frühstadium der Erkrankung und bei potentiellen Merkmalsträgern, auch bereits vor dem Auftreten der Symptome prognostische Einschätzungen treffen zu können, und Konsequenzen für eine begleitende Betreuung und Behandlung abzuleiten.

In der Literatur sind erkennbare Ergebnisse einer Genotyp-Phänotyp-Korrelation, vergleichbar mit meinen Recherchen, nicht bekannt.

In den meisten Arbeiten ist der Schwerpunkt entweder auf die klinischen Befunde, teilweise mit molekulargenetischem Hintergrund, oder nur auf neue Therapieansätze, Versuche zur Klassifikation des Cherubismus oder Ergebnisse molekulargenetischer Untersuchungen ohne weiteren klinischen Befund gelegt.

### **5.1 Klinische Darstellungen**

Schon 1986 beschrieb Grau und Mitarb. in dem Artikel „Verlaufsformen und Therapiemaßnahmen beim Cherubismus“ (Grau H et al. 1986) die krankheitsbedingten Veränderungen und deren Therapie. Dieser bezieht sich jedoch nur drei Patienten in der klinische Darstellung.

Kalantar stellt 1998 vier Patienten und eine neue Klassifikation vor (Kalantar MH 1998). Die unter Absatz 2.3 beschriebene Einteilung konnte sich wegen der hohen Variabilität in der Krankheitsausprägung klinisch aber nicht durchsetzen. Sie wurde in der vorliegenden Untersuchung aber dennoch verwendet, um eine relative Objektivität im klinischen Vergleich zu gewährleisten.

Meng und seine Mitarb. publizierten 2005 eine der größten Kohorten. Anhand von 24 Patienten machen sie Vorschläge für eine einheitliche Therapie (Meng XM et al. 2005).

Auch in der aktuelleren Literatur aus den Jahren 2006 und 2007 werden Kasuistiken ohne Molekulargenetik dargestellt:

Wang stellt mit seiner Arbeitsgruppe 2006 zwei Familien mit mehreren unterschiedlich stark betroffenen Mitgliedern ohne Diskussion der Ätiologie vor (Wang CN et al. 2006).

Penarrocha untersuchte mit seiner Forschergruppe 2006 den Zusammenhang zwischen klinischer Krankheitsausprägung und radiologischen bzw. histologischen Befunden bei sieben Patienten (Penarrocha M et al. 2006).

Oft auftretende ophthalmologische Komplikationen beim Cherubismus betonen Elfahsi und Mitarbeiter bei einem Patienten (Elfahsi A et al. 2007).

## **5.2 Kasuistiken mit molekulargenetischen Befunden**

Ongole und Mitarb. beschreiben 2003 zwei Fälle mit klinischen Befunden (Ongole R et al. 2003). Die zugrundeliegenden Mutationen werden unkommentiert angegeben, die Ursachen für ihre phänotypischen Auswirkungen werden nicht diskutiert.

## **5.3 Molekulargenetische Befunde**

Einige Autoren beschränken sich in ihren Artikeln nur auf die untersuchten Mutationen.

Eine Annäherung an den Mutationsort gelang zunächst 1999 Tiziani, Mangion und Mitarb. (Tiziani V et al. 1999), (Mangion J et al. 1999).

Die sieben bis dato bekannten Mutationen beschrieb die Forschungsgruppe um Ueki 2001 bei 12 Familien (Ueki Y et al. 2001). Hier wurde gänzlich auf die Darstellung von klinischen Befunden verzichtet.

Imai und seine Arbeitsgruppe teilten 2003 einen sporadischen Fall mit (Imai Y et al. 2003). Da Neumutationen bis jetzt nur selten nachgewiesen werden konnten, ist dieser Artikel als Hinweis auf eine solche Mutationen von besonderem Interesse.

## **5.4 Untersuchungen auf Proteinebene**

Zur Zeit liegt das Hauptaugenmerk auf der Erforschung der Genese des Cherubismus auf der Proteinebene.

Den Primäreffekt der Mutation auf Proteinebene analysieren Miah und seine Forschergruppe 2004 (Miah SM et al. 2004). In dieser Publikation wird die Bedeutung der Interaktionen des SH3BP2-Proteins mit verschiedenen Proteinen und Rezeptoren für die Entstehung der Cherubismus-typischen Läsionen untersucht.

Lietman und Li beschreiben 2006 in ihren Artikeln jeweils eine neue Mutation mit ihren Auswirkungen auf der Proteinebene ohne Bezug auf die klinische Symptomatik (Lietman SA et al. 2006), (Li CY, Yu SF 2006).

Wang und Mitarb. vermuten 2006 eine Tyrosinkinase als wahrscheinlich mitverantwortlich für die Ausprägung aller Läsionen, die Riesenzellen beinhaltenden (Cherubismus, zentrales Riesenzellgranulom der Kiefer, zentraler Riesenzelltumor) (Wang C et al. 2006).

In einigen weiteren neuen Publikationen aus den Jahren 2007, 2008, wie von Ueki, Hatani, Lietman und ihren Arbeitsgruppen, wird die Rolle des SH3BP2-Proteins, wie unter Absatz 4.2 dargestellt, für die Ausprägung auf klinischer Ebene beschrieben (Ueki Y et al. 2007), (Vereinfachtes Schema der Proteinbiosynthese), (Hatta R et al.).

## **5.5 Klinische Befunde mit Bezug zu den molekulargenetischen Grundlagen**

Lee und sein Team (Lee J et al. 2008) stellen in einem Artikel die Verbindung zwischen molekulargenetischen Befunden und einem einzelnen Fall spezifischer dar. Aber auch Lee sieht nur in der genetischen Analyse eine Möglichkeit zur Differenzierung des Cherubismus und stellt keine Beziehung zwischen Allel und Phänotyp her.

Zusammenfassend ist festzustellen, daß aus der Literatur keine Korrelation zwischen Mutation und klinischer Krankheitsausprägung zu erkennen ist. Die Schwierigkeiten dabei liegen in der geringen Anzahl der untersuchten Patienten und der vor allem altersabhängigen Variabilität des Krankheitsbildes selbst. In den meisten bekannten Explorationen standen nur wenige Patienten zur Verfügung, das Alter der Patienten war unterschiedlich und der Verlauf der Erkrankung nicht immer klar zu verfolgen. Nur bei einem Teil der Krankheitsfälle war die Mutation bekannt. Die Vielfalt der Symptome ist schwer vergleichbar. Dies soll in dieser Arbeit bei eigenen Patienten versucht werden.

Die Schwierigkeiten bei der vorliegenden Diskussion liegen auch hier in der geringen Anzahl der untersuchten Patienten. Es standen nur drei unterschiedliche Mutationen bei 31 Patienten aus 12 Familien zur Auswahl. Deshalb mußte auf eine statistische Auswertung verzichtet werden.

Das Mittel der Statistik wird vor allen Dingen in der quantitativen Genetik angewandt. Dieses Teilgebiet der Genetik befasst sich mit den genetischen Ursachen von phänotypischen

Merkmale, die auf einer kontinuierlichen Skala gemessen werden können, z. B. Größe oder Gewicht.

Die Methoden der klassischen quantitativen Genetik sind z.B. auf den Einfluß der Umwelt und der genetischen Faktoren auf die phänotypische Merkmalsausprägung, bzw. die klinische Charakteristik, anwendbar.

Es wird dazu die Varianz eines Merkmals untersucht und versucht, dessen phänotypische Varianz (die Streuung um den Mittelwert) in ihre Komponenten (genetische Varianz und Varianz durch Umwelteinflüsse) zu zerlegen.

Die genetische Variabilität kann außerdem weiter aufgeschlüsselt werden, um zu erforschen, wie z.B. Gene untereinander oder mit Umweltfaktoren interagieren. Dafür ist die Untersuchung der intrafamiliären Variabilität von Interesse. Sie zeigt, wie stark sich Verwandte (z. B. Eltern und Kinder) hinsichtlich eines Merkmals gleichen.

Eine weitere neue Untersuchungsmethode der klassischen quantitativen Genetik ist das „Quantitative Trait Locus Mapping“ (QTL-Mapping). Dieses Verfahren wird eingesetzt, um die Genorte zu finden, die ein Merkmal beeinflussen. Ähnlich wie bei der Kartierung einzelner Gene wird hierbei versucht, die für die Ausprägung des Phänotyps wichtigen Genorte nachzuweisen.

Mittels statistischer Methoden, wie z. B. maximum likelihood, versucht man eine Aussage über die Wahrscheinlichkeit, daß ein bestimmter Genort das Merkmal beeinflusst, zu treffen. Das endgültige Ziel eines solchen QTL-Experiments ist es, die Nukleotide in der DNA zu finden, die die Wirkung eines Gens verändern.

Für eine solche Analyse werden in Studien mit einer großen Anzahl von Probanden die Ausprägung eines bestimmten Merkmals in Relation zu den Variationen (Allelen) der DNA-Sequenzen untersucht. Für derartige QTL-Untersuchungen sind v. a. Gensequenzen mit einem hohen Polymorphismusgrad, also mit einer hohen Zahl an verschiedenen Allelen, von Interesse.

Für Merkmale mit einer überschaubaren Anzahl von Variationen (z. B. das Geschlecht) ist die Identifizierung der verantwortlichen Gene in vielen Fällen vergleichsweise einfach. Im Regelfall sind nur ein Gen oder wenige Gene an der Merkmalsausprägung beteiligt. Die Vererbung entspricht oft einem klassischen Erbgang und kann durch einen solchen hinreichend genau beschrieben werden.

Im Gegensatz dazu wird die Ausprägung von Merkmalen, die jeden beliebigen Wert annehmen können (z. B. Körpergröße oder -gewicht), durch Interaktionen einer größeren Anzahl von Genen, sowie durch zusätzliche Wechselwirkungen mit Umweltfaktoren, bestimmt.

Eine solche Polygenie folgt keinem klassischen Erbgang. Der Anteil jedes einzelnen Gens an der Merkmalsausprägung ist vergleichsweise gering und darüber hinaus von den genannten Interaktionen abhängig. Die Identifizierung der Gene, die an der Ausprägung eines quantitativen Merkmals beteiligt sind, ist deshalb methodisch sehr aufwendig.

Für den Cherubismus, als monogen autosomal dominant bedingtes Merkmal, sind solche Untersuchungen zunächst nicht sinnvoll. Es kann jedoch angenommen werden, daß die klinische Variabilität auch durch andere Genorte beeinflusst wird. Für deren Erkennung könnten die oben angeführten Methoden anwendbar sein, allerdings mit der dazu nötigen großen Patientenzahl.

Trotz der geringen Patientenzahl soll dennoch auf einige interessante Aspekte in den genetisch-klinischen Zusammenhängen der hier untersuchten Patienten eingegangen werden.

In dieser Untersuchung zeigte sich, daß ungefähr gleichaltrige Patienten mit derselben Mutation stark unterschiedliche Krankheitsverläufe aufweisen können. So hatte Patient A. G. mit der Mutation p.Pro 418 Arg mit 9,5 Jahren insgesamt 23 anlagebedingt fehlende Zähne und einen ausgeprägten „Himmelsblick“ mit starker Gesichtsschwellung. Währenddessen zeigte Patient H. mit der gleichen Mutation im Alter von 9 Jahren keinen „Himmelsblick“ und nur eine mäßige Gesichtsschwellung. Hier fehlten in der Anlage nur sechs Zähne.

Durch einen Vergleich der klinischen Befunde konnten andererseits Patienten mit unterschiedlichen zugrundeliegenden Mutationen und ähnlichem Erscheinungsbild ausgemacht werden. Patient L. R. (Mutation p.Pro 418 Arg) zeigte mit sieben Jahren nur einen nicht angelegten Zahn, keinen „Himmelsblick“ und eine mäßige Vergrößerung der Maxilla und Mandibula. Auch Patient C. A. V. mit der Mutation p.Pro 418 His wies, mit Ausnahme eines leichten „Himmelsblicks“, die gleiche Symptomatik mit sieben Jahren auf.

Eine Gemeinsamkeit läßt sich bei allen Patienten feststellen. Mit zunehmendem Alter der Patienten verstärkt sich, bis zur einsetzenden spontanen Regression, die Krankheitssymptomatik. Die folgenden Erläuterungen unterstützen diese Aussage. Ein

Zusammenhang im Verlauf und in der Progredienz der einzelnen Mutationen lässt sich dennoch nicht erkennen.

Mit fünf Jahren und vier Monaten konnte eine Vergrößerung der Maxilla und Mandibula bei dem Patienten R. P. (p.Pro 418 His) nur in der Computertomographie ausgemacht werden.

Auch bei J. T. (p.Gly 420 Arg) war mit sechs Jahren und neun Monaten ein fehlender Zahn oder eine Schwellung des Gesichtes nicht zu erkennen. Ältere Patienten mit etwa sieben Jahren zeigten eine mäßige Gesichtsschwellung (L. R. [p.Pro 418 Arg], C. A. V. [p.Pro 418 His]) und teilweise sogar einen geringfügigen „Himmelsblick“ (C. A. V. [p.Pro 418 His]).

Noch stärker sind die spezifischen Symptome der Erkrankung bei den ältesten untersuchten Patienten ausgeprägt. Bei K.-U. G. (10,10 Jahre, p.Pro 418 Arg) fehlen sieben Zähne, und eine mäßige Vergrößerung der Kieferknochen ist zu beobachten. Mit 11 Jahren zeigte C. M. C. G. (p.Gly 420 Arg) eine sichtbare Schwellung der Maxilla und Mandibula und einen moderaten „Himmelsblick“. Dem Patienten fehlen zwei Zahnanlagen.

Das deutlichste Krankheitsbild ist bei A. G. (9,5 Jahre, p.Pro 418 Arg) mit einer sehr starken Gesichtsschwellung, 23 fehlenden Zähnen und einem ausgeprägten „Himmelsblick“ zu verzeichnen.

Diese Aussage über den Krankheitsverlauf unterstützt auch die folgende Bilderserie des Patienten C. M. C. G. (p.Gly 420 Arg).



*Abbildung 38 Patientin C.M.C.G. mit 4 Jahren*



*Abbildung 39 Patientin C.M.C.G. mit 9 Jahren*



*Abbildung 40 Patientin C.M.C.G. mit 10 Jahren*



*Abbildung 41 Patientin C.M.C.G. mit 11 Jahren*

Eine in der Literatur bekannte geschlechtsunterschiedliche Krankheitsausprägung konnte bei der geringen Patientenanzahl nicht belegt werden.

Männliche wie weibliche Patienten können eine starke (A. G./männlich, C. M. C. G./weiblich) oder auch geringe Krankheitssymptomatik (J. T./männlich, R. P./weiblich) aufweisen.

Diese wenigen Beispiele zeigen, daß weitere Untersuchungen mit größeren Kohorten eine Richtung in der Genotyp-Phänotyp-Analyse erbringen könnten. Durch die Beschreibung weiterer Krankheitsverläufe und durch die Untersuchung der intrafamiliären Variabilität bei der Ausprägung einer Mutation könnten genauere Aussagen möglich sein, wobei allerdings unsere Beispiele der unterschiedlichen Symptomatik bei gleicher Mutation und der ähnlichen Symptomatik bei Patienten mit unterschiedlichen Mutationen das eher unwahrscheinlich sein läßt.

Carvalho und seine Mitarbeiter haben 2007 in einem aktuellen Artikel (Carvalho VM et al. 2007) einen aggressiven Krankheitsverlauf beim Cherubismus mit einer dazugehörigen neuen Mutation dargestellt. Diese Mutation ist in der PH-Domäne des SH3BP2- Proteins lokalisiert. In der Literatur wird, wie unter 4.2. dargestellt, eine krankheitsverursachende Veränderung im SH3BP2-Protein vermutet, welche in der Kausalkette zwischen Mutation und Symptomen ausschlaggebend ist. Vielleicht können solche speziellen Krankheitsfälle mit ihren Mutationen, wie in dem Artikel von Carvalho, ein neues Licht auf die Phänotyp-Genotyp-Beziehung werfen. Allerdings ist dies bisher der einzige bekannte Fall. Es bleibt abzuwarten,

ob bei weiteren Patienten mit dieser Mutation eine ähnlich extreme Merkmalsausprägung nachgewiesen werden kann.

Somit kann also über Erklärungsmöglichkeiten für die intrafamiliäre Variabilität und eine eventuelle Genotyp-Phänotyp-Korrelation zum jetzigen Zeitpunkt nur spekuliert werden.

Beim Zusammentragen der klinischen Untersuchungsergebnisse fiel der männliche Patient J. T. mit einigen Besonderheiten auf.

Er wies, wie Patient C. M. C. G., dieselbe Neumutation (Gly 420 Arg) auf. Die Eltern beider Patienten waren nachweislich die biologischen Eltern und keine Anlagenträger, es handelt sich hier also um belegbare Neumutationen. Über das voneinander unabhängige Auftreten von Neumutationen und die zugrundeliegenden Ursachen für die beiden Neumutationen an diesem Genort läßt sich nur spekulieren. Es kann sich um einen Zufallsbefund handeln oder um eine Disposition dieses speziellen Triplets zu Neumutationen. Weiterhin bleibt abzuwarten, ob aufgrund derselben Mutation eine stärkere Korrelation im Krankheitsverlauf der beiden Patienten festzustellen ist.

Der Patient C. M. C. G. wies im Alter von 11 Jahren eine zweifache Vergrößerung der Mandibula und Maxilla mit einem moderaten Himmelsblick, aber einer deutlichen Proptosis, auf. Im Oberkiefer fehlten zwei Zahnanlagen, im Unterkiefer waren alle Zähne vorhanden. Die vorhandenen Zähne zeigten aber deutliche Anomalien, wie dysmorphe Wurzelbildungen.

Der Patient J. T. war zum Zeitpunkt der Diagnosestellung erst 6 Jahre und 9 Monate alt. Die krankheitstypischen Symptome waren zu dieser Zeit bei dem Patienten nur sehr gering ausgeprägt. So zeigen sich die typischen Auftreibungen des Kieferknochens nur durch intraorale Schwellungen der Maxilla. Die radiologischen Untersuchungen wiesen die Anlage aller Zähne, aber deutliche Keimverlagerungen, aus.

Ob Neumutationen eine generell leichtere Symptomatik aufweisen, läßt sich anhand dieser nur zwei Patientenfälle nicht klären. Die relativ starke Krankheitsausprägung bei Patient C. M. C. G. läßt dies aber sehr unwahrscheinlich sein.

Weiterhin könnte der männliche Patient J. T. ein Beispiel für eine geringe Expressivität auch beim männlichen Geschlecht sein. Diese Möglichkeit wurde schon von Petschler erwogen (Petschler M 2002).

Eine geringe Expressivität einer Mutation birgt das Risiko des Verkennens der auftretenden Mikrosymptome im Kindes- und Erwachsenenalter. Hier muß eine gewissenhafte Untersuchung der auftretenden Symptome durch den geschulten Arzt stattfinden. Eine eindeutige Diagnose ist meist erst durch eine genetische Untersuchung möglich. Der Mutationsnachweis im Gen bringt damit Klärung, v.a. bei diagnostisch schwierigen Fällen. Die Möglichkeit der Genuntersuchung sollte damit vor allem bei sporadischen Krankheitsfällen mit vermuteten Neumutationen beachtet werden.

Für die Praxis ergibt sich aus der Möglichkeit der variablen Expressivität einer Mutation ein wichtiger Gesichtspunkt: Auch bei identischer Mutation können Aussagen zu Krankheitsentwicklung, Art und Schwere der Erscheinungen nur sehr bedingt gemacht werden.

Es sollten aber noch weitere Möglichkeiten für die außergewöhnlich starke Variabilität der Erkrankung auch innerhalb einer Familie, abgesehen von der Mutation, herangezogen werden. Das bedeutet, die klinische Ausprägung ist nicht allein durch die eine Mutation bestimmt. Dabei könnten molekulargenetisch nicht erfasste Unterschiede im Gen selbst oder Einflüsse anderer Genorte bzw. des homologen Allels verantwortlich sein. Ursächlich kommen z.B. unterschiedliche Normalallele (Wildtyp-Allele) in Frage.

Polymorphismen bezeichnen Varianten innerhalb der Gensequenz (des Allels) in einer Population. Definitionsgemäß muß die Häufigkeit des Auftretens der Variante mit der geringeren Frequenz (der Allelfrequenz) größer als ein Prozent sein. Über den Polymorphismus beim Cherubismus ist noch wenig bekannt.

Die häufigsten Sequenzvariationen sind die Einzelnukleotidpolymorphismen (SNP). Dabei kommt es zu einem Austausch eines Nukleotids in der DNA-Sequenz. Es wird von einem Polymorphismus auf 200-1000 Basenpaare im menschlichen Genom ausgegangen. Liegt diese Varianz im kodierenden Bereich (Exon) einer Gensequenz, kann das zu einem Aminosäureaustausch im resultierenden Protein führen. Da aber viele Aminosäurecodons redundant vorliegen, muß ein Nukleotidaustausch nicht phänotypisch wirksam sein. In der molekulargenetischen Routineanalyse werden solche Veränderungen im Wildtypallel nicht erfasst.

Es werden weiterhin z.B. Genokopien, bzw. Heterogenie oder somatische Mosaike für die Vielfältigkeit im Cherubismus diskutiert.

Somatische Mosaikbildung kann bei Mutationen auftreten, die postzygotisch, also nach den ersten Zellteilungen, entstehen. Der Organismus besteht später somit aus Zellen mit und ohne Mutation. Die phänotypische Ausprägung der Erkrankung kann durch die Mosaikbildung abgeschwächt sein, da Körperzellen ohne Mutation eine normale Funktion aufzeigen. Solche somatischen Mutationen sind auf Gen- oder chromosomaler Ebene möglich. Chromosomale Mosaikbildung kann bei X-chromosomalen Erkrankungen relativ häufig auftreten, dabei befinden sich in unterschiedlichen Körperzellen unterschiedliche Chromosomensätze, z.B. im Turner-Syndrom XX/XO-Mosaikbildung. Auch beim Cherubismus sollte die Möglichkeit der somatischen Mosaikbildung nicht außer Acht gelassen werden. Um das Vorhandensein derartiger Mosaikbildung als Ursache für die unterschiedliche Ausprägung auszuschließen, muß Gewebe aus den betroffenen unterschiedlichen Regionen entsprechend untersucht werden.

Eine weitere mögliche Erklärung für die Variabilität des Cherubismus ist die Heterogenität oder Genkopie. Sie beschreibt die Entstehung gleichartiger oder nicht sicher unterscheidbarer Merkmale, bzw. Krankheiten, infolge der Mutation nichtalleler Gene; also die Mutationen unterschiedlicher Gene führen zur Ausbildung eines Merkmals.

Dies kann erklären, warum bei einigen Patienten auch bei klinisch und histologisch gesicherten Cherubismuserkrankungen keine Mutation am bekannten Genort nachzuweisen ist. Auch in einem im Rahmen dieser Arbeit untersuchten Krankheitsfall waren eindeutige Cherubismussymptome vorhanden, es konnte aber in keinem Exon des Gens eine Mutation gefunden werden. Von einigen Autoren wurde bereits erwogen, ob seltene sporadische Cherubismusfälle durch Mutationen in anderen Genen verursacht werden können (Kozakiewicz M et al. 2001). Diese Autoren diskutieren auch, daß dabei ein autosomal-rezessiver Erbgang beim Cherubismus vorliegt. Zurzeit sind Untersuchungen auf diesem Gebiet in Arbeit, die dies bestätigen sollen.

Allen in dieser Arbeit beschriebenen Krankheitsfällen lag eine Mutation auf dem autosomalen Chromosom 4 zugrunde.

Verschiedene Punktmutationen können für den Cherubismus verantwortlich sein. Daß die Schwere der Ausprägung der Erkrankung aber unabhängig von der bekannten Mutation ist, konnte in dieser Arbeit gezeigt werden. Ob dennoch ein Zusammenhang zwischen der Mutation im SH3BP2-Gen und dem Phänotyp der Krankheit besteht, müssen Untersuchungen mit größeren Kohorten zeigen.

Ein weiteres Ziel dieser Arbeit war das Aufzeigen von möglichen Schlußfolgerungen für die genetische Familienberatung. Die starke klinische Variabilität der Erkrankung und die fehlende Korrelation zwischen Genotyp und phänotypischer Ausprägung konnten dabei in dieser Untersuchung dargestellt werden.

Bei der individuellen genetischen Familienberatung spielt die Einschätzung des Wiederholungsrisikos in der Familie und die Eigenprognose des Patienten eine wesentliche Rolle. Sie hat nicht nur das mögliche Risiko einer Erkrankung in Betracht zu ziehen, sondern auch den Krankheitswert des Leidens und die Prognose, bzw. die Therapiemöglichkeiten (Witkowski R, Herrmann FH 1989).

Seit der Erstbeschreibung des Cherubismus durch Jones 1933 (Jones W 1933) wurden weltweit nur ca. 300 Fälle beschrieben (Stiller M et al. 2000).

Petschler beschrieb erstmals die geringe Expressivität beim männlichen Geschlecht (Petschler M 2002). Es handelt sich um ein bekanntes Phänomen in der medizinischen Genetik, was klassisch mit variabler Expressivität umschrieben wurde, wobei dies nur in wenigen autosomal dominanten Defekten bisher erklärt werden konnte. Sie erschwert die Risikoeinschätzung bei der genetischen Familienberatung und muß bei der Darstellung von familiären Krankheitsbildern berücksichtigt werden.

Der Schweregrad bei einem Indexpatienten besagt nichts über die Ausprägung bei anderen Familienangehörigen mit identischer Mutation. Es gibt demnach eine unterschiedliche Krankheitsausprägung auch innerhalb einer Familie (Petschler M 2002; Kalantar MH 1998). Daher ist es umso wichtiger Mikro- und Teilsymptome bei allen Familienmitgliedern zu beachten, um Anlagenträger nicht zu übersehen und das Risiko nicht falsch einzuschätzen.

Weiterhin ist die Familienberatung durch das Auftreten phänotypisch gesunder Anlagenträger erschwert. Da trotz des allgemein bekannten, typischen Krankheitsbildes mit merkmalsfreien Anlagenträgern zu rechnen, bzw. mit wachsendem Alter der klinische Nachweis des Cherubismus erschwert ist, muß bei familiärprognostischen Fragestellungen auch eine genaue klinische und, wenn möglich, molekulargenetische Diagnostik bei unauffälligen Familienangehörigen durchgeführt werden. Durch den genetischen Mutationsnachweis ist in solchen Fällen (phänotypisch gesunde Patienten, evtl. mit Mikro- und Teilsymptomen) eine eindeutige Diagnose möglich.

Ein Problem bleibt weiterhin das Risiko durch Neumutationen, bzw. sporadisch auftretende Fälle.

Eine weitere Möglichkeit in der genetischen Familienberatung besteht in der pränatalen Diagnostik. Dabei wird zwischen invasiven und nicht-invasiven Methoden unterschieden. Gängige Untersuchungen sind z.B. die nicht-invasiven, nur außerhalb des Körpers vorgenommenen Untersuchungen, wie die Sonographie. Auch serologische Untersuchungen der Hormonkonzentrationen im mütterlichen Blut gehören zu den nicht-invasiven Untersuchungen.

Invasive, also innerhalb des Körpers vorgenommene, Untersuchungen sind die Chorionzottenbiopsie, die Amniozentese (Fruchtwasserpunktion) und die Nabelschnurpunktion.

Die nicht-invasiven Untersuchungen, wie die Kontrolle des mütterlichen Blutes oder eine Sonographie, sind nach heutigen Erkenntnissen für das Ungeborene und seine Mutter völlig risikofrei.

Invasive Diagnoseverfahren beinhalten nach neuesten Studien kaum Risiken für den Fetus. Trotzdem kann eine absolute Sicherheit für Mutter und Kind bei den Eingriffen nicht garantiert werden. Aus diesem Grunde sollte mit der Überweisung für diese Untersuchungen sehr vorsichtig umgegangen werden. Eine ausführliche Beratung sollte dabei gewissenhaft erfolgen.

Denn trotz großer Einschränkungen, physischer und psychischer Belastungen im Kindes- und Jugendalter und Schwierigkeiten bei der prothetischen Rehabilitation im Erwachsenenalter ist die Prognose des Cherubismus positiv einzuschätzen. Es liegen keine Hinweise auf eine maligne Entartung der Erkrankung vor, und die teilweise oder vollständige Remission der Läsionen ist bekannt. Auch eine mögliche sehr schwache klinische Ausprägung mit keinen oder nur geringen (Mikro-) Symptomen ist zu bedenken und in der Familienberatung darzulegen. Eine Interruption der Schwangerschaft aufgrund der Diagnose Cherubismus ist als nur in seltenen Ausnahmefällen eventuell angezeigt.

Nach der Diagnose Cherubismus steht therapeutisch neben der zurückhaltenden chirurgischen Intervention nur die fachärztliche Verlaufskontrolle zur Verfügung. Erste Erkenntnisse über die Funktion des Genprodukts lassen auf eine zukünftige kausale Therapie hoffen.

Weitere Untersuchungen mit größeren Patientengruppen sind zu den noch offenen Fragen dringend notwendig.

## 6 Zusammenfassung

Beim Cherubismus handelt es sich um eine sehr seltene autosomal-dominante Erkrankung der Maxilla und Mandibula.

Ziel dieser Arbeit war die Untersuchung eines Zusammenhanges zwischen den unterschiedlichen Missense- Mutationen im SH3BP2-Gen und ihren phänotypischen Ausprägungen beim Cherubismus.

Die Auswirkungen auf die genetische Familienberatung wurden dabei ebenso beleuchtet, wie die Darstellung der Erkrankung in der aktuellen Literatur.

Für die vorliegende Arbeit konnten 68 Probanden aus 17 Familien in die molekulargenetische Untersuchung eingeschlossen werden. Bei allen Patienten erfolgte die Sequenzierung vom Exon 9 des SH3BP2-Gens. Das betroffene Protein SH3BP2 enthält drei Domänen: eine Src-Homologie-2- (SH2), eine Src-Homologie-3- (SH3) und eine Pleckstrin-Homologie-Domäne (PH). Die Etablierung der Sequenzierung des Gens fand im Institut für Medizinische Genetik statt.

Die klinischen und molekulargenetischen Befunde wurden stellvertretend von acht betroffenen Patienten dargestellt. Bei all diesen acht untersuchten Patienten fanden sich folgende Missense-Mutationen:

Einerseits fand die Transversion von Cytosin durch Guanin (GI: 514 644 40: g. 219 888 C > G) oder Adenin (GI: 514 644 40: g. 219 888 C > A) an der Position 219 888 der Sequenz mit der GI-Nummer 514 644 40 der RefSeq-Datenbank des NCBI statt.

Andererseits konnte an Position 219 893 der Austausch von Guanin (GGG) durch Adenin (AGG) gefunden werden (GI: 514 644 40: g. 219 893 G > A).

Dies führte im ersten Fall zu einer nichtkonservativen Substitution der Aminosäure Nummer 418 Prolin (CCC) durch Arginin (CGC; p.Pro 418 Arg) oder Histidin (CAC; p.Pro 418 His). Am zweiten Mutationsort wurde das Protein 420 Glycin (GGG) durch Arginin (AGG) ausgetauscht (p.Gly 420 Arg).

Die untersuchten Mutationen liegen im Bereich der Verbindungsstelle zwischen der SH2- und SH3-Domäne und verursachen eine veränderte Wirkungsweise, u.a. eine verminderte

Kinasebindungsaktivität und reduzierte Interaktionen mit anderen Proteinen, des Proteins in vivo.

Die klinischen Auswirkungen durch die Mutation des SH3BP2-Proteins zeigten bei den untersuchten acht Patienten eine hohe Variabilität. Auch zwei festgestellte gleichartige Neumutationen bildeten darin keine Ausnahme. Es konnten sowohl kaum verifizierbare Veränderungen, wie auch stark entstellende Krankheitsausprägungen, festgestellt werden. Dabei konnte keine Korrelation zwischen den bekannten Mutationen und ihrer phänotypischen Ausprägung identifiziert werden. Gleiche Punktmutationen zeigten unterschiedliche klinische Ausprägungen, während Patienten mit vergleichbarem klinischen Befund unterschiedliche ursächliche Mutationen aufwiesen.

Es konnte aber festgestellt werden, daß die Progredienz der Erkrankung mit steigendem Lebensalter zunahm.

Unterschiedliche Ursachen für die hohe Variabilität des Cherubismus werden diskutiert. Polymorphe Normalallele, wie auch Genokopien, eine Polygenie oder somatische Mosaik können für die Varianz im Krankheitsbild des Cherubismus verantwortlich sein. Aufschluß über diese Fragen werden nur Untersuchungen mit größeren Patientengruppen geben können.

Aufgrund der auch in dieser Arbeit nur geringen zur Verfügung stehenden Probandenzahl wurde auf eine statistische Auswertung verzichtet.

Die geringe Patientenzahl kann auch der Grund für eine fehlende Genotyp- /Phänotyp- Untersuchung in der Literatur sein.

Zurzeit sind keine Untersuchungen mit größeren Patientengruppen bezüglich einer Genotyp- /Phänotyp- Korrelation bekannt. Es werden aktuell in der Fachpresse molekulargenetische Untersuchungsergebnisse beschrieben oder klinische Befunde dargestellt. Außerdem werden mikrobiologische Zusammenhänge untersucht und Klassifikationen oder Therapievorschlüsse des Cherubismus vorgestellt. Ein Zusammenhang zwischen genetischen Befund und seiner phänotypischen Ausprägung wird aber nicht diskutiert.

Dies hat auch Auswirkungen auch die genetische Familienberatung. Die schwierige klinische Prognose, auch aufgrund der unvollständigen Penetranz des Cherubismus und häufiger Neumutationen, macht eine Beratung sehr komplex. Trotzdem ist die Prognose des Cherubismus v. a. aufgrund seines selbstlimitierenden Charakter als positiv einzuschätzen.

Um offen gebliebene Fragen zu klären, müssen weitere Untersuchungen mit größeren Probandenzahlen durchgeführt werden.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

|                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| abl                               | abgeleitet von Abelson- Maus- Leukämie  |
| aqua dest.                        | aqua destillata   |
| Arg                               | Arginin   |
| Asp                               | Asparaginsäure  |
| ATP                               | Adenosintriphosphat   |
| BMP                               | bone morphogenetic protein  |
| bp                                | Basenpaar   |
| Cbfa 1                            | core binding factor- alpha 1  |
| cDNA                              | complementary DNA= komplementäre DNA  |
| c- Src                            | abgeleitet von cell- sarcoma/ zelluläres Sarkomprotein                          |
| CT                                | Computertomographie   |
| ddNTP= ddATP, ddCTP, ddGTP, ddTTP | Didesoxynukleotidtriphosphat= Didesoxy-Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin-triphosphat |
| Dlx-1/2                           | distal- less homeobox 1/2   |
| DNA= DNS                          | Desoxy-Nuclein-Acid= Desoxy-Nukleinsäure  |
| dNTP= dATP, dCTP, dGTP, dTTP      | Desoxynukleotidtriphosphat= Desoxy-Adenin/Cytosin/Guanin/Thymin-triphosphat     |
| EDTA                              | Ethylendiamintetraacetat  |
| ERK                               | extrazellulär- regulierte Kinase  |
| FcepsilonRI-Rezeptor              | Rezeptor für die Fc- Domäne von freiem IgE mit hoher Affinität                  |

|                   |   |
|-------------------|---|
| FGF               | fibroblast growth factor  |
| Gly               | Glycin  |
| G- Protein        | Guaninnucleotidbindendes Protein  |
| GTP               | Guanosintriphosphat   |
| Hh                | hedgehog gen  |
| Hox- Gen          | homeotic selector- Gen/ homöotisches Selektorgen                                  |
| HPCL              | High Performance Liquid Chromatography=<br>Hoch-Leistungs-Flüssig-Chromatographie |
| IgE               | Immunglobulin E   |
| IgG               | Immunglobulin G   |
| IKK               | inhibitor of nuclear factor kappa ( $\kappa$ ) B kinase                           |
| JNK               | c- Jun N- terminale Kinase  |
| k. A.             | keine Angabe  |
| KCl               | Kaliumchlorid   |
| MAPK              | mitogenaktivierte Proteinkinase   |
| M- CSF            | mononuclear phagocyte colony- stimulating factor                                  |
| MgCl <sub>2</sub> | Magnesiumchlorid  |
| 1mM               | 1Millimol   |
| MRT               | Magnetresonanztomographie   |
| Msx- 1            | ehemals Hox-7   |
| 1 $\mu$ l         | 1Mikroliter   |
| NaCl              | Natriumchlorid  |

|                  |  |
|------------------|--|
| NCBI             | National Center for Biotechnology Information                        |
| NFAT             | nuclear factor of activated T-cells,<br>Transkriptionsfaktor         |
| NF- kappa B      | nuclear factor kappa ( $\kappa$ ) B                                  |
| 1ng              | 1Nanogramm   |
| OK               | Oberkiefer   |
| OMIM             | Online Mendelian Inheritance in Man                                  |
| OPTG             | Orthopantomogramm  |
| PCR              | polymerase-chain-<br>reaction=Polymerasekettenreaktion               |
| PE               | Perkin Elmer   |
| pH               | abgeleitet von pondus Hydrogenii                                     |
| PH- Domäne       | Pleckstrin- Homologie- Domäne  |
| PLC $\gamma$ 1,2 | Phospholipase c $\gamma$ 1, 2  |
| 1pmol            | 1picomol   |
| Pro              | Prolin   |
| PTH              | Parathormonrezeptor  |
| PTHrP            | Parathormonrezeptor related Protein                                  |
| QTL              | quantitative trait locus   |
| Rac1             | ras related C3 botulinum toxin substrate 1                           |
| rank             | receptor activator of nuclear factor- kappa ( $\kappa$ ) B           |
| rankl            | receptor activator of nuclear factor- kappa ( $\kappa$ ) B<br>ligand |
| Ras              | abgeleitet von Rat sarcoma   |

|               |   |
|---------------|---|
| RAW 264.7     | mouse leukaemic monocyte macrophage cell line |
| Refseq        | Reference Sequence                            |
| RNA= RNS      | ribonucleic acid= Ribonukleinsäure            |
| SAP           | Shrimp Alkaine Phosphatase                    |
| SDS           | Sodiumdodecylsulfat                           |
| Ser           | Serin   |
| SH2/3- Domäne | Src- Homologie- 2- Domäne                     |
| SH3BP2        | SH3-Bindungsprotein 2                         |
| SNP           | single nucleotide polymorphism                |
| Src           | Sarcoma                                       |
| SYK           | spleen tyrosine kinase                        |
| TAE (-Puffer) | Tris-Acetat-EDTA-Puffer                       |
| Taq           | abgeleitet von Thermus aquaticus              |
| TE (- Puffer) | Tris-EDTA(- Puffer)                           |
| TM            | unregistered trade mark                       |
| TNF- alpha    | Tumornekrosefaktor- alpha                     |
| Trap          | tartrate- resistant acid phosphatase          |
| TRIS          | Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan              |
| Tris-HCl      | Trizma®-hydrochlorid                          |
| 1U            | 1 Unit Stoffeinheit                           |
| UK            | Unterkiefer                                   |
| UV            | ultraviolett                                  |

|      |  |
|------|--|
| VAV1 | proto-oncogene vav-Protein nach VAV1-Gen |
| WHO  | World Health Organisation                |
| Wnt  | abgeleitet von Wg (wingless) und Int-Gen |

## 8 Literaturverzeichnis

(Vereinfachtes Schema der Proteinbiosynthese)

Adler CP,Harle F. Zur Differentialdiagnose osteo-fibröser Kiefererkrankungen. Verh Dtsch Ges Pathol, 1974:58:308–14.

Arnott DG. Cherubism--an initial unilateral presentation. Br J Oral Surg, 1978:16:38–46.

Ayoub AF,el-Mofty SS. Cherubism: report of an aggressive case and review of the literature. J Oral Maxillofac Surg, 1993:51:702–5.

Battaglia A, Merati A,Magit A. Cherubism and upper airway obstruction. Otolaryngol Head Neck Surg, 2000:122:573–4.

Becelli R, Marini AM,Carboni A. A diagnostic protocol in cherubism. Minerva Stomatol, 1998:47:447–51.

Bei M,Maas R. FGFs and BMP4 induce both Msx1-independent and Msx1-dependent signaling pathways in early tooth development. Development, 1998:125:4325–33.

Bell SM, Shaw M, Jou YS, Myers RM,Knowles MA. Identification and characterization of the human homologue of SH3BP2, an SH3 binding domain protein within a common region of deletion at 4p16.3 involved in bladder cancer. Genomics, 1997:44:163–70.

Belloc JB, Divaris M, Cancemi GF,Vaillant JM. Cherubism. Apropos of a major case. Rev Stomatol Chir Maxillofac, 1993:94:152–8.

Benetti C, Crippa R, Mazza M,Bassetti E. Nonfamilial cherubism. A clinical case report. Minerva Stomatol, 1995:44:119–26.

Bianchi SD, Boccardi A, Mela F,Romagnoli R. The computed tomographic appearances of cherubism. Skeletal Radiol, 1987:16:6–10.

Blin-Wakkach C, Lezot F,Ghoul-Mazgar S et al. Endogenous Msx1 antisense transcript: in vivo and in vitro evidences, structure, and potential involvement in skeleton development in mammals. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001:98:7336–41.

Bradley Tr, Blankenship BJ, Stout RA, Wiston DA,Lung RE. Bilateral giant cell reparative granulomas with appearance of cherubism: report of case. J Oral Surg, 1967:25:555–60.

- Burlund JG. Cherubism: Familial Bilateral Osseous Dysplasia of the Jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1962;15:43–68.
- Bushdid PB, Chen CL, Brantley DM et al. NF-kappaB mediates FGF signal regulation of msx-1 expression. *Dev Biol*, 2001;237:107–15.
- Caffey J, Williams JL. Familial fibrous swelling of the jaws. *Radiology*, 1951;56:1–14.
- Carvalho VM, Perdigao PF, Pimenta FJ, de SE, Gomez RS, Marco L de. A novel mutation of the SH3BP2 gene in an aggressive case of cherubism. *Oral Oncol*, 2007.
- Chen Y, Bei M, Woo I, Satokata I, Maas R. Msx1 controls inductive signaling in mammalian tooth morphogenesis. *Development*, 1996;122:3035–44.
- Chomette G, Auriol M, Guilbert F, Vaillant JM. Cherubism. Histo-enzymological and ultrastructural study. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1988;17:219–23.
- Cornelius EA, McClendon JL. Cherubism--hereditary fibrous dysplasia of the jaws. Roentgenographic features. *Am J Roentgenol Radium Ther Nucl Med*, 1969;106:136–43.
- Davis GB, Sinn DP, Watson SW. Case 43, part II: Cherubism. *J Oral Maxillofac Surg*, 1983;41:119–20.
- DeTomaso DC, Hann JR, Stewart Hr. Cherubism: report of a nonfamilial case. *J Am Dent Assoc*, 1985;111:455–7.
- Drossman H, Luckey JA, Kostichka AJ, D'Cunha J, Smith LM. High-speed separations of DNA sequencing reactions by capillary electrophoresis. *Anal Chem*, 1990;62:900–3.
- Dubin B, Jackson IT. The use of liposuction to contour cherubism. *Plast Reconstr Surg*, 1990;86:996–8.
- Dukart RC, Kolodny SC, Polte HW, Hooker SP. Cherubism: report of case. *J Oral Surg*, 1974;32:782–5.
- Dunlap C, Neville B, Vickers RA, O'Neil D, Barker B. The Noonan syndrome/cherubism association. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1989;67:698–705.
- Elfahsi A, Oujilal A, Lahlou M, Lazrak A, Kzadri M. An ophthalmological complication of cherubism. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*, 2007.

- Essafi Z,Slesinger MJ. Cherubism. Apropos of a case. Rev Stomatol Chir Maxillofac, 1976:77:54–5.
- Fleuchaus PT,Buhner WA. Cherubism treated by curettage and autogenous bone chips: report of case. J Oral Surg, 1967:25:348–55.
- Foissin B,Ohanian D. Apropos of 2 cases of cherubism. Ann Otolaryngol Chir Cervicofac, 1965:82:467–72.
- Foucault I, Liu YC, Bernard A,Deckert M. The chaperone protein 14-3-3 interacts with 3BP2/SH3BP2 and regulates its adapter function. J Biol Chem, 2003:278:7146–53.
- Franklin AW. Three cases of cherubism. Proc R Soc Med, 1958:51:286–8.
- Frenkel GS,Hauk H. Klinische und morphologische Befunde beim Cherubismus. In: Schwenger GN, Hg. Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie. Stuttgart, 1983:138–40.
- Friedman E,Eisenbud L. Surgical and pathological considerations in cherubism. Int J Oral Surg, 1981:10:52–7.
- Get'man II. Cherubism. Pediatria, 1973:52:64–6.
- Graf A. Klinisch-genetische Untersuchungen bei Cherubismus. Dissertation. Greifswald: Ernst-Moritz-Arndt-Universität, 1982.
- Grau H, Hardt N,Steinhauser EW. Verlaufformen und Therapiemaßnahmen beim Cherubismus. Schweiz Monatsschr Zahnmed, 1986:96:835–43.
- Grunebaum M,Tiqva P. Non familial cherubism: report of two cases. J Oral Surg, 1973:31:632–5.
- Hamner J3. The demonstration of perivascular collagen deposition IN CHERUBISM. Oral Surg Oral Med Oral Pathol, 1969:27:129–41.
- Hamner J3,Ketcham AS. Cherubism: an analysis of treatment. Cancer, 1969:23:1133–43.
- Han L, Wong D,Dhaka A et al. Protein binding and signaling properties of RIN1 suggest a unique effector function. Proc Natl Acad Sci U S A, 1997:94:4954–9.
- Hardt N. Szintigraphische Beurteilung von Knochentumoren und tumorähnlichen Knochenerkrankungen des Gesichtsschädels. In: Schwenger GN, Hg. Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie. Stuttgart, 1984:3–6.

- Harris M. Cherubism and the osteoclastoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1968;25:613–9.
- Hart W, Schweitzer DH, Slootweg PJ, Grootenhuis LS. Man with cherubism. *Ned Tijdschr Geneesk*, 2000;144:34–8.
- Hauenfelder H. Der "Cherubismus" eine familiär auftretende Erkrankung der Kieferknochen. *Dtsch. Zahn-, Mund- u. Kieferheilk.*, 1967;49:59–71.
- Hebert JM, Fraire AE, Reid R. Cherubism: report of case. *J Oral Surg*, 1972;30:827–31.
- Hoppe W, Spranger J, Hansen HG. Cherubismus. *Arch Kinderheilkd*, 1966;174:310–20.
- Hoyer PF, Neukam FW. Cherubismus-eine osteofibröse Kiefererkrankung im Kindesalter. *Klin Padiatr*, 1982;194:128–31.
- Hu G, Vastardis H, Bendall AJ et al. Haploinsufficiency of MSX1: a mechanism for selective tooth agenesis. *Mol Cell Biol*, 1998;18:6044–51.
- Hyckel P, Berndt A, Schleier P et al. Cherubism - new hypotheses on pathogenesis and therapeutic consequences. *J Craniomaxillofac Surg*, 2005;33:61–8.
- Imai Y, Kanno K, Moriya T et al. A missense mutation in the SH3BP2 gene on chromosome 4p16.3 found in a case of nonfamilial cherubism. *Cleft Palate Craniofac J*, 2003;40:632–8.
- Ireland AJ, Eveson JW. Cherubism: a report of a case with an unusual post-extraction complication. *Br Dent J*, 1988;164:116–7.
- Jernvall J, Thesleff I. Reiterative signaling and patterning during mammalian tooth morphogenesis. *Mech Dev*, 2000;92:19–29.
- Jones WA. Cherubism. A thumbnail sketch of its diagnosis and a conservative method of treatment. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1965;20:648–53.
- Jones W. Familia multiocular cystic disease of the jaws. *Am J Cancer*, 1933;946–50.
- Jou YS, Goold RD, Myers RM. Localization of the alpha 2-macroglobulin receptor-associated protein 1 gene (LRPAP1) and other gene fragments to human chromosome 4p16.3 by direct cDNA selection. *Genomics*, 1994;24:410–3.
- Kalantar MH. Treatment of cherubism with locally aggressive behavior presenting in adulthood: report of four cases and a proposed new grading system. *J Oral Maxillofac Surg*, 1998;56:1336–42.

Katz JO, Dunlap CL, Ennis RL. Cherubism: report of a case showing regression without treatment. *J Oral Maxillofac Surg*, 1992;50:301–3.

Katz JO, Underhill TE. Multiocular radiolucencies. *Dent Clin North Am*, 1994;38:63–81.

Kaugars GE, Niamtu J3, Svirsky JA. Cherubism: diagnosis, treatment, and comparison with central giant cell granulomas and giant cell tumors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1992;73:369–74.

Khosla VM, Korobkin M. Cherubism. *Am J Dis Child*, 1970;120:458–61.

Kitahara Y, Suda N, Kuroda T, Beck F, Hammond VE, Takano Y. Disturbed tooth development in parathyroid hormone-related protein (PTHrP)-gene knockout mice. *Bone*, 2002;30:48–56.

Kleppe K, Ohtsuka E, Kleppe R, Molineux I, Khorana HG. Studies on polynucleotides. XCVI. Repair replications of short synthetic DNA's as catalyzed by DNA polymerases. *J Mol Biol*, 1971;56:341–61.

Kolesov AA, Panikarovskii VV, Roginskii VV. Cherubism-swoebrasaja forma dyslasie tscheljustej. *Stomatol (Mosk)*, 1973;52:27–31.

Kozakiewicz M, Perczynska-Partyka W, Kobos J. Cherubism--clinical picture and treatment. *Oral Dis*, 2001;7:123–30.

Kramer IR, Pindborg JJ, Shear M. *Histological typing of odontogenic tumours*. 2. ed. Berlin: Springer, 1992.

Lange J de, Rosenberg AJ, van dP, Koole R, Wirts JJ, van den BH. Treatment of central giant cell granuloma of the jaw with calcitonin. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 1999;28:372–6.

Lee J, Jung Y, Kim S, Lee S, Ahn S, Yoon J. Investigation of the SH3BP2 Gene Mutation in Cherubism. *Acta Med Okayama*, 2008;62:209–12.

Li CY, Yu SF. A novel mutation in the SH3BP2 gene causes cherubism: case report. *BMC Med Genet*, 2006;7:84.

Lietman SA, Kalinchinko N, Deng X, Kohanski R, Levine MA. Identification of a novel mutation of SH3BP2 in cherubism and demonstration that SH3BP2 mutations lead to increased NFAT activation. *Hum Mutat*, 2006;27:717–8.

Luo K, Lodish HF. Signaling by chimeric erythropoietin-TGF-beta receptors: homodimerization of the cytoplasmic domain of the type I TGF-beta receptor and heterodimerization with the type II receptor are both required for intracellular signal transduction. *EMBO J*, 1996;15:4485–96.

Mangion J, Edkins S, Goss AN, Stratton MR, Flanagan AM. Familial craniofacial fibrous dysplasia: absence of linkage to GNAS1 and the gene for cherubism. *J Med Genet*, 2000;37:E37.

Mangion J, Rahman N, Edkins S et al. The gene for cherubism maps to chromosome 4p16.3. *Am J Hum Genet*, 1999;65:151–7.

McClendon J. Hereditary fibrous dysplasia of the jaws. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1962;15:17–42.

McKusick VA, Antonarakis SE. Mendelian inheritance in man. Baltimore: Johns Hopkins Univ. Press, 1998.

Mekaapiruk K, Suda N, Hammond VE et al. The influence of parathyroid hormone-related protein (PTHrP) on tooth-germ development and osteoclastogenesis in alveolar bone of PTHrP-knock out and wild-type mice in vitro. *Arch Oral Biol*, 2002;47:665–72.

Meng XM, Yu SF, Yu GY. Clinicopathologic study of 24 cases of cherubism. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 2005;34:350–6.

Miah SM, Hatani T, Qu X, Yamamura H, Sada K. Point mutations of 3BP2 identified in human-inherited disease cherubism result in the loss of function. *Genes Cells*, 2004;9:993–1004.

Nordstrom T, Nourizad K, Ronaghi M, Nyren P. Method enabling pyrosequencing on double-stranded DNA. *Anal Biochem*, 2000;282:186–93.

Ongole R, Pillai RS, Pai KM. Cherubism in siblings: a case report. *J Can Dent Assoc*, 2003;69:150–4.

Opitz C, Wittstock K. Verlaufsbeobachtungen beim Cherubismus. *Stomatol DDR*, 1990;40:60–3.

Pawson T, Gish GD, Nash P. SH2 domains, interaction modules and cellular wiring. *Trends Cell Biol*, 2001;11:504–11.

- Penarrocha M, Bonet J, Minguez JM, Bagan JV, Vera F, Minguez I. Cherubism: a clinical, radiographic, and histopathologic comparison of 7 cases. *J Oral Maxillofac Surg*, 2006;64:924–30.
- Peters WJ. Cherubism: a study of twenty cases from one family. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1979;47:307–11.
- Petschler M. 5 Generationen Cherubismus: Genetische Befunde und therapeutische Konsequenzen. Dissertation. Berlin: Humboldt-Universität, 2002.
- Petschler M, Stiller M, Hoffmeister B et al. Clinical and molecular genetic observations on families with cherubism over three generations. *Mund Kiefer Gesichtschir*, 2003;7:83–7.
- Philbrick WM, Dreyer BE, Nakchbandi IA, Karaplis AC. Parathyroid hormone-related protein is required for tooth eruption. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1998;95:11846–51.
- Pirnar T, Tinaztepe K, Kaya S. Cherubism. The hereditary form of fibrous dysplasia localized to the jaws. *Turk J Pediatr*, 1971;13:104–11.
- Prigent F, Valleteau MJ de, Penso D, Segas E, Civatte J. MacCune-Albright syndrome. Apropos of a case. *Ann Dermatol Venereol*, 1982;109:1039–46.
- Quan F, Grompe M, Jakobs P, Popovich BW. Spontaneous deletion in the FMR1 gene in a patient with fragile X syndrome and cherubism. *Hum Mol Genet*, 1995;4:1681–4.
- Ramon Y, Berman W, Bubis JJ. Gingival fibromatosis combined with cherubism. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1967;24:435–48.
- Reade PC, McKellar GM, Radden BG. Unilateral mandibular cherubism: brief review and case report. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 1984;22:189–94.
- Regezi JA, Zarbo RJ, Lloyd RV. Muramidase, alpha-1 antitrypsin, alpha-1 antichymotrypsin, and S-100 protein immunoreactivity in giant cell lesions. *Cancer*, 1987;59:64–8.
- Ren R, Mayer BJ, Cicchetti P, Baltimore D. Identification of a ten-amino acid proline-rich SH3 binding site. *Science*, 1993;259:1157–61.
- Romashkova JA, Makarov SS. NF-kappaB is a target of AKT in anti-apoptotic PDGF signalling. *Nature*, 1999;401:86–90.

- Ronaghi M, Nygren M, Lundeberg J, Nyren P. Analyses of secondary structures in DNA by pyrosequencing. *Anal Biochem*, 1999;267:65–71.
- Sanger F, Nicklen S, Coulson AR. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 1977;74:5463–7.
- Satokata I, Ma L, Ohshima H et al. Msx2 deficiency in mice causes pleiotropic defects in bone growth and ectodermal organ formation. *Nat Genet*, 2000;24:391–5.
- Satokata I, Maas R. Msx1 deficient mice exhibit cleft palate and abnormalities of craniofacial and tooth development. *Nat Genet*, 1994;6:348–56.
- Schindel J, Kalmanovich M, Edlan A, Lurie M. Cherubism. *Int Surg*, 1974;59:225–8.
- Schneck K. Cherubismus. Dissertation. Frankfurt/Main: Johann-Wolfgang-von Goethe-Universität, 1984.
- Schwenzer, G. N. (Hg.). Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie. Stuttgart, 1983.
- Schwenzer, G. N. (Hg.). Fortschritte der Kiefer- und Gesichtschirurgie. Stuttgart, 1984.
- Sitzmann F. Cherubismus, eine besondere Form der fibrösen Dysplasie des Kieferknochens? *Dtsch Zahnärztl Z*, 1973;28:1089–94.
- Southgate J, Sarma U, Townend JV, Barron J, Flanagan AM. Study of the cell biology and biochemistry of cherubism. *J Clin Pathol*, 1998;51:831–7.
- Stiller M, Urban M, Golder W et al. Craniosynostosis in cherubism. *Am J Med Genet*, 2000;95:325–31.
- Tazawa H, Takahashi S, Zilliacus J. Interaction of the parathyroid hormone receptor with the 14-3-3 protein. *Biochim Biophys Acta*, 2003;1620:32–8.
- Thoma K. Cherubism and other intraosseous Giant-Cell lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*, 1962;15:1–4.
- Timosca GC. Cherubism: regression of the lesions and spontaneous bone regeneration. *Rev Stomatol Chir Maxillofac*, 1996;97:172–7.
- Timosca GC, Galesanu RM, Cotutiu C, Grigoras M. Aggressive form of cherubism: report of a case. *J Oral Maxillofac Surg*, 2000;58:336–44.

- Tiziani V, Reichenberger E, Buzzo CL et al. The gene for cherubism maps to chromosome 4p16. *Am J Hum Genet*, 1999;65:158–66.
- Tzivion G, Shen YH, Zhu J. 14-3-3 proteins; bringing new definitions to scaffolding. *Oncogene*, 2001;20:6331–8.
- Ueki Y, Lin CY, Senoo M et al. Increased myeloid cell responses to M-CSF and RANKL cause bone loss and inflammation in SH3BP2 "cherubism" mice. *Cell*, 2007;128:71–83.
- Ueki Y, Tiziani V, Santanna C et al. Mutations in the gene encoding c-Abl-binding protein SH3BP2 cause cherubism. *Nat Genet*, 2001;28:125–6.
- Vastardis H, Karimbux N, Guthua SW, Seidman JG, Seidman CE. A human MSX1 homeodomain missense mutation causes selective tooth agenesis. *Nat Genet*, 1996;13:417–21.
- Wackerle B, Reiser M, Herzog M, Kahn T. Radiologische Befunde beim Cherubismus-Orthopantomogramm, CT und MRT. *Röntgenpraxis*, 1987;40:104–7.
- Wang C, Song Y, Peng B et al. Expression of c-Src and comparison of cytologic features in cherubism, central giant cell granuloma and giant cell tumors. *Oncol Rep*, 2006;15:589–94.
- Wang CN, Song YL, Peng B et al. The aggressive form of cherubism: report of two cases in unrelated families. *Br J Oral Maxillofac Surg*, 2006;44:322–4.
- Wang Y, Waldron RT, Dhaka A et al. The RAS effector RIN1 directly competes with RAF and is regulated by 14-3-3 proteins. *Mol Cell Biol*, 2002;22:916–26.
- Wayman JB. Cherubism: a report on three cases. *Br J Oral Surg*, 1978;16:47–56.
- Wiedemann H, Kunze J, Dibern H. Atlas der klinischen Syndrome. 3., völlig überarb. u. wesentl. erw. Aufl. Stuttgart: Schattauer, 1989.
- Witkowski R, Herrmann FH. Einführung in die klinische Genetik. 4., bearb. Aufl. Berlin: Akad.-Verl., 1989.
- Wowern N von. Cherubism. *Int J Oral Surg*, 1972;1:240–9.
- Wysolmerski JJ, Cormier S, Philbrick WM et al. Absence of functional type 1 parathyroid hormone (PTH)/PTH-related protein receptors in humans is associated with abnormal breast development and tooth impaction. *J Clin Endocrinol Metab*, 2001;86:1788–94.



## **9 Danksagung**

Für die Unterstützung bei meiner Doktorarbeit bedanke ich mich bei den Mitarbeitern des Instituts für medizinische Genetik der Humboldt-Universität zu Berlin, insbesondere meine Betreuerin Frau Professor Dr. rer. nat.habil. Regine Witkowski und Dr. Hartmut Peters.

Bei den durchgeführten genetischen Untersuchungen haben mich Gundula Leschik, Ingrid Barth sowie Birgit Jonske-de Condor stets kompetent und hilfsbereit unterstützt.

Bei meiner Familie möchte ich mich für die fortwährende Unterstützung und Geduld bedanken.

## **10 Lebenslauf**

Mein Lebenslauf wird aus datenschutzrechtlichen Gründen in der elektronischen Version meiner Arbeit nicht veröffentlicht.

## 11 Erklärung

„Ich, Beatrice Biernat, geb. Dette, erkläre, dass ich die vorgelegte Dissertationsschrift mit dem Thema: *Medizinische und molekulargenetische Untersuchung von Cherubismuspatienten* selbst verfasst und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt, ohne die (unzulässige) Hilfe Dritter verfasst und auch in Teilen keine Kopien anderer Arbeiten dargestellt habe.“

Datum Unterschrift

## Literaturverzeichnis

3d structure of NRas GTPase (1-172) from two perspectives with GDP and 8 Mg<sup>2+</sup> Ions after PDB 3CON, 2008. Online verfügbar unter [http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:NRas\\_3CON.png](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:NRas_3CON.png), zuletzt geprüft am 28.1.2012.

3d structure of parathyroid hormone (PTH) fragment 1-39 from PDB 1BWX, 2008. Online verfügbar unter [http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Parathormon\\_1BWX.png](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Parathormon_1BWX.png), zuletzt geprüft am 28.1.2012.

Berardi M, Sun C, Zehr M et al., 1999. The ig fold of the core binding factor alpha runt domain is a member of a family of structurally and functionally related ig-fold dna-binding domains: MMDB: 3D structures and macromolecular interactions. (Structure Fold.Des., p. 1247). Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=13311>, zuletzt geprüft am 28.1.2012.

Enomoto M, Xiang L, Ishii T et al. Solution structure of human acidic fibroblast growth factor (Afgf) in the presence of a protein stabilizer ndsb-new: MMDB: 3D structures and macromolecular interactions. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=80758>, zuletzt geprüft am 28.1.2012.

Futterer K, Wong J, Grucza RA, Chan AC, Waksman G, 1998. Structural basis for Syk tyrosine kinase ubiquity in signal transduction pathways revealed by the crystal structure of its regulatory SH2 domains bound to a dually phosphorylated ITAM peptide: Protein Data Bank. (J Mol Biol, 281). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1a81/pdb>, zuletzt geprüft am 18.1.2012.

Hatani T, Sada K. Adaptor protein 3BP2 and cherubism. *Curr Med Chem*, 2008;15:549–54.

Hatta R, Tomizawa T, Hayashi F, Yoshida M, Yokoyama S. Solution structure of the SH2 domain of human SH3BP2 protein 2CR4. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.2210/pdb2cr4/pdb>, zuletzt geprüft am 28.1.2012.

Lietman SA, Yin L, Levine MA. SH3BP2 is an activator of NFAT activity and osteoclastogenesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 2008;4:644–8.

Lui C, Walter TS, Huang P et al., 2010. Structural and functional insights of rankl-rank interaction and signaling: National Center for Biotechnology Information. (J Immunol). Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/mmdb/mmdbsrv.cgi?uid=82501>, zuletzt geprüft am 18.1.2012.

Overduin M, Rios CB, Mayer BJ, Baltimore D, Cowburn D. Three-dimensional solution structure of the src homology 2 domain of c-abl. Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1ab2/pdb>, zuletzt geprüft am 28.1.2012.

Structure of the MSX1 protein, 2009. Online verfügbar unter [http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein\\_MSX1\\_PDB\\_1ig7.png](http://en.wikipedia.org/wiki/File:Protein_MSX1_PDB_1ig7.png), zuletzt geprüft am 28.1.2012.

Vereinfachtes Schema der Proteinbiosynthese. Online verfügbar unter <http://www.webmic.de/images/protbio1.jpg>, zuletzt geprüft am 28.1.2012.

White G. Molecular surface of Immunoglobulin (IgG): Wikipedia. Online verfügbar unter [http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:IgG\\_molecular\\_surface.jpg](http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:IgG_molecular_surface.jpg), zuletzt geprüft am 28.1.2012.

Zhou P, Sun LJ, Dotsch V, Wagner G, Verdine GL, 1998. Solution structure of the core NFATC1/DNA complex. (Cell(Cambridge,Mass.), 92). Online verfügbar unter <http://dx.doi.org/10.2210/pdb1a66/pdb>, zuletzt geprüft am 18.1.2012.